

RICERCHE
MINISTERIALI
CORRENTI 2011

RISULTATI

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

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

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Introduzione

La nascita prematura rappresenta per il neonato un evento che causa un consistente stress da un punto di vista fisiologico ed emotivo e determina l'alterazione di alcuni ritmi biologici ma anche degli scambi interattivi con la madre. Le madri altresì sperimentano una transizione alla genitorialità caratterizzata da un elevato stress emotivo che spesso si manifesta con una sintomatologia di natura depressiva. L'insieme di queste condizioni si associa frequentemente ad uno scambio precoce madre-bambino caratterizzato da una alterazione della sincronia tra i partner. Sebbene studi precedenti hanno investigato alcuni di questi fattori, per quanto a noi noto, non sono state svolte ricerche con un approccio neurobiologico che indaghino gli effetti dello stress, subito sia dal bambino che dalla madre, sull'interazione precoce.

Obiettivo generale

La ricerca, articolata per funzionalità organizzativa in due studi, ha l'obiettivo generale di indagare il rapporto tra alcuni processi neurobiologici utilizzati come indicatori precoci di stress del bambino (in particolare, il ritmo sonno-veglia e l'attività vagale misurata tramite l'Aritmia Sinusale Respiratoria (RSA) e la qualità della relazione a 3 mesi di età corretta del bambino. Nel corso dell'interazione precoce è stata valutato, in entrambi i partner, non solo il grado di coinvolgimento, ma anche la reattività dell'asse ipotalamo-ipofisocorticosurrene misurata tramite il cortisolo salivare e la RSA. Inoltre, ci siamo

proposti di indagare i pattern di attivazione cerebrale delle madri tramite la tecnica del neuroimaging funzionale (fMRI), con lo scopo specifico di analizzare possibili differenze tra una condizione di transizione alla genitorialità tipica (madri di bambini nati a termine) e una sfavorevole (madri di bambini pretermine). Lo Studio I ha incluso due fasi: durante il ricovero in Terapia Intensiva Neonatale (TIN), nel corso del quale sono state effettuate osservazioni video-registrate di circa tre ore del ciclo sonno-veglia e contemporaneamente è stata monitorata l'attività cardiaca (ECG) per calcolare off-line l'Aritmia Sinusale Respiratoria (RSA) come indice dell'attività del nervo vago. Nella seconda fase, a tre mesi di età corretta del bambino, la diade madre-bambino è stata video-registrata nel corso di un'interazione semi-strutturata che include uno stress età-appropriato per l'infante (paradigma Still-Face). Nel corso di quest'ultima è stata acquisito l'ECG del bambino e della mamma e prelevati ad entrambi cinque campioni di saliva (due prima e tre dopo il paradigma sperimentale). In linea con quanto delineato nello Studio II, dopo circa tre settimane dall'osservazione dell'interazione madre-bambino le mamme partecipano all'esame di Risonanza Magnetica Funzionale (fMRI) durante il quale osservano immagini del proprio figlio, mentre esprime tre differenti espressioni (positiva, negativa, neutra), appaiate con quelle di un bambino sconosciuto. Resoconto attività 2011. È stato ampliato il campione sperimentale e quello di controllo. Sono stati quindi codificati gli stati di sonno-veglia del campione clinico, analizzate le interazione madre-bambino registrate a tre mesi di quest'ultimo ed i relativi dati fisiologici (cortisolo salivare ed ECG) relativi sia ai bambini che alla madre. Sono state eseguite sessioni di fMRI, come da protocollo, ad un gruppo di mamme, sperimentale e di controllo, e sono stati analizzati i risultati. Risultati e discussione. Complessivamente, i dati della presente ricerca corrente evidenziano che in fase neonatale i neonati prematuri presentano una disorganizzazione del sistema nervoso centrale. Tuttavia gli effetti di tale immaturità si riducono nell'arco dei primi tre mesi di vita. Per quanto riguarda le madri emerge che l'esperienza della nascita di un figlio prematuro si associa a modificazioni funzionali dell'attività cerebrale che si osservano anche dopo diversi mesi dalla dimissione del bambino dalla TIN. I risultati forniscono nuove conoscenze dei correlati neurobiologici della genitorialità in condizioni avverse di sviluppo.

FENOTIPO SOCIALE, ENDOFENOTIPO E NEUROGENETICA COMPORTAMENTALE NELLE SINDROMI CON RITARDO MENTALE GENETICAMENTE DEFINITE

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Poli di Ostuni, San Vito e Pesian di Prato, Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Disordini genetici che impediscono il normale sviluppo cognitivo comportamentale nei bambini sono presenti in più dell'1% della popolazione generale e più del 25% dei soggetti con ritardo mentale presenta importanti problematiche di comportamento, con una prevalenza quindi circa quattro volte maggiore rispetto alla popolazione generale. Interpretati nel passato come dipendenti dal deficit cognitivo spesso concomitante, i disordini del comportamento negli anni recenti sono stati sempre più identificati come specifica componente del quadro complessivo, legata quindi al genotipo.

Obiettivi della presente ricerca sono:

1. Identificazione delle caratteristiche cliniche del fenotipo comportamentale e sociale, definizione dell'incidenza e prevalenza dei disturbi sociali ed adattivi in una popolazione ampia di pazienti con quadro sindrome a base geneticamente definita con utilizzazione di protocolli definiti, evidence based e con confronti in letteratura
2. Su sottopopolazioni definite ed omogenee di studio neurofunzionale delle strutture coinvolte nella modulazione del comportamento emotivo e sociale accoppiata con uno studio della funzione neuroendocrina
3. Correlazioni genotipo/fenotipo in quadri omogenei dal punto di vista genetico
4. Individuazione indicatori specifici (sia per tipologia che per età di insorgenza)
5. individuazione di percorsi genotipo/specifici di monitoraggio e terapia

La ricerca ha durata triennale. Nel corso di questo anno si è provveduto a iniziare il reclutamento; i pazienti reclutati sono sottoposti ad una batteria di valutazione con utilizzazione di questionari e tests già in uso a livello clinico, riuniti in una batteria, in modo da poter configurare un profilo specifico sia per ogni soggetto che per quadro geneticamente omogeneo.

Sono stati analizzati i dati legati alle problematiche psicopatologiche nella Sindrome di Williams distinguendo all'interno del campione due gruppi: infradiciottenni e persone con più di 18 anni. Il 46,7% del campione totale mostrava almeno un disturbo psichiatrico, il 15,6% presentavano almeno 2 disturbi. (nel 10,5% dei giovani e nel 20,5% degli adulti). Il disturbo ansioso era presente nel 29,9% dei soggetti, mentre erano identicamente distribuite (11.7%) ADHD e psicosi. Assenti nel campione i disturbi disadattivi del comportamento (disturbo oppositivo-provocatorio; abuso di sostanze stupefacenti). Non è stata verificata alcuna differenza di genere nella distribuzione del disturbo psicopatologico fra sessi. Il quoziente intellettivo dei partecipanti che presentavano un disturbo psicopatologico era significativamente più basso di chi non presentava alcun disturbo. Il disturbo psicotico era significativamente più presente nel gruppo dei soggetti adulti. Per quanto attiene al trattamento farmacologico, tra i soggetti con almeno un disturbo psichiatrico, l'83,3% dei minorenni e il 66,6% degli adulti non avevano mai ricevuto cure farmacologiche. Tra quelli trattati farmacologicamente, si è registrata a volte la utilizzazione di farmaci diversi (nel gruppo dei minorenni; SSRI in quadro psicotico, BDZ in disturbo dell'umore. Tra gli adulti risperidone ma anche oxcarbamezepina per disturbo psicotico, BDZ per disturbo ansioso e per disturbo dell'umore, olanzapina per disturbo bipolare).

In conclusione i dati fin qui raccolti permettono di sottolineare l'urgenza di porre una maggiore attenzione agli aspetti psicopatologici nel ritardo mentale, che sembra un aspetto diagnostico significativamente trascurato. Tale aspetto sembra avere una ricaduta immediata sia sugli aspetti clinici (valutazione e management) che sulle scelte terapeutiche.

RUOLO DELLE TUBULINE (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8) NELLE MALFORMAZIONI DELLO SVILUPPO CORTICALE (MCD): STUDIO GENETICO-MOLECOLARE, CLINICO E NEURO-RADIOLOGICO DI UN'AMPIA CASISTICA DI SOGGETTI AFFETTI

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Reparto Neuroriabilitazione 1, Laboratorio di Biologia Molecolare, Unità di Neuroradiologia Polo di Bosisio Parini; Poli di Conegliano e Pieve di Soligo, San Vito e Pasian di Prato, Ostuni

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Obiettivi del presente studio sono una migliore comprensione del ruolo delle Tubuline (*TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *TUBA8*) nella eziopatogenesi delle malformazioni dello sviluppo corticale (MCD), nella morfogenesi delle strutture corticali e nei processi cellulari cruciali per lo sviluppo corticale come la proliferazione, l'organizzazione e la migrazione neuronale, nei meccanismi di guida assonale e dei processi di organizzazione della glia radiale; una migliore definizione dello spettro di MCD associate a mutazioni in tali geni attraverso una dettagliata correlazione genotipo-fenotipo clinico e neuroradiologico; la definizione possibili iter diagnostici e neuroradiologici specifici per i soggetti con MCD. Al fine è stata rivalutata un'ampia casistica di soggetti (ad oggi sono stati reclutati 123 soggetti) nei quali una indagine neuroradiologica abbia documentato una MCD (secondo Classificazione di Barkovich et al 2005), già valutati e risultati negativi per i principali geni noti e specifici per le singole malformazioni (*DCX*, *EMX2*, *ARX*, *HESX1*, *GPR56*, *SRPX2*, *LIS1*, *REL*, *FLNA*) (Barkovich et al. 2005) e all'analisi del cariotipo molecolare mediante tecnica CGH-array effettuata in soggetti con quadri malformativi complessi (casi con malformazioni coinvolgenti altre strutture cerebrali ed extra cerebrali). Nei 123 soggetti arruolati nello studio il quadro di MCD prevalente risulta a essere quello a carico dell'organizzazione neuronale (81/123, 66%). Malformazioni della migrazione neuronale sono state riscontrate in 38/123

soggetti (31 %), mentre solo 3 soggetti presentano malformazioni a carico della proliferazione neuronale (100 % isolata). Per ogni soggetto è stata effettuata analisi di mutazione dei geni *TUBA1A*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *TUBA8* mediante sequenziamento diretto del DNA amplificato. Sono state riscontrate ad oggi quattro nuove mutazioni, due a carico del gene *TUBB2B* e due a carico del gene *TUBA1A*. La nuova mutazione a carico del gene *TUBB2B* in un soggetto affetto da schizencefalia (SCH), polimicrogiria (PMG), agenesia del corpo calloso (ACC), ipoplasia del III nervo cranico, dismorfismi dei nuclei della base e del brainstem, è oggetto di pubblicazione (in press) e ha consentito di ampliare lo spettro delle malformazioni dello sviluppo corticale associate a mutazioni del gene *TUBB2B*.

STUDIO DELLA REATTIVITÀ DELL'ASSE IPOTALAMO IPOFISIARIO IN BAMBINI NATI FORTEMENTE PRETERMINE: FATTORI GENETICI E MECCANISMI EPIGENETICI ASSOCIATI ALLO STRESS SOCIALE

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Terapia Intensiva Neonatale, Fondazione IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena", Milano; Unità Operativa di Pediatria, Ospedale Sacra Famiglia, Erba (CO); Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Sacra Famiglia, Erba (CO); in qualità di consulente scientifico il professor Ed Tronick della Child Development Unit, Children's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

La nascita pretermine espone il bambino ad una condizione altamente stressante a causa della precoce separazione dalla figura materna e dell'esposizione prolungata ad un ambiente avverso il quale, oltre a fattori esterni (luci, rumori, ecc), prevede interventi invasivi e dolorosi. Uno stress prolungato può avere effetti dannosi sull'individuo (Tsigos & Chrousos, 2002) e pertanto le condizioni avverse a cui sono esposti i bambini pretermine si configurano come una situazione di alto rischio che può alterare la capacità di regolare le risposte agli eventi stressanti con effetti anche lungo termine.

È stato suggerito che la risposta allo stress sia mediata sia da meccanismi di natura genetica che di tipo epigenetico tuttavia il contributo di tali fattori alla reattività allo stress dei bambini pretermine non è ancora stato esplorato. Ricerche sui modelli animali e umani hanno evidenziato il ruolo giocato i fattori genetici quali ad esempio il polimorfismo del 5-HTTLPR.

Obiettivi del presente studio sono a) valutare il ruolo del polimorfismo 5-HTTLPR associato alle differenze individuali nella reattività allo stress; b) valutare se la condizione di precoce esposizione allo stress in TIN si associ, nei pretermine comparati ai nati a termine, a differenti livelli di metilazione del gene Nr3c1, responsabile della sintesi di proteine che formano i recettori GR

per il cortisolo.

La ricerca ha durata triennale; nel corso di questo anno si è provveduto a:

a. perfezionare il protocollo dello studio con definizione operativa delle fasi del progetto, degli strumenti e delle procedure da utilizzare;

b. stendere i documenti relativi alla privacy (lettera informativa genitori, consenso informato alla ricerca, alle procedure previste da protocollo e al trattamento dei dati, ecc.);

c. sottoposto il protocollo ai Comitati di Etica

d. avviare la parte operativa attraverso l'acquisto della strumentazione: test self-report; hardware (videocamere, personal, ecc.); materiale di laboratorio per le analisi genetiche e biologiche;

e. procedere con il reclutamento dei bambini pretermine presso l'Unità Operativa di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano (10 diadi madre-bambino) e presso l'Ospedale Fatebenefratelli di Erba (CO) reclutamento dei bambini nati a termine.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Ostuni

Collaborazioni

Università degli Studi di Bari - S.A. di Neuroradiologia

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

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 esiti di insulto cerebro-vascolare che sono stati sottoposti, al momento T0, 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 traggografica delle fibre appartenenti al tratto corticospinale. Lo stesso procedimento è stato ripetuto dopo 6 mesi (T1).

I risultati definitivi sostanzialmente vanno nella stessa direzione di quelli attesi sulla base dei dati riportati nella letteratura scientifica internazionale. In particolare, al T0, nel 75% dei bambini è stata registrata, una riduzione del volume del fascio considerato e del numero di fibre che lo compongono, in corrispondenza della lesione, rispetto al lato sano e tale riduzione è direttamente proporzionale al volume della lesione stessa. Concomitantemente, la frazione anisotropica, che in corrispondenza di una lesione ischemica è per definizione aumentata, è risultata tale in tutti i nostri pazienti e il Coefficiente di Diffusione Apparente ridotto. Al T1 nel 77% il tratto di fascio cortico-spinale misurato risultava relativamente aumentato rispetto ai valori al T0, e sempre ridotto rispetto al lato sano nel tratto omologo.

Questi dati sono un segno di riorganizzazione cerebrale in atto.

I risultati del nostro studio permettono di esprimere correlazioni clinico-neuroradiologiche univoche e chiare, esprimendo i dati in T1 modificazioni clinico-funzionali che sono 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.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Centro Studi di Neuroimaging dell'età Evolutiva CeSNE

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

In questo progetto, ancora in corso, vogliamo approfondire le modifiche funzionali e strutturali del Sistema Nervoso Centrale di pazienti affetti da cerebrolesioni acquisite 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). Inoltre correlare tali cambiamenti funzionali con l'outcome cognitivo e complessivo dei pazienti. La ricerca iniziata nel 2010, dopo approvazione ricerca da parte del Comitato Etico (C.E.) ottenuta il 14/4/10 ha previsto la messa a punto dei protocolli clinico diagnostici da parte della neuropsicologa, la creazione di un primo paradigma di studio per la f-RM (collaborazione neuropsicologa e ingegneri), che valuta la funzione attentiva, quella maggiormente compromessa nelle fasi iniziali di una lesione cerebrale. Si è quindi proceduto al noleggio della f-NIRS e si è proceduto ad un corso di addestramento per utilizzo strumento. È stato predisposto un paradigma sulla "working memory". Per ora lo strumento è stato utilizzato solo su volontari adulti sani e su un iniziale campione di pazienti.

È stato predisposto il data base per la raccolta dei dati clinici strumentali.

Nel 2011 sono stati reclutati 27 pazienti con esiti di lesione acquisita che corrispondevano ai criteri di inclusioni previsti. Tutti sono stati studiati dal punto di vista clinico e testistico e hanno eseguito la RM cerebrale morfologica e una o due fRM. La NIRS per ora è stata eseguita solo su volontari sani, e su

un iniziale campione di pazienti. La fRM è stata eseguita anche su controlli sani di età paragonabile ai pazienti reclutati.

I pazienti inseriti nel data base sono 21, in particolare 12 maschi e 9 femmine, con età media al trauma di 12 anni (SD 4,84), una GCS in acuto di 6,33 (SD2,2), la lunghezza dello stato di non responsività medio è di 15,88 giorni (SD 12,91). 15 pazienti hanno subito trauma cranico da incidente stradale o trauma accidentale, mentre 6 hanno subito un ictus prevalentemente emorragico da rottura di MAV. Undici pazienti hanno subito un intervento neurochirurgico in acuto.

L'analisi dei dati strumentali verrà elaborata negli ultimi 2 mesi del 2012.

ATASSIE EREDODEGENERATIVE AD ESORDIO PRECOCE: DESCRIZIONE DEL PATTERN DI ALTERAZIONE PATOLOGICA MEDIANTE NEUROIMAGING AVANZATO E STUDIO NEUROPSICOLOGICO PER LA DEFINIZIONE DI INDICATORI PARACLINICI UTILI AL MONITORAGGIO DELL'EVOLUZIONE O ALLA VERIFICA DI EFFICACIA DI TRATTAMENTO

DR. ANDREA MARTINUZZI

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

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nel corso del 2011 sono stati organizzati incontri con i referenti della Ricerca presso i Centri coinvolti (Bosisio Parini, Conegliano e Udine), nell'ambito dei quali si sono discussi e definiti gli obiettivi del progetto con i rispettivi ruoli. In base alla revisione della letteratura, è stato definito un protocollo diagnostico specifico e standardizzato per la valutazione degli aspetti motori e cognitivi.

È stato dato mandato ai singoli Centri coinvolti di fornire un elenco dei pazienti affetti da Atassia eredodegenerativa ad esordio precoce e selezionabili per lo studio. Parallelamente sarà individuato il gruppo di controllo di soggetti sani di pari età, sesso e quoziente intellettivo.

È stato attivato un Dottorato di Ricerca in Medicina dello sviluppo e scienze della programmazione presso l'Università di Padova della durata di 3 anni con decorrenza dall'anno accademico 2011/2012 e sarà svolto principalmente presso l'IRCSS Eugenio Medea - Polo di Conegliano/Pieve di Soligo. È in fase di elaborazione un protocollo di neuroimaging avanzato comprendente analisi volumetrica, DTI e fMRI a cui saranno sottoposti sia i pazienti affetti che i controlli normali. In particolare sono in corso di definizione i task motori e neuropsicologici da utilizzare in fMRI.

CREAZIONE DI RETE DI NETWORK E DI DATA BASE DI POPOLAZIONE DI SOGGETTI AFFETTI DA PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE IN ETÀ PEDIATRICA ED ADULTA

DR.SSA MARIA GRAZIA D'ANGELO

E-MAIL: GRAZIA.DANGELO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Unità BioIngegneria di Bosisio Parini; Poli di Conegliano e Pieve, Ostuni, San Vito e Pesian di Prato; Clinica Neurologica Fondazione Ca' Granda Policlinico di Milano; Centri di Riabilitazione "Associazione La Nostra Famiglia"

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Ad oggi, nell'ambito del progetto "Database di pazienti affetti da patologie neuromuscolari" sono state svolte le seguenti attività:

- Selezione dei gruppi patologici di interesse da inserire nel database in rapporto alla tipologia prevalente di pazienti afferenti alla Unità Neuromuscolare dell' IRCCS E. Medea nella sede di Bosisio Parini.
- Individuazione dei dati di interesse da registrare per ogni singolo paziente, ripartiti in informazioni anamnestiche ed informazioni relative al follow-up in ambito neuromuscolare, neuropsicologico, cardio-pneumologico e fisioterapico (scale di valutazione), da registrare in maniera cumulativa a partire dal primo accesso del paziente presso l'Istituto.
- Elaborazione di una prima rappresentazione schematica dei parametri di interesse in versione excel, con la specifica per ciascuno della modalità di registrazione in forma di variabili chiuse a scelta multipla tra opzioni predefinite o in forma di campi liberamente compilabili con valori numerici o "note" scritte.
- Sulla base delle suddette specifiche, elaborazione da parte degli ingegneri del modello grafico definitivo di rappresentazione del database a PC, che ha necessitato di modifiche in itinere nel corso della sua fruizione fino alla sua attuale ottimizzazione.
- Dalla fine del 2011 è iniziato il lavoro di inserimento dati che interesserà più

di 600 pazienti, per i due terzi dei quali andranno registrati più di 10 accessi a partire dal primo ingresso presso il nostro Istituto.

- Si valuterà in futuro la possibilità di collegare il database al sistema interno Clinsuite, in modo che i dati di interesse inseriti nei referti delle visite e nelle relazioni di dimissione possano essere direttamente convogliati nel database senza necessità di una seconda digitazione.

- Il passaggio successivo all'inserimento dei dati prevede infine l'elaborazione di sistemi di estrapolazione degli stessi sulla base di criteri di selezione modificabili a seconda delle necessità del clinico ricercatore, attraverso algoritmi informatici che andranno individuati dagli ingegneri ed eventualmente creati ad hoc.

STUDIO PILOTA DI DEFINIZIONE DI PARADIGMI UTILI ALLA VALUTAZIONE MEDIANTE AD fMRI DEL PROFILO DI MODIFICAZIONE PATOLOGICA E DELLA EFFICACIA DI INTERVENTI RIABILITATIVI INDIVIDUALIZZATI IN PCI SPASTICA AD ESPRESSIONE BILATERALE

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Poli di Conegliano, San Vito - Udine

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

La Paralisi Cerebrale Infantile (PCI) è un disturbo neurologico dello sviluppo con una prevalenza di circa 1.5–2.5 pazienti per 1000 nati vivi. Gli studi neuroradiologici hanno consentito di migliorare la conoscenza morfologica delle lesioni (Risonanza Magnetica, RM) e delle vie nervose (Trattografia, DTI); l'utilizzo della Risonanza Funzionale (fMRI) ha inoltre la potenzialità di definire le caratteristiche delle modificazioni alla base dei fenotipi clinici osservati nelle PCI. Un'altra misura che ci consente di evidenziare i network corticali ci viene fornita dalla Risonanza Funzionale di Connessione (fcMRI).

In una popolazione di soggetti affetti da esiti di Paralisi Cerebrale Infantile bilaterale, il progetto proposto studia e compara le valutazioni funzionali con quelle strumentali neuroradiologiche.

Obiettivi dello studio sono:

- identificare protocolli-paradigmi per lo studio delle modificazioni patologiche nelle PCI
- identificare profili funzionali diversificati nelle PCI
- correlare fenotipo-quadro neuropatologico
- identificare protocolli di trattamenti specifici
- studiare l'outcome sull'efficacia di trattamenti
- costruire programmi riabilitativi individualizzati e valutare la loro efficacia.

Il progetto iniziato nel 2011 è di tipo clinico osservazionale e ha visto la par-

tecipazione di alcuni poli dell'IRCCS Medea (Friuli, Veneto) con Bosisio capofila.

Il 26 luglio 2011 è pervenuta l'autorizzazione del ministero e conseguentemente quella dell'istituto a procedere col progetto.

Precedentemente vi era stata una fase preliminare per mettere a punto il protocollo di neuroimmagini. La valutazione neuroradiologica completa comprende una valutazione morfologica di base, studio di trattografia relativa ai fasci, Resting state e Risonanza Funzionale con applicazione di paradigma specifico per il test sulle abilità manuali. Il paradigma scelto è di tipo "Finger tapping". Il protocollo di trattamento è stato messo a punto e completato. Tra gli strumenti utili identificati per il trattamento è stato introdotto l'uso di ARMEO (presidio robotizzato per l'arto superiore) e di tablet con valutazione per impostazione di applicazioni specifiche.

I pazienti attesi dovrebbero essere 5 per ogni Polo inviante.

Il trattamento verrà effettuato presso le varie sedi mentre i pazienti provenienti da Conegliano dovranno essere inviati per effettuare le Risonanze a Bosisio Parini.

Sono stati reclutati nel Polo di Bosisio 4 soggetti che inizieranno le valutazioni e il trattamento nei primi mesi del 2012.

FATTORI GENETICI E AMBIENTALI - BIOFISICI E FAMILIARI - PREDITTIVI 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

2011

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Salimetrics (Università della Pennsylvania); University of Reading (UK)

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Il presente studio longitudinale si è proposto, in primo luogo, di testare i profili di reattività psicofisiologica allo stress ipotizzati di recente nel modello Adaptive Calibration Model (Del Giudice e colleghi, 2011) e, secondariamente, di analizzare il potere predittivo di alcuni fattori ambientali (stile di attaccamento nell'infanzia) e costituzionali nel predire le differenze individuali nella risposta allo stress in età prescolare.

Il campione è costituito da 99 soggetti, di 5 anni di età, ricontattati a distanza di 4 anni dalla prima valutazione. Il protocollo prevedeva la raccolta di campioni di saliva per la misurazione dei livelli di cortisolo e alpha amylase (sia pre- che post stressor), la registrazione dell'attività cardiaca per l'analisi della Respiratory Sinus Arrhythmia per tutto il corso della procedura stressante (Strange Situation, Cassidy & Marvin, 1992), e, infine, la compilazione da parte della madre di alcuni questionari e schede di raccolta dati.

I risultati ottenuti supportano il modello proposto da Del Giudice (2011), evidenziando, all'interno del campione esaminato, quattro classi di reattività allo stress, riconducibili ai quattro profili ipotizzati dal modello (*sensitive, buffered, vigilant e unemotional*). Tali profili sono caratterizzati da uno specifico pattern di funzionamento dei sistemi di risposta allo stress considerati (sistema autonomo simpatico e parasimpatico e asse ipotalamo-ipofisi-surrene) e da specifici correlati comportamentali. È emersa inoltre una prevalenza del genere maschile per i pattern *unemotional* e *sensitive* e femminile per il pattern *vigilant*, un'associazione significativa tra un elevato livello socioeconomico

e il pattern *sensitive* e una prevalenza di bambini più grandi tra coloro che appartenevano al profilo *vigilant*. Infine, solo lo stile di attaccamento valutato ad un anno di età è risultato predire la probabilità di appartenere a uno dei quattro pattern di reattività allo stress in età prescolare, a sostegno dell'importanza che la relazione con il caregiver nei primi anni di vita riveste nel modulare differenze individuali nella risposta allo stress.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Ostuni

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

È terminato il terzo anno di questa ricerca (di durata triennale), che ha avuto come 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 stato 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 stati 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.

Attività svolta nel 2011

Si è ultimato l'arruolamento dei soggetti con diagnosi di Disturbo Misto del

Linguaggio. La raccolta dati ha riguardato un totale di 100 soggetti ed è terminata a maggio. Di questi 100 soggetti su 25 la raccolta dei dati è completa nei tre tempi: T0 - T1 - T2; 10 soggetti hanno diagnosi di DML e 15 diagnosi di DPS. Su 36 soggetti la raccolta dei dati è completa nei due tempi: T0 - T1 (16 DML e 20 DPS). Su 31 soggetti la raccolta dei dati è completa nei due tempi: T1 - T2. La mancanza di dati a T0 è dipesa dal fatto che i bambini con diagnosi di DML non avevano home video relativi alla fascia di età 9-15 mesi; a T2 ci sono stati molti dropout. Si sono codificati tutti i filmati nei tre tempi. Si è raggiunto un accordo tra i codificatori pari all' 80%.

Risultati

Per le variabili quali "orientamento al nome", "attenzione condivisa" i due gruppi si diversificano a T0, in particolare il gruppo dei DML presenta una maggiore frequenza dei comportamenti osservati rispetto ai DPS; a T1 i due gruppi sono quasi sovrapponibili; a T2 si diversificano nuovamente, con il gruppo di DML che mostra un lieve miglioramento rispetto a T0, mentre il gruppo dei DPS mostra un peggioramento. Per la variabile "risposta agli ordini" i due gruppi si diversificano progressivamente da T0 a T1 con un'ampiezza significativa a T2. Per la variabile "contatto oculare" i due gruppi si diversificano in tutti i tempi T0 -T1 - T2 e nello specifico il gruppo di DML mostra un progressivo miglioramento a T2. Per la variabile "sorride" i due gruppi sono sovrapponibili a T0 mentre si diversificano a T1 e nello specifico il gruppo dei DPS presenta una maggiore frequenza dei comportamenti osservati rispetto al gruppo dei DML, viceversa a T2 il gruppo dei DML presenta una maggiore frequenza dei comportamenti osservati rispetto al gruppo dei DPS. Rilevante risulta essere anche l'andamento delle due variabili riguardanti la sfera emotiva (reazione emotiva e tolleranza della frustrazione) misurate su una scala a 3 punti (manifestazione emotiva adeguata, non adeguata, non osservabile). Il gruppo dei DML mostra a T2 comportamenti non adeguati mentre nel gruppo dei DPS non sono osservabili.

L'analisi dei dati è in corso e sarà effettuata mediante test statistici. Un'analisi sequenziale è anche prevista per la rilevazione delle correlazioni.

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

2011

Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": UDGEE di Udine; Poli di Bosisio, Conegliano, San Vito al Tagliamento Ostuni; Centro di Riabilitazione "Associazione La Nostra Famiglia" di Pasion di Prato, S. Vito al Tagliamento; 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; University of Maastricht, The Netherlands.

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Descrizione del progetto

Il progetto si è composto di tre fasi: una *retrospettiva*, di analisi epidemiologica dell'archivio di bambini con psicopatologia; una di *baseline/prospettica*, di rivalutazione di codesti bambini da un punto di vista comportamentale e genetico; una *sperimentale*, di *imaging*, durante la quale codesta coorte di bambini è 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)*.

Principali attività svolte

Analisi retrospettive ed epidemiologiche

Sono stati raccolti complessivamente dati su 1477 soggetti, presso i centri di Bosisio Parini (LC), Conegliano (TV), Pesian di Prato (UD) e San Vito al Tagliamento (PN). Il campione è composto da bambini e adolescenti, in prevalenza maschi (77,3%), che sono stati presi in carico tra i 6 mesi e i 17 anni e 6 mesi di età problematiche psicologiche evolutive. Sono state valutati gli aspetti neuropsicologici ed emotivo comportamentali, con particolare riguardo alla disregolazione emotivo-comportamentale ed ai tratti autistici. Si è inoltre valutata la predittività diagnostica delle scale CBCL rispetto a quelle K-SADS-PL.

Raccolta dati per la fase di baseline/prospettica (risultati preliminari)

I soggetti individuati nella fase retrospettiva sono stati contattati tramite lettera e successivamente telefonicamente per una spiegazione dettagliata delle finalità e delle modalità della ricerca in corso. Sono stati contattati circa il 60% dei soggetti nelle sedi di Bosisio Parini (LC) e di Pesian di Prato (UD) e circa il 75% dei soggetti nella sede di Conegliano (TV). È stata esplorata l'evoluzione psicopatologica, la valutazione linguistica, di personalità, della situazione familiare, genetica e di imaging.

Taratura verbi emotivi e motori

Lo scopo di questo studio è di tarare una lista di verbi, riguardanti stati emotivi e/o che coinvolgono una parte del corpo, in base all'età di acquisizione (AOA), all'"emotività" e/o "motricità", all'agitazione suscitata, alla valenza (positiva, o felicità, negativa, o tristezza) e alla facilità/difficoltà di essere immaginati. Una selezione di 36 verbi tratta da questa lista è stata utilizzata per lo studio con risonanza magnetica funzionale. Si è quindi ritenuto opportuno ottenere tali indici nella popolazione sana di bambini e adolescenti di età comparabile ai soggetti che hanno preso parte allo studio con risonanza. La lista con i relativi indici potrà inoltre essere pubblicata e messa a disposizione di chi voglia affrontare nuovi studi usando tali stimoli.

MECCANISMI NEURALI E COGNITIVI RUOLO DELLA CORTECCIA SENSOMOTORIA IN FUNZIONI COGNITIVE ELEVATE

DR.SSA BARBARA TOMASINO

E-MAIL: BARBARA.TOMASINO@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

Unità Operativa di Neurochirurgia - Azienda Ospedaliera S. Maria della Misericordia, Udine

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Questo progetto è volto a testare il ruolo dell'area sensorimotoria in funzioni cognitive elevate - quali ad esempio la simulazione mentale motoria, la rappresentazione di azioni e concetti motori, la memoria motoria e l'elaborazione linguistica di parole o frasi che descrivono movimenti o azioni. Questo tipo di studio cade sotto il dominio dell'embodied cognition. Le persone possono immaginare scene, suoni e azioni in assenza di stimoli reali o esecuzione motoria reale, attraverso la simulazione mentale, abilità che ci permette di simulare mentalmente in maniera molto accurata dal punto di vista motorio e sensoriale tutte le esperienze percettive. La simulazione mentale di un atto motorio non è accompagnata da esecuzione reale del movimento di una parte del corpo e corrisponde ad un processo attraverso il quale il cervello attiva un piano motorio e monitora il suo sviluppo attraverso modelli di feedback interno, mantenendo inibiti l'esecuzione e l'output motoneuronale.

Gli studi di neuroimmagine sono stati eseguiti mediante uno scanner 3T, Philips attraverso una serie di esperimenti su volontari sani, mediante tecniche di cranioagopuntura (studio 1) o di transfer di contesto cognitivo (studio 2).

Una serie di pazienti neurochirurgici (N=60) ha svolto un compito di elaborazione di nomi e di verbi di azioni in uno studio fMRI e neuropsicologico (Studio 3) e un altro gruppo di 40 pazienti ha svolto in fMRI un compito di immaginazione mentale di movimenti con le mani (studio 4).

La parte del progetto basata su studi di neuropsicologia classica, abbiamo

messo a punto un protocollo di test (studio 5) che vengono svolti durante la resezione chirurgica per studiare le funzioni sensorimotorie e non solo (linguistiche, memoria ecc), e in due ulteriori studi sono stati indagati l'elaborazione di azioni mediante presentazione uditiva di suoni legati ad azioni viene sia fatto al PC raccogliendo risposte e tempo di reazione, che in risonanza, raccogliendo dati funzionali (studio 6) e le rappresentazioni motorie, e lo schema corporeo in una serie di pazienti (N=2) con lesioni alle aree sensorimotorie e parietali che sono stati sottoposti ad un ampia batteria di test (studio 7).

STANDARDIZZAZIONE DELL'ADULT SELF REPORT E DELLA BEHAVIOR CHECKLIST DI ACHENBACH

DR.SSA MONICA BELLINA

E-MAIL: MONICA.BELLINA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2011

Polo Scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nel panorama clinico-scientifico italiano emerge con forza la necessità dell'utilizzo di questionari di valutazione standardizzati, che possano essere somministrato a più fonti di informazione sia nell'ambito clinico che nell'ambito di ricerca. È importante che tali strumenti godano di buone proprietà psicometriche e che la validità sia ampiamente dimostrata a livello internazionale. I questionari Adult Self Report (ASR) e Adult Behavior Check list (ABCL) soddisfano un'esigenza clinica e di ricerca, mantenendo un elevato standard di qualità a livello internazionale in quanto sono strumenti ampiamente utilizzati in letteratura. Tuttavia, l'utilizzo di questionari o scale di valutazione non può prescindere dal contesto culturale in cui vengono utilizzati.

Gli obiettivi della ricerca sono:

1. Ottenere dati per la costruzione di dati normativi applicabili alla popolazione italiana sia per il questionario ASR che ABCL;
2. Analizzare gli effetti delle variabili sociodemografiche (sesso, età e livello socio-economico) sulla manifestazione dei problemi comportamentali;
3. Valutare la consistenza interna degli strumenti;
4. Analizzare la concordanza tra le valutazioni delle due diverse fonti (eterosomministrazione e autosomministrazione).

La ricerca prevede la distribuzione di 1680 questionari ad un campione di adulti di età compresa fra i 18 e 59 anni residenti nella provincia di Lecco. Il campione sarà selezionato dalle liste elettorali di 13 comuni, selezionati casualmente tra i 90 comuni della provincia di Lecco.

Attualmente è in corso la raccolta dei dati; sono stati distribuiti i questionari in 7 comuni per un totale di 960 questionari. La percentuale di adesione attualmente è molto bassa e si aggira intorno al 35%. Tutti i dati sono da intendersi

come preliminari in quanto la distribuzione e la raccolta dei questionari è attualmente in corso; contemporaneamente per incrementare l'adesione, si stanno effettuando i richiami telefonici per accertarsi dell'arrivo della busta con il questionario, per rendersi disponibili a chiarire dubbi o interrogativi ed eventualmente per sollecitare invio del questionario per coloro che sono interessati alla partecipazione.

LA PERCEZIONE DEGLI OGGETTI NELLO SPAZIO TRIDIMENSIONALE IN BAMBINI AFFETTI DA AUTISMO INFANTILE

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

2011

Polo Scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Avendo precedentemente riscontrato, nei bambini affetti da autismo infantile, una serie di difficoltà nell'orientare le mani in accordo con la posizione degli oggetti, insieme a una programmazione motoria frammentaria (Forti et al., 2011), abbiamo inteso valutare la capacità di questi bambini di rappresentare la tridimensionalità degli oggetti. Infatti, un'incorretta rappresentazione dell'orientamento degli oggetti nello spazio potrebbe avere conseguenze dirette sulla pianificazione motoria (Glover, 2004). Al contrario, qualora non fosse validata l'ipotesi di difficoltà nella rappresentazione della tridimensionalità, i deficit di programmazione rappresenterebbero un disturbo specifico nell'autismo, dunque sarebbero maggiormente evidenti nel caso di sequenze di atti motori (Fabbri-Destro et al., 2009).

Le capacità di rappresentazione tridimensionale sono state valutate in un compito di visual-matching basato sulle caratteristiche spaziali delle immagini. Un gruppo di 11 bambini con autismo tra i 6 e 8 anni è stato confrontato con un gruppo a sviluppo tipico di pari età e genere; ci aspettavamo dunque giudizi meno accurati e prodotti in tempi più lunghi e con un maggior numero di fissazioni oculari nel gruppo clinico. Inoltre, poiché i bambini con autismo possono mostrare un'eccessiva attenzione al dettaglio, a scapito della gestalt globale (Frith, 1989), ci aspettavamo che tali difficoltà fossero maggiormente evidenti per stimoli la cui rappresentazione 3D dipendesse dall'integrazione di forme semplici in un percetto unitario complesso, come oggetti quotidiani e stimoli "greeble" (stimoli complessi ma sconosciuti), rispetto a stimoli rappresentati da un'unica forma primitiva come i solidi geometrici.

I dati hanno invalidato tali ipotesi, poiché non si è riscontrata alcuna differenza né nell'accuratezza, che nei tempi di reazione e nel comportamento visivo

tra i bambini con autismo e i bambini a sviluppo tipico. Soprattutto, non si è riscontrata un'associazione tra il gruppo e la classe di stimolo. Comunque, i nostri dati, creati in un setting naturalistico ed ecologicamente valido in cui non sono stati posti limiti temporali all'analisi degli stimoli, suggeriscono che le limitazioni nel focus attentivo dei bambini con autismo non sono sufficienti per determinare inesattezze nella rappresentazione tridimensionale degli oggetti. Infatti, di fronte a situazioni naturalistiche, sia i bambini a sviluppo tipico, che i bambini con autismo mettono in atto una strategia "locale" efficace.

Di conseguenza, le difficoltà riscontrate nell'orientare le mani in accordo con la posizione degli stessi (Forti et al., 2011), non essendo legate a incertezze nella rappresentazione della tridimensionalità, sono necessariamente legate da problemi nella programmazione del movimento che sono sindrome-specifici (Fabbri-Destro et al., 2009).

Il nostro studio, avendo escluso la possibilità che i difetti riscontrati nelle azioni dei bambini con autismo siano legati a problemi nella percezione dello spazio, permettono di concentrare lo sviluppo della terapia sulla riabilitazione della pianificazione di movimenti e di sequenze di movimenti. Eventuali differenze (inesattezze o prestazioni più accurate) nella rappresentazione della tridimensionalità, andrebbero indagate in situazioni non naturalistiche, in cui i partecipanti verrebbero forzati a produrre giudizi in base alle caratteristiche globali (ad es. limitando i tempi di risposta o diminuendo la salienza delle caratteristiche visive ad es. con immagini degradate).

In conclusione, il nostro studio ci permette di affermare che le differenze nel comportamento dei bambini con autismo legato ad azioni con gli oggetti quotidiani non sono legate a difficoltà a monte nella percezione del mondo circostante, piuttosto dipendono dalle modalità di interazione con la realtà, che possono essere riabilite.

STANDARDIZZAZIONE ITALIANA DELLA SCHOOL FUNCTIONAL ASSESSMENT (SFA)**DR. SERGIO ZANINI**

E-MAIL: SERGIO.ZANINI@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

Centri di Riabilitazione Associazione "La Nostra Famiglia" nelle regioni del Friuli Venezia-Giulia, Veneto, Lombardia

Scuole primarie della regione Friuli Venezia Giulia, Veneto e Lombardia che aderiranno al Progetto di Ricerca

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nel presente progetto di ricerca si è provveduto all'adattamento in lingua italiana (ed al contesto culturale e scolastico italiano) della School Functional Assessment (SFA), una scala di funzionamento del bambino nel contesto scolastico della scuola primaria. La scala permette la caratterizzazione del funzionamento del bambino e la identificazione dei suoi bisogni, specificamente in relazione al contesto ambientale che frequenta. Il linguaggio, e l'impianto teorico della scala, è molto moderno in quanto comparabile con quello dell'ICF. Nel corso del 2011 si è provveduto per la realizzazione dell'adattamento della scala mediante uno studio pilota di verifica della accettabilità della correttezza dell'adattamento, reclutando 8 professionisti (terapisti occupazionali e pedagogisti) che hanno identificato le aree di debolezza della prima versione prodotta. Successivamente, la SFA italiana è stata distribuita in due scuole pubbliche primarie e compilata dagli insegnanti curricolari. Attualmente è ancora in corso la raccolta dei questionari. Parallelamente allo studio normativo, è stato iniziato anche lo studio di validazione clinica. Sono state identificate 14 macrocategorie di condizione clinica disabilitante di pertinenza neuropsichiatrica infantile e sono stati identificati, all'interno della rete di Presidi di Riabilitazione, i pazienti candidati ad essere inclusi nello studio. Anche di questi soggetti sperimentali è ancora in corso la raccolta dei que-

stionari. Completata quindi la raccolta di tutti i questionari, verranno realizzate le analisi statistiche previste secondo il modello statistico adottato (Rasch Measurment Model). In prospettiva futura, la SFA verrà confrontata con gli altri strumenti previsti dalla normativa italiana sulla integrazione scolastica nella disabilità in modo da saggiarne la sua efficacia ed autonomia nel definire gli interventi scolastici necessari a supporto dell'apprendimento nelle condizioni di disabilità neuropsichica.

RAPPRESENTAZIONE NEURALE DELL'ACCESSO SEMANTICO ALLA CONOSCENZA SPECIFICA PER LE PERSONE: STUDI NEUROFISIOLOGICI E NEUROPSICOLOGICI IN BAMBINI E ADULTI

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato

Collaborazioni

Dipartimento di Filosofia, Università degli Studi di Udine

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Il presente progetto di ricerca si proponeva di indagare l'organizzazione neurocognitiva della rappresentazione semantica degli oggetti inanimati, esseri viventi e persone familiari. In particolare, oltre a investigare l'organizzazione delle rappresentazioni semantiche nell'adulto e come questa si degradi in seguito a lesioni cerebrali, si intendeva indagare come queste si sviluppino, in modo da identificare le possibili dissociazioni nel percorso evolutivo delle diverse categorie semantiche. Attraverso studi di Stimolazione Magnetica Transcranica ripetitiva (rTMS) si è dimostrato che le rappresentazioni concettuali delle categorie degli oggetti comuni e delle persone familiari siano realmente rappresentate in settori segregati della corteccia cerebrale: più lateralizzata a destra la conoscenza per le persone familiari, e più a sinistra quella per oggetti comuni. Inoltre, si è visto come anche per le persone familiari valgano regole di rappresentazione cognitiva simili a quelle che regolano l'accesso ai concetti per altri oggetti comuni (ad es: la distanza semantica, manipolata, per quanto concerne le persone note in termini di professione, ma anche la familiarità/frequenza). Nello studio sullo sviluppo delle rappresentazione semantiche si è documentato per la prima volta che le descrizioni semantiche di oggetti prodotte dai bambini di 3 e 4 anni sono, a differenza di quelle degli adulti, chiaramente in linea con le predizioni della Teoria sensoriale-funzionale della rappresentazione semantica: vi è un dominio di informazione sensoriale in percentuale per la categoria degli Esseri viventi e una predominanza di informazione Funzionale per la categoria degli

Esseri non viventi. A partire dai 4 anni vi è un'“esplosione” nella quantità di informazione percettivo-sensoriale prodotta dai partecipanti nel descrivere i concetti di tutte le categorie. Questo porta, al termine del cammino evolutivo, a rappresentazioni semantiche dominate in genere dall'informazione di tipo sensoriale come succede per gli adulti. Lo studio ha, quindi, il merito di riuscire a riconciliare teorie e dati apparentemente contrastanti, seguendo lo sviluppo e la trasformazione delle rappresentazioni semantiche durante tutto il corso dello sviluppo cognitivo del bambino, fino all'età adulta.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini - Laboratorio citogenetica; servizio di neurofisiopatologia; Polo di San Vito al Tagliamento e di Ostuni

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

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 epilessie 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, neuroradiologico. 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.

N/in/sex	DOB	Diagnosi	Risultato
1/ PA/ M	16/02/03	Spettro DS	Normale
2/ BF/ M	7/08/03	Spettro DS	Del 16q23.3-q24.1(82603270-82705098)mat di 101.8 Kb
3/ DV/ F	8/07/00	Spettro DS	Normale
4/ CA/ M	21/06/99	Spettro DS	Normale
5/ CG/ F	26/09/99	EMA	Del Xp22.31pat di circa 1.6 Mb Del 13q32.1mat di circa 126 Kb
6/ PS/ M	27/07/03	EMA	Normale
7/ SA/ F	17/07/03	EMA	Dup15q21.3(52856062X2,52902357-53514442X3,53529844)pat di 612 Kb
8/ BB/M	02/09/98	EMA	Del 16p13.3 (6576379X2,6594295-6727475X1, 6735606X2)mat di 134 Kb
9/MD/M		EMA	Normale

RICERCHE MINISTERIALI CORRENTI 2011 - RISULTATI

10/PG/M	21/11/04	EMA	Del 3p12(85457457X2,85467225-85615568X1,85631467X2)pat di 148 Kb
11/VL/ M	0/03/90	LGS	Normale
12/PF/M		LGS	Del 1p36.33-p36.32(8015556-5053780)X1 de novo
13/PL/M		LGS	Del 1p36.33-p36.32 in corso studio genitori
14/RM/M	03/05/93	LGS	Del2q32.1(182825959X2,182837226-183259060X1,183279239X2)pat di 422 Kb
15/ CG/ F	03/11/05	Celiachia	Normale
16/EHF/F	25/11/00	Celiachia	Normale
17/ SA/M	23/12/03	Spasmi	Normale
18/EIM/ F		Spasmi	Normale
19/SV/ F	17/11/08	Spasmi	Dup 3q13.13mat
20/VF/M	28/09/92	E Focale	Del 18q22.1pat di 44 Kb
21/SC/ F	26/05/93	E Focale	Normale
22/CA/M	23/07/92	E Focale	Dup 22q13.1mat
23/RG/F	14/10/97	E Focale	Del 16p13.3 di circa 1.2 Mb In corso l'analisi sui genitori
24/CR/F 4X180k G4449A 40 kb dup10q22.3q23.2	25/10/97	E Focale	Dup 10q22.3q23.2(80904754X2,81641054-89253592X3,89256027X2)pat di 7.4 Mb
25/ ZG/M	19/10/08	E Focale	Normale
26/ BS/ M	08/03/05	E Focale	Normale
27/ BS/ F	27/03/02	E Focale	Del 18q22.2-q23.3(68400379X2,68476892-70511285X1,70532898X2)mat
28/ ZJ/ F	22/10/98	E Focale	Normale
29/ BS/F			Normale
30/CA/M	28/2/97		Normale
31/MJ/M		E Focale	Del 13q33.2-q34 (106032250X2,106068117-115096411x1,115105738x2) de novo
32/MS/ M		E Focale	Normale
33/FJ/M	03/12/97	E Focale	Dup 4p11(48765032X2,48784236-49063242X3,52689101X2)pat
34/CJ/F		E Generalizza- ta (assenze)	dup (1)(q21.1)pat
35/P/ F		E Generalizza- ta (assenze)	Normale
36/ZF/F		E Generalizza- ta (assenze)	dup 1q21.1-q23.1(145076147x2,145091043-156695586x3,156705388x2) de novo

N= numero; in= iniziali; sex= sesso; dob= data di nascite; M= maschio; DS= sindrome di Dravet; F= femmina; EMA= epilessia mioclono astatica; LGS= sindrome di Lennox-Gastaut; E= epilessia

Commento conclusivo

Sinteticamente, su 36 pazienti analizzati con epilessia criptogenica, 18 presentano alterazioni del CGH array, in particolare 11 delezioni e 7 duplicazione. Di queste 3 sono risultate de novo e quindi quasi con certezza patogenetiche e di conseguenza particolarmente interessanti per la scoperta di nuovi gene inerenti l'epilessia. 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'interno campione di pazienti.

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

DR. SERGIO ZANINI

E-MAIL: SERGIO.ZANINI@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

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. Azienda Ospedaliero-Universitaria, Udine

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

In questo progetto di ricerca si è indagato un aspetto sostanziale della fisiopatologia dell'emicrania nell'adulto e nel bambino/adolescente, ovvero i meccanismi di eccitazione corticale a seguito della somministrazione di uno stimolo somatosensoriale mediante potenziale evocato standard. Sono state analizzate le alte frequenze di oscillazione (HFO), il ciclo di recupero e l'abituazione dopo stimolazione ripetuta prolungata. Sono stati trovati interessanti aspetti di parallelismo fra quanto accade nell'adulto e nel bambino, suggestivi di una fisiopatologia sostanzialmente sovrapponibile. L'analisi delle HFO ha permesso di evidenziare come esse siano strettamente correlate con l'evoluzione clinica del paziente. Tanto maggiormente scompensata è l'emicrania (con aumento della frequenza delle crisi) tanto minori sono le ampiezze delle HFO, espressione di una ridotta capacità di selezione, nel network talamo-corticale, del segnale rispetto al rumore (rapporto segnale/rumore basso nell'input somatosensoriale). Tale fenomeno è associabile ad un eccesso di input somatosensoriale nella corteccia. L'analisi del ciclo di recupero ha permesso di evidenziare come la risposta degli emicranici rispetto ai soggetti sani, sia eccessiva, espressione di una condizione di ipereccitabilità corticale all'input sensoriale. Tale risultato è in linea con quanto evidenziato da precedenti lavori scientifici. Infine l'analisi della abituazione ha permesso di evidenziare come sia i soggetti emicranici che i soggetti normali presentino una

riduzione della risposta corticale a stimolazioni ripetute. Pertanto si è messo in evidenza come l'abituazione non rappresenti un paradigma strumentale adeguato allo studio dei fenomeni di eccitabilità corticale. Questo spiega perché vi sia in letteratura una serie di lavori clinico-sperimentali differenti che hanno sostenuto la presenza di ipoeccitabilità corticale negli emicranici. Tale serie di evidenze, pertanto, era basata su una metodica sperimentale inadeguata per studiare i fenomeni di eccitabilità corticale. Il presente progetto di ricerca ha permesso di caratterizzare pertanto, con metodiche diverse, i fenomeni di eccitabilità corticale nei soggetti emicranici adulti e bambini/adolescenti, che, in progetti futuri, potranno essere utilizzati come monitoraggio, ancora più stringente di quanto possa essere stato possibile realizzare fino ad ora, della correlazione fra evoluzione clinica dell'emicrania e parametri neurofisiologici. Altra ulteriore applicazione clinico-sperimentale potrà essere studiare la modificazione dei parametri neurofisiologici identificati (HFO e ciclo di recupero) a seguito di somministrazione di farmaci utilizzati nella cura dell'emicrania (triptani) o nella prevenzione dell'emicrania (farmaci antiepilettici, betabloccanti, antidepressivi, ecc.).

SINDROMI EPILETTICHE GENETICAMENTE DETERMINATE ASSOCIATE A COMPROMISSIONE NEUROLOGICA: ASPETTI CLINICI, NEUROFISIOPATOLOGICI, GENETICI E NEURORADIOLOGICI

DR. CLAUDIO ZUCCA

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

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Sperimentale

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: UO Neuroriabilitazione 1, Laboratorio di Genetica molecolare e di Citogenetica; CesNE Centro di Neuroimaging dell'Età Evolutiva; Poli di Conegliano: S. Vito al Tagliamento ed Ostuni: Servizio di Neurofisiopatologia

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

La Ricerca Corrente 2008-10 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.

Nel corso del 2010, oltre all'analisi molecolare per l'individuazione di mutazioni in geni che codificano per canali ionici e per altre proteine implicate nell'epilettogenesi, sono state ricercate cause genetiche mediante CGH-array (a-CGH). È stato infatti recentemente dimostrato che grossi sbilanci genomici svolgono un ruolo importante in non meno del 3% dei casi con E. Nel corso della RC 2011 si è proseguito lo studio su queste forme di E aggiungendo ai dati clinici, neurofisiopatologici, di cito-genetica e di genetica molecolare anche quelli neuro-radiologici forniti dalle tecniche di risonanza magnetica avanzate, in particolare RMN encefalo a 3 Tesla.

L'analisi array-CGH whole genome è stata eseguita utilizzando una piattaforma 180k, con risoluzione media di circa 40 kb (kit Agilent 4x180k).

Sono stati effettuati prelievi per indagini genetiche su 41 pazienti, 37 dei quali con indagini neuradiologiche non significative o non specifiche e 3 con malformazioni dello sviluppo corticale (MSC) di sospetta natura genetica, e 10 genitori (di 5 pazienti).

Nella maggior parte dei casi (31 pazienti e 10 genitori di 5 pazienti) è stata effettuata indagine mediante array-CGH.

Sono stati sottoposti a test bio-molecolari 11 probandi, di cui 6 per mutazione di SCN1A, 1 per PCDH19, 1 per LGH, 1 per i geni del recettore dell'Ach (CHRNA4 e CHRNB2). Inoltre 1 paziente affetto da encefalopatia epilettica di natura indeterminata (RMN encefalo non significativa) è stato sottoposto ad indagine per ARX, CDKL5 e STXBP1. Una paziente con quadro di E rolandica atipica (quadro EEG tipo ESES e disturbi neuropsicologici associati) è stata invece sottoposta a ricerca di mutazione nel gene SPRX2. Una paziente sottoposta a test di mutazione per SCN1A è stata sottoposta anche a CGH. Infine i 3 casi con MSC (2 casi di polimicrogiria perisilviana e 1 con quadro complesso tipo lissencefalia con microcefalia, eterotopie sottocorticali, polimicrogiria a prevalenza frontale) sono stati sottoposti oltre che a CGH anche a ricerca per i geni TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, DCX. In un caso con polimicrogiria perisilviana associata ad artrogriposi sono stati indagati anche i geni TRVP4, SPRX2.

I test bio-molecolari per mutazione di SCN1A sono risultati positivi in 3 casi per polimorfismi silenti o per varianti rare senza sicuro significato patologico, mentre 1 caso è risultato negativo e 2 sono in corso. Il test per mutazione di PCDH19 è risultato negativo, come anche il caso di epilessia rolandica atipica sottoposto alla ricerca di mutazione in SPRX2. I geni TUBA1A, TUBB2B sono finora risultati negativi nei pazienti esaminati, come anche DCX è negativo in 2 dei 3 pazienti indagati (manca ancora l'esito di uno dei due pazienti con polimicrogiria).

Nei pazienti sottoposti ad analisi mediante a-CGH i risultati sono stati i seguenti:

- 2 positivi de novo (per delezione a livello di 1q44) con associata un'anomalia ereditata (dalla madre in entrambi i casi).
- 5 positivi per alterazioni non dimostrate de novo: in 2 caso ereditata dalla madre; in 2 casi non è disponibile l'esito dei genitori, in 1 caso è in corso l'analisi sui genitori.
- 22 negativi (inclusi i 3 pazienti con MSC)
- 2 in corso

In 5 casi è stata eseguita RMN encefalo a 3T: 4 casi sottoposti a CGH, con esito negativo in 3 e positivo in 1, e 2 casi sottoposti a ricerca di mutazione genica, di cui 1 in SCN1A (rilevati solo polimorfismi silenti) e 1 in CHRNA4 e CHRNB2 (in corso). L'indagine neuroradiologica è risultata nella norma in entrambi i casi sottoposti a ricerca di mutazione genica. Nei casi invece con CGH negativa la RMN encefalo è risultata nella norma solo in un caso (con epilessia focale ed IM media), mentre negli altri due (uno con epilessia focale

ed IM lieve, l'altro con epilessia focale ed IM media) sono stati rilevati reperti "aspecifici": lieve asimmetria degli ippocampi in un caso e minima atrofia emisferica cerebellare nell'altro caso.

Nel caso risultato positivo alla CGH (F.C.) la RMN encefalo a 3T ha consentito di studiare meglio una lesione, in sede fronto-basale sinistra, già individuata in esami precedentemente eseguiti con tecnica convenzionale: la lesione è stata trovata di dimensioni complessivamente immutate e l'interpretazione è stata di possibile piccolo esito cistico.

Riguardo ai dati di a-CGH si conferma l'esiguità di casi con anomalie de novo e la non facile interpretazione del dato genetico alla luce di fenotipi diversi con la medesima anomalia genetica.

La percentuale di positività delle varianti "rare" viene riportata in letteratura attorno a 9%.

Riguardo all'apporto della RMN a 3 T va tenuto presente ancora una volta il numero ristretto dei casi studiati. I dati ottenuti non hanno consentito di far luce sull'eziologia nei casi con CGH negativa e non hanno mostrato anomalie nei casi con sospetta canalopatia. Nel caso infine con CGH positiva de novo e precedente esame neuroradiologico positivo, l'esame a 3T ha fornito un contributo nel definire meglio la lesione focale già individuata in precedenza anche se non appare specifica nell'inquadramento sindromico. Come già rilevato in uno studio comparativo tra RMN 3 T e 1.5 T nell'epilessia parziale refrattaria, il contributo della nuova tecnica è limitato a pochi casi: nello studio citato i casi presentano sclerosi ippocampale.

Complessivamente confermiamo l'utilità di eseguire l'a-CGH tutte le volte che un paziente, affetto da E criptogenica associata ad insufficienza mentale ed eventuali anomalie congenite, sia risultato negativo alle analisi citogenetiche convenzionali.

Date le caratteristiche della casistica afferente al nostro Istituto, contiamo di proseguire con questo tipo di indagine genetica, insieme all'utilizzo di tecniche di neuroradiologia più sofisticate (RMN encefalo a 3T e RMN funzionale combinata all'EEG), per ridurre il più possibile la quota di E ad eziologia sconosciuta.

STUDIO CLINICO-NEUROFISIOLOGICO DEI FENOMENI EPILETTICI NEL SONNO IN SOGGETTI CON DISABILITÀ DELLO SVILUPPO

DR. ANTONIO TRABACCA

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

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e
Sperimentale

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Ostuni

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Epilessia e disturbi del sonno sono considerati da molti come “compagni di letto”. Disturbi del sonno frequentemente coesistono nei pazienti con epilessia. Ben poca però è la letteratura esistente sull'interazione reciproca tra epilessia e problemi del sonno nella popolazione pediatrica. Secondo un sondaggio effettuato tramite questionario, la prevalenza di disturbi del sonno soggettivamente riportata tra gli adulti con epilessia (39%) è risultata significativamente più alta rispetto ai controlli (18%). Non essendoci molti studi mirati, è presumibile che la prevalenza dei disturbi del sonno nei bambini con epilessia sia sotto-stimata. In generale, è noto che i bambini con epilessia sperimentano alterazioni nel sonno nella sua totalità, nell'architettura del sonno, nella latenza del sonno e in risvegli spontanei con una maggiore incidenza di frammentazione del sonno e sonnolenza diurna. L'eziologia dei disturbi del sonno nei bambini con epilessia è multifattoriale e include fattori quali l'epilessia di per sé, la frequenza delle crisi e l'effetto di farmaci anti-epilettici. Le scariche sull'EEG possono influenzare l'apprendimento ed il sonno, anche in assenza di crisi cliniche o subcliniche. La privazione del sonno e/o disturbi del sonno influenzano i meccanismi neurochimici e neurofisiologici importanti per il processo di apprendimento-memoria, ma influenzano anche l'espressione delle scariche parossistiche sull'EEG e delle crisi epilettiche. Epilessia e parossismi all'EEG possono influenzare la struttura del sonno ed interferire con le funzioni fisiologiche ad esso sottese. Il nostro studio si propone di valutare a livello clinico e neurofisiologico una popolazione di soggetti affetti da disabilità dello sviluppo allo scopo di valutare l'organizzazione del sonno notturno, in senso qualitativo e quantitativo, attraverso un monitoraggio polisonnografico, e di caratterizzare i fenomeni parossistici che

si verificano durante il sonno, per poter identificare eventuali caratteristiche comuni rispetto alla disabilità di base o al tipo di epilessia. Sono stati arruolati 9 pazienti con grado di disabilità motoria o psicologica variabile, con associata o meno epilessia e disturbi del sonno, giunti in osservazione presso l'UOC di Neuroriabilitazione 1 (Neuropatologia e Riabilitazione funzionale) dell'IRCCS "E. Medea" di Brindisi, dove sono stati sottoposti a iter diagnostico, follow-up clinico-funzionale e, ove indicato, trattamenti riabilitativi in ambito multidisciplinare. Il campione è formato da 6 maschi e 3 femmine. Dei 9 bambini arruolati tutti presentano all'EEG anomalie parossistiche ma solo 7 epilessia in atto o pregressa, in 2 è di tipo generalizzato, nei restanti 2 parziale con o senza generalizzazione secondaria. La disabilità evidenziata nei soggetti è risultata essere in relazione a paralisi cerebrale infantile - PCI - (1 con forma unilaterale e disabilità intellettiva moderata e 2 con forma bilaterale e disabilità intellettiva grave), sindrome dismorfofenetica (2 soggetti con Developmental Coordination Disorder - DCD, 1 con disabilità intellettiva lieve e 1 con disabilità intellettiva moderata) ed epilessia (4 soggetti di cui 1 pz con associato disturbo di linguaggio, 1pz con DCD ed 1pz con disturbo dello sviluppo psicologico). Dalla valutazione delle polisonnografie dei soggetti in studio si osserva che la macrostruttura che accomuna la maggior parte dei sonni è abbastanza stabile con prevalenza di sonno ad onde lente e pochi risvegli. Sebbene l'analisi macrostrutturale indica la presenza di sonno ristoratore, la microstruttura la smentisce in quanto sono presenti numerosi arousals, anomalie puntute/lente ed eccessiva presenza di CAP3 (anomalo data l'età dei pz) che ne fa un sonno frammentato e instabile. Dalla valutazione dei questionari somministrati ai genitori emerge globalmente la percezione di una buona qualità del sonno in tutti i soggetti con solo qualche eccezione per singoli item. Effettuando però un'analisi caso per caso, solo in 3 soggetti sui 9 esaminati, il dato qualitativo riscontrato all'EEG coincide in maniera diretta con quello percepito dal genitore. Confrontando poi la qualità del sonno emersa dall'analisi dei tracciati EEG con quanto percepito dai genitori sulla base dei questionari somministrati, emerge una discordanza sia in senso positivo che negativo tra i dati rilevati. I dati raccolti ad oggi sono preliminari. A causa dell'esiguità del campione al momento non è possibile trarre dei dati utili e significativi. Per tale motivo l'obiettivo della continuazione dello studio è certamente quello di ampliare la casistica, cercando di giungere a sottocampioni significativi di casistica differenziati per tipologia di disabilità dello sviluppo, tali da permettere di identificare pattern polisonnografici peculiari, valutare i rapporti tra sonno e epilessia e valutare come eventuali pattern polisonnografici alterati possono influenzare lo sviluppo di un bambino con disabilità.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: Laboratorio di biologia molecolare; Servizio di neurofisiopatologia; 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

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

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 mitocondriali 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 delle ricerche correnti dell'anno 2009/2010. 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. Studi in un modello murino (topo overesprimente DRP1 a livello muscolare) hanno confermato questa evidenza anche in vivo, dimostrando un deficit funzionale del muscolo scheletrico in conseguenza dell'alterato processo di fissione mitocondriale. 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 mitocondriali. 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 nell'anno 2010 è stato il chiarire il significato fisiopatologico ed i meccanismi molecolari alla base del difetto mitocondriale nelle patologie degenerative neuromuscolari evidenziando un ruolo importante di NO nel controllo della bioenergetica con conseguenze rilevanti anche sul differenziamento miogenico e sugli aspetti funzionali riparativi rigenerativi. Nel 2011 si è pertanto deciso di approfondire ulteriormente aspetti rilevanti del ruolo di NO nel processo miogenico indagando quali meccanismi correlari potessero influenzare o essere co-responsabili dell'azione del mediatore gassoso a fianco del suo ruolo nella bioenergetica.

CARATTERIZZAZIONE DEL PROCESSO DI AUTOFAGOCITOSI NELLA DEGENERAZIONE MOTO NEURONALE IN FORME DI PARAPARESI SPASTICA E SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA

DR.SSA MARIA TERESA BASSI

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

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: Unità di farmacologia clinica; Ospedale Maggiore Policlinico, Clinica Neurologica, Università di Milano Unità di Farmacologia Clinica, Ospedale Sacco Univ. di Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

In questo progetto si è iniziata la caratterizzazione del processo dell'autofagocitosi in due esempi di malattie moto neuronali, una forma famigliare di SLA ad esordio in età giovane-adulto e adulta, denominata ALS11 e una forma di paraparesi spastica recessiva con esordio in età pediatrica. L'autofagocitosi è un processo di auto-degradazione delle cellule eucariotiche essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Questo processo, in condizioni basali, permette alla cellula di degradare i suoi organuli danneggiati e le proteine più longeve, inoltre viene attivato in caso di privazione di sostanze nutritive o in risposta alla carenza dei fattori di crescita. Dato il coinvolgimento di questo processo in diversi processi degenerativi sia neuronali sia muscolari, l'interesse nei confronti dell'autofagia e di un suo sottotipo particolare, la mitofagia (degradazione dei mitocondri danneggiati) sta progressivamente aumentando. I dati qui ottenuti per FIG4 indicano che il silenziamento di Fig4 nei neuroni porta ad un aumento significativo del numero di vescicole LC3- e p62-positive e quindi un aumento degli autofagosomi nel citosol anche in assenza di induzione di autofagocitosi. Questo conferma quanto osservato nei fibroblasti del topo knockout in cui l'accumulo degli autofagosomi deriva da un blocco dell'autofagocitosi e da un problema di recycling degli endosomi. Si può quindi supporre che i difetti nella formazione del neurite osservati silenziando Fig4 possano derivare dall'accumulo di autofagosomi nei neuroni. A conferma, l'overespressione di Fig4 non determina alterazioni dell'autofa-

gocitosi e non altera la formazioni del neurite.

Per quanto riguarda spastizina, il suo silenziamento determina una riduzione significativa nella lunghezza del neurite rispetto al controllo analogamente a quanto osservato per senataxina e come per FIG4 il silenziamento della spastizina determina un aumento dei livelli di LC3-RFP e p62. Il silenziamento della spastizina determina un incremento degli autofagosomi già in assenza di induzione a cui fa seguito un maggiore accumulo di autofagosomi nel citosol rispetto al controllo quando l'autofagocitosi viene indotta. L'aumento degli autofagosomi nel citosol dei neuroni potrebbe essere la causa dei difetti osservati nella formazione del neurite o della sua degenerazione.

DELEZIONI CROMOSOMICHE TERMINALI: STUDIO DEL MECCANISMO MOLECOLARE E IMPATTO SUL FENOTIPO

DR.SSA MARIA CLARA BONAGLIA

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

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: 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 DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

In questo progetto abbiamo utilizzato delezioni che coinvolgono la regione cromosomica 22q13, che rappresenta una causa importante di patologia umana essendo associata alla sindrome di Phelan/Mcdermid (PMS, MIM #606232), come modello di studio dei meccanismi molecolari che generano delezioni cromosomiche terminali. Abbiamo caratterizzato a livello molecolare riarrangiamenti genomici in 44 pazienti non correlati con monosomia 22q13 che risultano in delezioni semplici terminali (72%), ring 22 (14%), traslocazioni sbilanciate (7%) e delezioni interstiziali criptiche (9%). Abbiamo determinato il punto di giunzione in 29 casi, fornendo una quadro reale di una varietà di meccanismi alla base di delezioni non-ricorrenti e di riparo dei terminali cromosomici. La sintesi de novo e la cattura del telomero sono i meccanismi utilizzati per riparare le delezioni terminali; non-homologous end-joining o microhomology-mediated break induced replication è probabilmente il meccanismo coinvolto nella formazione dei ring 22 e traslocazioni; non-homologous end-joining e fork stalling and template switching sono i meccanismi prevalenti nella formazione delle delezioni interstiziali. Per la prima volta abbiamo dimostrato che eventi di stabilizzazione distinti allo stesso terminale cromosomico possono verificarsi in differenti cellule embrionali, dimostrando che le delezioni terminali possono avere un'origine mitotica. Infine, il progressivo deterioramento clinico che emerge dall'analisi della storia

clinica longitudinale in tre pazienti adulti con PMS ultra quarantenni supporta l'ipotesi che l'aploinsufficienza di SHANK3 possa avere un ruolo nel deterioramento neurologico, in aggiunta al suo ruolo nel fenotipo comportamentale della PMS.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: Laboratorio di Biologia Molecolare

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Analisi dell'espressione di D-setx nei mutanti loss of function

Per analizzare i diversi stadi di sviluppo nei mutanti loss of function a nostra disposizione (mutante $W^{1118};Mi \{ ET1\}CG7504^{MB04533}$, nelle linee 3, 7, 5 e 41 generate da escissione imprecisa dell'elemento P $W^{1118};Mi \{ ET1\}CG7504^{MB04533}$) sono state generate delle linee di drosophila ricombinanti: linee UAS-Mcd8GFP sono state incrociate con drivers specifici per diversi sottotipi neuronali per produrre ricombinanti stabili. Questo per permettere di capire dove sia espressa la proteina D-setx a livello neuronale.

Generazione di Drosophile ricombinanti per lo studio dei sottotipi neuronali

Il fenotipo dovuto a una mancanza di D-senataxina risulta di difficile quantificazione perciò sono state create delle linee di drosophila contenenti drivers neuronali, linee UAS-mc8GFP e l'allele mutante loss of function. Questo ha permesso di esprimere nell'animale mutante una proteina di membrana fusa con la GFP (mcd8GFP) sotto il controllo di promotori neuronali diversi. Tale esperimento renderà più facile l'analisi dei fenotipi associati alla mancanza della proteina perché non serviranno anticorpi per la caratterizzazione del tessuto neuronale.

Interattori genetici

Le linee transgeniche generate per regolare negativamente i trascritti di D-setx sono state testate con diversi drivers e i fenotipi scelti per l'interazione

genetica sono quelli a carico dell'ala dell'adulto.

L'espressione di linee UAS-RNAi per D-setx con il drivers MS-Gal4 e PTC-gal4, due linee che esprimono in compartimenti diversi dell'ala, mostrano fenotipi di degenerazione tissutale simili a quelli riscontrati in modulatori trascrizionali (notch, Su(H), *espl*) e proteine che regolano la cromatina come ASF1. Le linee ricombinanti così ottenute sono state utilizzate per individuare interattori genetici nel metabolismo dell'RNA e della riparazione del DNA e infine nel rimodellamento della cromatina. Le linee ricombinanti UAS-RNAi-D-setx; PTC-gal4 sono linee che permettono di regolare negativamente i trascritti di D-setx nell'ala in modo continuo. Incrociando questi individui a temperatura costante di 28°C (per mantenere un'espressione alta del transgene UAS-RNAi) con individui mutanti coinvolti in diversi pathways biologici sono stati osservati interazioni con i seguenti alleli mutanti: *Lid*¹⁰⁴²⁴; *Lid*^{k06801}; *Vtdl*⁴, ASF1; *Rpd3*; *Sin3A*; *OSA*².

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
2011

Tipo di ricerca
Corrente

Polo Scientifico
Conegliano e Pieve di Soligo

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nel corso del secondo anno di questa ricerca abbiamo sfruttato i reagenti genetici precedentemente generati per esaminare se i difetti fenotipici prodotti nel motoneurone per l'assenza di Marf, l'omologo di Drosophila della mitofusina 2 umana responsabile della malattia di Charcot-Marie-Tooth, possano essere correlati alla patofisiologia di Charcot-Marie-Tooth. Avendo osservato che la deplezione di Marf in Drosophila risulta nella quasi totale assenza di mitocondri dalla sinapsi neuromuscolare, abbiamo analizzato la motilità e quantità di mitocondri lungo l'assone del motoneurone in vivo. Abbiamo così osservato che il numero dei mitocondri stazionari nell'assone degli individui in cui l'espressione di Marf è stata ridotta mediante RNAi, risulta significativamente maggiore che negli individui di controllo. Negli stessi individui le velocità di movimento dei mitocondri risultano essere notevolmente inferiori rispetto ai controlli. Inoltre la densità mitocondriale lungo l'assone mostra un gradiente prossimo-distale che non è riscontrabile nei controlli. Questa rarefazione distale dei mitocondri è in accordo con l'osservazione che i mitocondri sono pressoché assenti nella terminazione neuromuscolare. Nel loro insieme questi risultati suggeriscono che il meccanismo patogenetico alla base di CMT2A potrebbe essere legato a difetti di distribuzione mitocondriale negli assoni.

RUOLO DEL GENE BRIP1 (FANCJ) 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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Esperimenti preliminari su linee cellulari hanno confermato la possibilità di misurare un aumento della frequenza di riarrangiamenti in 22q13 in portatori di mutazioni del gene BRIP1 e anemia di Fanconi.

Abbiamo allargato il campo di indagine a linee cellulari portatrici di mutazioni in altri geni coinvolti nella patogenesi dell'anemia di Fanconi (e quindi nel pathway di riparazione dei danni da rotture cromosomiche) in modo da evidenziare la eventuale specificità di ogni gene rispetto a tipi diversi di strutture del DNA. Sono state testate due traslocazioni ricorrenti t(11;22) e t(8,22) e una delezione terminale ricorrente 22q13. Tali traslocazioni ricorrenti sarebbero mediate da sequenze palindrome invertite che rappresentano porzioni di genoma instabili in cui i filamenti di DNA sono più propensi ad assumere conformazioni tali da causare rotture a doppio filamento.

Non è stata riscontrata alcuna specifica variazione della frequenza di alcuno dei riarrangiamenti analizzati nelle linee linfoblastoidi o nei fibroblasti di pazienti con sindrome di Bloom, Werner o Fanconi rispetto alle linee linfoblastoidi e ai fibroblasti di controllo.

In questo ultimo anno della Ricerca intendiamo utilizzare le nuove possibilità metodologiche offerte dai sistemi di sequenziamento di nuova generazione per esaminare in dettaglio la frequenza e localizzazione delle rotture cromosomiche alla base dei riarrangiamenti costituzionali in linee cellulari portatrici di mutazioni in geni coinvolti nel pathway di riparazione dei danni da rotture cromosomiche.

IL GRID A SUPPORTO DELLA RICERCA IN RISONANZA MAGNETICA**ING. GIANLUIGI RENI**

E-MAIL: GIANLUIGI.RENI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 6

Bioingegneria

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: CesNE Centro di Neuroimaging dell'Età Evolutiva

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

L'IRCCS E. Medea opera con la sua risonanza 3T all'interno di un network internazionale di centri attivi nello studio delle immagini neuroradiologiche, con particolare specificità nel campo dell'età pediatrica.

Per favorire l'interazione tra l' IRCCS Medea e gli altri enti appartenenti al network e nello stesso tempo per fronteggiare il fenomeno del "data deluge", che assume rilevanza significativa quando si opera con immagini neuroradiologiche, è stato indagato il ruolo che può giocare la tecnologia GRID nei molteplici aspetti di storage ed elaborazione di bio-immagini.

Sono stati messi in campo due collegamenti in fibra ottica, ridondati su percorsi diversi, che collegano il Centro Studi di Neuroimaging dell'Età evolutiva del Medea alla rete GARR con una velocità di 100Mbit.

L'infrastruttura GRID richiede per sua natura l'identificazione univoca degli utenti che vi accedono.

Generalmente tali utenti sono già definiti e profilati all'interno dei domini appartenenti alle strutture in cui essi prestano servizio, ma per non ridondare le operazioni di identificazione dell'utente e la successiva opera di manutenzione, le risorse GRID sono state interfacciate con una "Infrastruttura di autenticazione ed autorizzazione" (AAI) denominata IDEM ((IDEntity Management per l'accesso federato), supportata da GARR.

Per quanto concerne la conservazione e la trasmissione delle neuroimmagini è stato impiegato un software open-source attraverso il quale è stato possibile allestire un server dedicato basato su protocollo DICOM. Il server permette

di raccogliere, organizzare e conservare i dati neuroradiologici, fungendo da punto di snodo da e verso tutte le stazioni presenti nella neuroradiologia dell'IRCCS, dalla macchina per il controllo del dispositivo a risonanza magnetica alla stazione di refertazione, alla stazione di masterizzazione e così via.

Il software di Electronic Health Record che gestisce la maggior parte dei dati clinici del paziente, sviluppato internamente all'IRCCS e diffuso in tutti i reparti, è stato implementato per poter consultare le immagini conservate nel server predisposto in precedenza.

È stato messo a punto un disegno per la creazione di una piattaforma di database di immagini neuroradiologiche di soggetti in età pediatrica, distribuita tra diversi centri di eccellenza. È prevista la creazione di diversi database di case studies di interesse (casi atipici, malattie rare, sindromi) a scopo formativo e di consultazione e la messa a punto di un atlante di riferimento per i soggetti normali relativi a diverse fasce di età.

La piattaforma è il naturale sviluppo dell'infrastruttura sperimentata in questo progetto e sarà facilmente espandibile ad altri centri clinici di eccellenza nazionale e ad aziende ospedaliere.

Tra le molteplici patologie trattate presso il CESNE vi è la sindrome da ipoventilazione centrale congenita (CCHS). Si tratta di una malattia rara del sistema nervoso autonomo che comporta principalmente un mancato controllo del respiro da parte dell'encefalo. I soggetti affetti da tale patologia rischiano quindi di incorrere in un'ipossia che può condurli alla morte, in particolar modo durante il sonno. Durante la veglia, invece, nella maggior parte dei casi la respirazione è normale o comunque efficace. Nell'ambito di un filone collaterale di ricerca è stato realizzato un dispositivo hardware in grado di sollecitare il paziente per stimolare una ripresa della respirazione. Il dispositivo è oggetto di domanda di brevetto.

IDENTIFICAZIONE E STUDIO DI REGIONI SOTTOPOSTE A SELEZIONE NATURALE NEL GENOMA UMANO, CARATTERIZZAZIONI DI VARIANTI FUNZIONALI E ASSOCIAZIONE CON FATTORI FENOTIPICI

DR.SSA MANUELA SIRONI

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

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano; Centro Dino Ferrari, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli and Regina Elena; Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, LITA, Segrate – Università degli Studi di Milano; IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don C. Gnocchi, Milano; Laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie, IRCCS Don C. Gnocchi; Dip. Scienze e Tecnologie Biomediche, Università Studi di Milano; Genes and Disease Program, Center for Genomic Regulation, Barcellona

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nel corso di questo secondo anno di attività abbiamo ampliato e approfondito l'utilizzo di strumenti di genetica di popolazione per identificare i geni che sono stati sottoposti a selezione e che contengono varianti funzionali. Infatti, 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 risposta immunitaria e nel pathway della coagulazione e fibrinolisi. Sono stati analizzati specificamente i seguenti geni: RAC2, SNAP25, SELP/SELL/SELE. 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 inoltre valutato se le varianti

sottoposte a selezione e localizzate in questi geni potessero rappresentare alleli di suscettibilità per malattie autoimmuni o tratti fenotipici complessi. Abbiamo ottenuto evidenze di associazione tra varianti in RAC2 e predisposizione a sclerosi multipla. Inoltre un aplotipo in RAC2 è significativamente associato a morbo di Crohn. Inoltre abbiamo dimostrato come una variante in SNAP25 moduli le capacità verbali in soggetti di sesso femminile.

Abbiamo inoltre svolto analisi a livello genome-wide o sui ampie famiglie geniche (geni per gli interferoni) al fine di identificare il pattern evolutivo e le pressioni selettive che hanno contribuito a modellare la diversità genetica nelle popolazioni umane e, infine, di identificare putative varianti funzionali in geni di risposta antivirale e di valutare la capacità di tali polimorfismi di alterare la suscettibilità all'infezione trasmessa da HIV. In particolare, abbiamo studiato i geni TLR3 e APOBEC3H, entrambi coinvolti in processi centrali per la risposta antivirale intrinseca. Siamo stati in grado di dimostrare come un polimorfismo comune e nonsinonimo in TLR3 e un aplotipo di APOBEC3H favoriscano la resistenza all'infezione da HIV.

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano; Centro Dino Ferrari, IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli and Regina Elena; Dipartimento di Fisica Teorica - Università di Torino; MRC Laboratory of Molecular Biology, University of Cambridge

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

La possibilità di predire pattern di splicing in modo tessuto specifico tenendo conto del maggior numero possibile di elementi regolatori (anche tessuto specifici) e di fattori di conformazione dell'RNA (struttura secondaria) rende possibile l'interpretazione del possibile ruolo patogenetico di mutazioni che altrimenti sarebbero considerate neutre. Nel corso dell'anno 2011, l'attività relativa a questo progetto ha portato a conclusione la parte preliminare dello studio giungendo alla completa definizione di un algoritmo per l'identificazione di motivi regolatori tessuto specifici tenendo in considerazione sia il loro posizionamento rispetto agli esoni di un trascritto, sia facoltativamente della struttura secondaria del frammento di RNA in cui si trovano o del grado di conservazione interspecifica della sequenza. Parallelamente è stato aggiornato il database di mutazioni estendendone la funzionalità alla rappresentazione di qualsiasi risultato di NGS. L'attività principale è stata la messa a punto di un complesso sistema computazionale che integra tutti gli strumenti sin qui sviluppati, sia negli anni scorsi che in parte durante quest'ultimo anno. Il sistema consente di sperimentare diversi modelli per la predizione dello splicing utilizzando di volta in volta diversi set di dati di partenza. Sulla base di queste scelte vengono identificati i parametri migliori del modello, ovvero quelli che danno i migliori risultati su un set di dati. Al tempo stesso il sistema consente poi di applicare il modello a nuovi dati e, in particolare, a quelli de-

rivanti sia da sequenze di riferimento sia mutate consentendo il confronto dei risultati e dunque l'inferenza sul ruolo funzionale delle mutazioni. Il prossimo anno il sistema verrà utilizzato su di un gran numero di mutazioni note per una sua definitiva validazione (nonché per mettere a punto i modelli più efficaci per le diverse patologie, ad esempio variando il tessuto e dunque gli elementi regolatori considerati). Verranno compiuti esperimenti pilota di RNA-seq e il sistema verrà utilizzato anche per il filtraggio dei risultati di questi esperimenti, un'applicazione non inizialmente prevista ma che potrebbe avere importanti ricadute nell'utilizzo di queste nuove tecnologie di sequenziamento.

STUDIO DEL PATTERN SELETTIVO DI GENI DI RISPOSTA ANTIVIRALE FINALIZZATO ALL'IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI DI SUSCETTIBILITÀ ALLA SCLEROSI MULTIPLA

DR.SSA MANUELA SIRONI

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

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Prof. Giacomo P. Comi (Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università degli Studi di Milano; IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli and Regina Elena); Prof. Mario Clerici (Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, LITA, Segrate – Università degli Studi di Milano; IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don C. Gnocchi, Milano); Dr.ssa Franca Rosa Guerini (Laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie, IRCCS Don C. Gnocchi)

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Negli scorsi anni di attività abbiamo applicato approcci che prevedono 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. Durante uno studio genome-wide volto all'identificazione di varianti geniche sottoposte a pressione selettiva esercitata da virus, abbiamo notato che esiste un overlap tra geni di suscettibilità a sclerosi multipla (SM) e geni che portano varianti selezionate da virus. Durante questo primo anno di attività abbiamo applicato un approccio di genetica di popolazione per lo studio di geni e famiglie geniche che presentano varianti selezionate dai virus e che potrebbero essere di predisposizione o protezione a SM.

L'applicazione di questa strategia ha permesso di identificare forti evidenze di selezione bilanciante in 3 geni: OAS1, un gene di risposta antivirale che conferisce suscettibilità a SM, RAC2 il cui prodotto proteico regola diversi processi fondamentali nella risposta immune e infiammatoria e ZC3HAV1 che codifica per una proteina antivirale.

Per ciascun gene abbiamo identificato la potenziale variante funzionale che è stata analizzata in un'ampia popolazione di soggetti SM e nei rispettivi controlli. In particolare abbiamo identificato nel gene OAS1 una variante di inserzione/delezione nell'esone 7, tale variante è associata a suscettibilità alla malattia per il modello allelico con l'allele deleto predisponente a SM.

La regione genica di RAC2 comprendente il 3' UTR è stata sottoposta a selezione bilanciante multiallelica e nelle popolazioni umane sono presenti 3 aplogruppi principali; gli aplotipi derivanti da una di queste cladi sono stati associati con un' aumentata suscettibilità a SM e a un'insorgenza precoce della malattia. Forti evidenze di selezione bilanciante sono presenti nell'intorno della variante Thr851Ile che localizza nell'ultimo esone codificante di ZC3HAV1. Lo studio caso-controllo di circa 1000 individui italiani indica che tale variante Thr851Ile è significativamente associata a suscettibilità a sclerosi multipla; il dato è stato confermato su un'ampia casistica di 4416 soggetti sardi.

I dati ottenuti indicano che l'approccio da noi proposto che prevede l'utilizzo di metodiche di genetica di popolazione è strumentale all'identificazione di regioni geniche target di selezione e di conseguenza di polimorfismi funzionali con effetto sul tratto fenotipico, permettendo l'identificazione di nuovi potenziali target terapeutici nelle malattie autoimmuni.

DETERMINAZIONE DEL COSTO STANDARD PER PERCORSI RIABILITATIVI**ING. DAMIANO RIVOLTA**

E-MAIL: DAMIANO.RIVOLTA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 8

Organizzazione dei servizi sanitari

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Centri di riabilitazione Associazione “La Nostra Famiglia” di Bosisio Parini e Ponte Lambro; Settore Organizzazione - Ufficio Pianificazione e Controllo Associazione “La Nostra Famiglia”

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

I sistemi tariffari in vigore per l'attività riabilitativa in ambito extra-ospedaliero svolta in regime di ciclo diurno continuo prevedono la remunerazione delle giornate di terapia indipendentemente dal piano riabilitativo adottato e dalla logistica necessaria per le specifiche categorie di utenti. Ciò ha indotto lo sviluppo di sistemi di analisi dei costi orientati al calcolo dei costi “per giornata”. Tale approccio, seguito anche nella realtà oggetto di questa esperienza, ha mostrato la sua parziale capacità di supportare processi gestionali per quanto riguarda il governo dei costi e il governo del mix di attività in considerazione dei diversi assorbimenti delle risorse stesse.

L'analisi secondo la metodologia ActivityBasedCosting ha consentito di ricostruire e misurare le attività che determinano il costo delle classi di “prodotti” riabilitativi significativi in termini assistenziali. Tali informazioni hanno consentito il miglioramento del processo di controllo strategico e direzionale dell'azienda. Si ritiene che il modello operativo di rilevazione ed elaborazione delle informazioni di costo adottato sia riproducibile in altri contesti assistenziali per contribuire ad una efficace integrazione tra scelte cliniche, organizzative ed economiche.

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@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: Laboratorio di Citogenetica; Laboratorio di Biologia Molecolare; Ingegneria Biomedica; Laboratorio di Bio-Informatica; Laboratorio di Neurofisiologia clinica; Neuroriabilitazione 1; Neuroriabilitazione 2; Neuroriabilitazione 3; Organizzazione dei servizi sanitari, Ing. Rivolta Hospital Necker, Department of Pathology, APHP, Dr. F. Jaubert Pediatric Storage Disorders Laboratory, King's College London, Dr. J. Cooper LLR CCLG Childhood Leukaemia Cell Bank, Epidemiology and Genetics Unit, University of York, Mrs. A. Thomson Tissue Bank Support and Education Children's Cancer and Leukaemia Group, University of Leicester, Dr. G. Jenner, Children University Hospital Charité Berlin and Epidemiology Unit, Prof. K. Minden Pediatric Molecular Genetics Laboratory, University of Szeged, Dr. E. Endreffy Department of Epidemiology, Maastricht University, Dr. C. Thijs Department of Pediatrics & Dept of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Dr. Linda van den Berg University of Copenhagen, Department of Public Health, Prof. L. Knudsen Rare Diseases Research Institute, Instituto de Salud Carlos III, Dr. M. Posada SWISSIBD Cohort Study, Institute of Social and Preventive Medicine, Dr. V. Pittet Ospedale S. Giovanni, Bellinzona, Division of Pediatrics, Dr. G. Ramelli Service of Medical Genetics, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Dr D. Martinet IRCCS Ospedale B. Garofolo, Unit of Genetics, Prof. Gasparini DNA Biobank from patients affected by Genetic Diseases, Dr. M. Filocamo Ospedale Meyer, Health Direction Unit, Dr. Monica Frassinetti, Dr. F. Bambi Bio-REP s.r.l., Ing. P. De Blasio IRCCS Ospedale "C. Mondino" Istituto Neurologico, Laboratorio di Genetica, Dr C. Cereda Istituto Superiore di Sanità, CNESPS, Dr. M. Stazi, Dr. V. Toccaceli, Dr. L. Nisticò, Dipartimento di Fisiopatologia Clinica, Università Degli Studi di Firenze, Costanza Sagrinati

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Nell'anno 2011 il progetto ha completato la sua fase attuativa che si è arti-

colata nella revisione dell'articolo che ha descritto lo studio condotto e che è stato accettato per pubblicazione sulla rivista "Biopreservation and Biobanking", sul cui sito è disponibile la versione "ahead of print", mentre la pubblicazione online sarà nel corso di Febbraio 2012.

Nel contempo è stato scritto e pubblicato, sempre nell'ambito del biobanking pediatrico, l'articolo "The timing of umbilical cord clamping. Some ethical reflections", edito da Nova Publisher, già disponibile come pubblicazione in versione online.

Rispetto allo sviluppo di una Raccomandazione dedicata agli aspetti etici e regolatori del biobanking pediatrico, si è aderito al gruppo di lavoro europeo di sviluppo di tale documento, promosso dalla European Society of Human Genetics e affidato per l'elaborazione al gruppo Community Genetics dell'Università di Amsterdam, in collaborazione con il centro di Bioetica dell'Università di Leuven.

Si è partecipato ai lavori per la stesura della Recommendation, la cui elaborazione completa è attesa per giugno 2012 e la cui pubblicazione è prevista per la fine dell'anno in corso.

Per quanto riguarda la partecipazione a convegni, si è preso parte, quale invited speaker, ai seguenti congressi:

Gennaio 2011, IQPC, 4th Annual Biobanking Conference 2011

Giugno 2011, the Third Annual Biobanking World Summit 2011

Novembre 2011, ESBB Inaugural Conference November 2011

SCENARI SOCIOCULTURALI DELLA RIABILITAZIONE INFANTILE. RICOGNIZIONE DELLE PRATICHE DI CURA NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO, IDENTIFICAZIONE DELLE QUESTIONI ETICHE, DEONTOLOGICHE, SOCIALI ED ELABORAZIONE DI UN PERCORSO DI FORMAZIONE PER OPERATORI

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

OVCI - La Nostra Famiglia

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

La presente ricerca, di durata biennale, si è rivolta, in prima fase, alla ricognizione di pratiche e teorie riabilitative, specificatamente nei confronti del bambino, in aree geografiche selezionate e considerabili "campioni" di contesti culturali molto differenziati: Santana per il Brasile, Esmeraldas per l'Ecuador, Khartoum per il Nord Sudan e Juba per il Sud Sudan, Rabat per il Marocco, e Pechino e la provincia dell'Hebei per la Cina, Paesi nei quali l'Organizzazione Non-Governativa italiana OVCI-La Nostra Famiglia svolge progetti di Cooperazione Internazionale allo Sviluppo in ambito socio-sanitario-riabilitativo, allo scopo di riconoscerne punti di forza e criticità. La raccolta dei dati è avvenuta tramite interviste ad alcuni esperti che collaborano con tale ONG. I risultati hanno mostrato una prevalenza di similitudini piuttosto che di discrepanze nei vari contesti analizzati rispetto alla scarsità di competenze scientifiche (sia delle famiglie che degli operatori sanitari) e delle risorse disponibili in termini di strutture e servizi atti alla riabilitazione, specialmente nelle aree rurali, e di ridotte possibilità di inserimento scolastico del bambino disabile e lavorativo dell'adulto con disabilità.

Nell'ottica di un'analisi della prospettiva della famiglia del bambino disabile proveniente da contesti "altri!", inoltre, sono stati elaborati dei questionari a risposta chiusa rivolti alle famiglie straniere di bambini disabili in carico presso il Servizio Sociale di alcuni Poli dell'Associazione La Nostra Famiglia della Lombardia (Bosisio Parini) e del Triveneto (Conegliano Veneto, Padova,

Pieve di Soligo, Oderzo, San Vito al Tagliamento, Pasiàn di Prato, Treviso) che verranno utilizzati come strumento di indagine. Tali questionari sono disponibili in varie lingue. La somministrazione degli stessi è stata affidata ad alcuni colleghi Assistenti Sociali dei vari Poli, che hanno ricevuto specifica formazione a riguardo.

La prospettiva di conoscenza reciproca utilizzata sarà la base di gestione di una quotidianità sempre crescente: l'assistenza e la cura da parte del personale sanitario italiano, e specificatamente di quello operante nell'IRCCS "E. Medea"- Ass. La Nostra Famiglia e dell'Associazione La Nostra Famiglia rispetto a piccoli pazienti provenienti da contesti socio-culturali "altri", attraverso la collaborazione nella strutturazione di un percorso di formazione per gli operatori.

ANALISI ESPLORATIVA MEDIANTE RMF PER IMMAGINI DELLE AREE E FUNZIONI CEREBRALI CORRELATE AL GIUDIZIO MORALE IN SOGGETTI SANI IN ETÀ EVOLUTIVA

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Polo di San Vito al Tagliamento

Dipartimento di Psicologia, Università Cattolica del Sacro Cuore di Milano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Dopo avere messo a punto, all'interno di un gruppo di studio multidisciplinare, i "dilemmi morali" da utilizzare per l'analisi del giudizio morale in bambini e adolescenti di diversa età, il presente progetto si propone di selezionare il campione di volontari sani, da utilizzare per il compimento dello studio con uso di risonanza magnetica funzionale per immagini. Il reclutamento verrà condotto, in parte, nelle scuole, in parte facendo riferimento a pediatri generali e, eventualmente, specialisti. Si desidera, in questo modo, munirsi di un campione sufficientemente omogeneo e come tale idoneo a limitare possibili bias nella risposta all'analisi con scansione cerebrale. Completata la fase di reclutamento, il progetto intende avviare gli studi mediante risonanza magnetica funzionale per immagini, utilizzando l'apparecchiatura disponibile presso la sede di Bosisio Parini dell'IRCCS "E. Medea" e avvalendosi della collaborazione dei professionisti sanitari che lavorano presso la linea di ricerca in Neuroradiologia.

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. FABIO TRIULZI

E-MAIL: FABIO.TRIULZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10

Neuroimaging

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Il progetto si articola nei seguenti protocolli:

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.

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

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.

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.

Risultati e prodotti conseguiti

Dopo la fase di avvio del progetto nell'anno 2010, finalizzata alla messa a punto degli specifici protocolli di acquisizione dati e alla risoluzione di alcuni problemi tecnici insorti in fase di start-up del magnete, nell'anno appena trascorso, 2011, è stato possibile dare inizio alla fase più operativa del progetto, con la acquisizione dei dati sui primi soggetti pediatrici.

Sono stati arruolati e sottoposti a indagine RM un totale di 178 soggetti, così ripartiti nei diversi protocolli:

Protocollo 0: 4 soggetti

Protocollo 1: 103 soggetti

Protocollo 2: 26 soggetti

Protocollo 3: 45 soggetti

158/178 esami sono stati eseguiti in regime di sedazione a causa della impossibilità dei soggetti a mantenere l'immobilità necessaria per un tempo sufficiente ad acquisire i dati. In nessun caso si sono verificate complicanze maggiori durante o al termine delle sedazioni.

L'utilizzo di protocolli mirati, ad elevata risoluzione, ha permesso di ottenere primi incoraggianti risultati nell'ottica di un miglioramento della performance diagnostica della RM.

Nella popolazione di soggetti con ritardo mentale e/o disturbo del comportamento e in quelli con epilessia, in particolare, è stato possibile in molti casi definire al meglio quadri malformativi cerebrali che in precedenti indagini a 1.5T rimanevano indefiniti o mal caratterizzati. Le sequenze ultra high resolution, con voxel inferiore ai 100 nl di volume, hanno spesso permesso di individuare reperti altrimenti non evidenziabili (eterotopie subependimali e sottocorticali, displasie corticali, alterazioni cerebellari ecc) in una quota consistente di soggetti. Tali dati permettono osservazioni interessanti nell'ambito della discussione sulla origine e classificazione delle malformazioni cerebrali, e meritano di essere espansi nel corso dell'anno corrente.

L'attenzione posta nel ottenere immagine di elevata risoluzione ha consentito di effettuare alcune interessanti osservazioni preliminari sull'imaging dello strato corticale in età pediatrica. E' stato infatti notato come sia possibile già a 3 T, e non solo a 7T, osservare una effettiva "laminazione" del manto corticale, caratterizzata da strati sovrapposti con intensità di segnale differente, in accordo con quanto noto da studi di anatomia patologica e citoarchitettura. Stiamo attualmente rielaborando i dati ottenuti per cercare un metodo di analisi quantitativa affidabile che ci permetta di rendere misurabile tale osservazione e che permetta confronti tra soggetti sani e patologici.

In pressoché tutti i soggetti sottoposti a RM, sono stati acquisite sequenze di DTI secondo il protocollo messo a punto nel 2010 con la collaborazione del dr Pierpaoli dell'NIH.

Tale ingente mole di dati è attualmente in fase di elaborazione secondo diversi approcci metodologici, ovvero sia come studi di popolazioni di soggetti con caratteristiche cliniche/morfologiche simili (es: soggetti con ritardo mentale e RM negativa), sia come singoli casi, caratterizzati da quadro RM di particolare interesse e unicità.

A tal proposito, l'analisi dual-compartment dei parametri di diffusione in soggetti con malattie della sostanza bianca ha permesso di individuare modelli di danno differenti, che rappresentano una assoluta novità nella letteratura

di tali patologie.

Nel corso del 2011 sono infine già stati pubblicati alcuni articoli su soggetti arruolati nell'ambito di questo protocollo, ed altri lavori sono in fase di valutazione presso gli editori. A tal proposito si riporta:

- Poretti A, Vitiello G, Hennekam RC et al. Delineation and Diagnostic Criteria of Oral-Facial-Digital Syndrome Type VI. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jan 11;7

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

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Dipartimento di Psicologia - Università degli Studi di Milano- Bicocca

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

Introduzione

La presenza di un deficit visivo nei primi mesi di vita costituisce un notevole fattore di rischio per lo sviluppo del bambino, limitando le sue possibilità di interazione con il mondo circostante. Una diagnosi precoce e un altrettanto immediato intervento costituiscono dunque fattori protettivi importanti, che possono ridurre sia le difficoltà strettamente legate al deficit visivo, sia quelle legate all'interferenza che questo deficit può dare sullo sviluppo globale.

Obiettivo dello studio

Il presente studio si ispira all'ipotesi della ridondanza intersensoriale (Bahrick, & Lickliter, 2000), al fine di verificare il ruolo di tale ridondanza nella percezione di soggetti con diagnosi di ipovisione. In particolare l'ipotesi della ridondanza intersensoriale sostiene che nei primi mesi di vita la percezione di informazioni amodali (informazioni che possono essere percepite mediante più canali sensoriali) risulti facilitata in un contesto di stimolazione multimodale ovvero una stimolazione che coinvolge più canali sensoriali contemporaneamente. Uno degli scopi di questo studio era indagare la validità di tale approccio in bambini con ipovisione, avendo come obiettivo finale il loro utilizzo in chiave riabilitativa con un'eventuale verifica della sua efficacia tramite l'impiego di tecniche di neuroimaging. Come step preliminare il protocollo prevedeva lo studio delle abilità di discriminazione di un'informazione amodale, come il rit-

mo di una palla che rimbalza. A questo fine sono stati messi a punto specifici stimoli che includevano la ritmicità. Il ritmo infatti costituisce un'informazione amodale poiché la percezione di un oggetto che si muove ad una determinata scansione (ad esempio, una palla che rimbalza) implica la stimolazione sia del canale visivo (visione della palla che si muove) che del canale uditivo (suono prodotto dalla palla nel corso del suo movimento).

Metodo e procedura

Hanno preso parte allo studio 35 bambini, suddivisi in tre gruppi: un gruppo clinico costituito da 13 bambini di età compresa tra i 6 e i 12 mesi con diagnosi di ipovisione e un gruppo di controllo con sviluppo tipico (N = 22, età compresa tra i 3 e i 12 mesi). Il livello di sviluppo è stato valutato tramite la Bayley Scales III. Per indagare gli effetti della stimolazione multimodale rispetto ad una stimolazione modalità-specifica, il disegno sperimentale prevedeva che uno stesso stimolo (palla che rimbalza) venisse proposto al bambino separatamente sul canale visivo (condizione Visiva) e su quello uditivo (condizione Uditiva) e su entrambi i canali contemporaneamente (condizione Audiovisiva). Gli stimoli venivano proposti utilizzando il paradigma dell'abituazione. La procedura prevede una prima fase nel corso della quale i bambini venivano abituati ad un ritmo (Ritmo 1) e in fase test nel corso della quale il bambino è posto nella condizione di discriminare tra un nuovo ritmo (Ritmo 2) da quello familiare (Ritmo 1). Tempi di fissazione più lunghi per lo stimolo nuovo indicano la capacità di discriminazione del bambino dello stimolo familiare rispetto a quello non-familiare.

Risultati e discussione

I risultati evidenziano che i bambini con diagnosi di ipovisione sono in grado di discriminare il ritmo nuovo da quello familiare nella condizione Audiovisiva, ma non in quelle Visiva e Uditiva. Questi dati suggeriscono un ruolo della ridondanza intersensoriale nella discriminazione di informazioni amodali come il ritmo, anche in soggetti con un grave deficit visivo.

STUDIO DI NEUROIMAGING AVANZATO (VOLUMETRIA, TRATTOGRAFIA, SPETTROSCOPIA, RMN E PET (F-FDG PET) IN SOGGETTI CON MALATTIA DEL 1° MOTONEURONE MOLECOLARMENTE DEFINITE

DR. ANDREA MARTINUZZI

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

Linea di Ricerca n. 10

Neuroimaging

Periodo di svolgimento

2011

Tipo di ricerca

Corrente

Polo Scientifico

Conegliano

Collaborazioni

IRCCS "E. Medea": Polo di Bosisio Parini: Laboratorio di Biologia Molecolare; Istituto di Fisiologia Clinica CNR-CREA, Pisa; Neuroradiologia ULSS 7 Conegliano

RIASSUNTO DELL'ATTIVITÀ SVOLTA AL 31.12.2011

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.

Obiettivi

1. Descrivere le caratteristiche fenotipiche in termini di neuroimaging in HSP e JPLS molecularmente definite
2. Correlare le predette caratteristiche con il genotipo
3. 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

È stato definito e condiviso il protocollo di valutazione clinica-strumentale. È stato definito il protocollo di acquisizione con magneti 1.5T, riscontrando difficoltà non indifferenti per quanto concerne lo spettro da midollo, per il quale si è deciso di ricorrere al magnete disponibile a Pisa (Siemens 3T). Sono state acquisite le immagini e gli spettri di 64 soggetti, 36 pazienti con diagnosi di HSP e 28 controlli, I dati sono attualmente in corso di elaborazione, e verranno stratificati sulla base della diagnosi definita di HSP da mutazione nei loci SPG4, SPG7, SPG3a, SPG5, SPG10, SPG11, SPG31, ALS2, ALS4.

L'analisi dei dati ha purtroppo condotto alla riduzione dei records utilizzabili per qualità non ottimale delle acquisizioni in spettroscopia. Sono stati quindi per ora analizzati integralmente 18 pazienti con HSP (10 SPG4, 4 SPG3, 2 SPG5, 1 SPG10, 1 SPG31) e 22 controlli.

Un risultato già acquisito è che il gruppo pazienti può essere efficacemente discriminato dai controlli mediante analisi dei dati DTI del fascio cortico-spinale. Infatti FA (fractional anisotropy) e avADC (averaged Apparent Diffusion Coefficient) risultano essere significativamente ridotti nel gruppo di soggetti con HSP rispetto ai controlli. Non risultano invece pattern consistenti e significativi nei dati di spettroscopia nell'area rolandica (single voxel based technique).

I dati di DTI mostrano un trend per significatività nella correlazione con i dati di gravità clinica (SPSR, FIM, disability score). I dati saranno oggetto di comunicazione alla prossima riunione della American Neurological Association. È in avvio l'attività di acquisizione RMN presso l'UOP di Bosisio.

Nel contempo il database clinico-neurofisiologico è stato strutturato e condiviso nei contenuti con l'UO di Bosisio. Tale database costituirà lo strumento per l'analisi delle correlazioni clinico-genetico-imaging.

Sono partite per i soggetti reclutati nei primi due anni della ricerca i follow-up clinici, mentre per i follow-up di imaging si attende il completamento dell'analisi del primo set di soggetti molecularmente definiti.

RICERCHE
MINISTERIALI
CORRENTI 2012

RAZIONALI

LE ORIGINI DELLE ABILITÀ DI PERCEZIONE DEI VOLTI NEI BAMBINI NATI PRETERMINE

DR. ROSARIO MONTIROSSO

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Policlinico Universitario di Modena: Divisione di Neonatologia

Università degli Studi di Milano Bicocca: Dipartimento di Psicologia

DESCRIZIONE

La percezione di un volto e delle emozioni facciali costituiscono un elemento importante nella costruzione di interazioni con il mondo circostante fin dai primi giorni di vita. Numerose ricerche hanno dimostrato precoci capacità di elaborazione del volto, che permettono ai neonati fin da subito di mettersi in relazione con gli altri. È nota la preferenza a poche ore di vita per i volti, in particolare per quello della propria madre e la capacità dei neonati di distinguere un volto nuovo da uno diventato familiare (Johnson & Morton, 1991; Macchi Cassia, Turati, Simion, 2004; Pascalis, de Schonen, Morton, Deruelle e Fabre-Grenet, 1995; Turati, MacchiCassia, Simion e Leo, 2006). Per quanto riguarda le espressioni emotive alcuni studi hanno documentato una preferenza visiva per espressioni di felicità paragonate ad espressioni di paura (Farroni, Menon, Rigato e Johnson, 2007; Turati, Montiroso, Brenna, Ferrara, Borgatti, 2010).

Alcune condizioni di sviluppo atipico possono compromettere lo sviluppo di queste competenze di elaborazione del volto e possono avere ricadute sulle capacità del bambino di mettersi in relazione con il mondo circostante (LeGrand et al., 2001; Karmiloff-Smith et al., 2004). La nascita pretermine costituisce un esempio di esperienza precoce atipica di questo tipo (Field, 1987; Lowe et al., 2005; Montiroso et al., 2010). Diversi studi hanno indagato le competenze espressive dei bambini nati pretermine, mettendo in luce alcune differenze tra il comportamento manifestato da bambini a termine durante le

interazioni viso a viso e quello di bambini nati pretermine (Eckerman, Hsu, Molitor, Leung, & Goldstein, 1999), mentre solo pochi studi hanno indagato le capacità percettive di bambini nati pretermine nell'interazione con l'altro, quali ad esempio le abilità di riconoscere un volto e di discriminare differenti espressioni emotive.

Il presente progetto ha come obiettivo generale quello di indagare queste abilità in bambini nati pretermine, osservandoli alla 36a settimana di età post-concezionale. In particolare, ai bambini verranno proposte due distinte sessioni sperimentali, entrambe basate sul paradigma della preferenza spontanea. Nella prima sessione verrà indagata la preferenza visiva spontanea per lo stimolo volto rispetto a stimoli di pari complessità che non raffigurano il volto (scrambled), mentre oggetto della seconda sessione sarà l'indagine dell'esistenza di una preferenza per un'espressione emotiva di felicità e un'espressione emotiva di paura. Tutti i soggetti parteciperanno ad entrambe le sessioni. Al fine di analizzare il numero e la durata delle fissazioni visive spontanee in direzione dei due stimoli, il comportamento di esplorazione visiva del bambino verrà videoregistrato in entrambe le due sessioni.

I risultati di questo studio potranno fornire importanti informazioni sulle capacità di elaborazione di un volto in bambini nati pretermine. Sebbene non siano previste ricadute cliniche immediate, ci si attende che i risultati possano contribuire a fornire un utile riferimento per i clinici e gli operatori che lavorano con bambini esposti a condizioni di sviluppo non favorevoli. Infatti queste informazioni potranno esser utilizzate per integrare il supporto ai genitori nello scambio con i propri bambini.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del 2012 sono previste le seguenti principali attività:

- 1) formalizzazione dello studio;
- 2) organizzazione dell'operatività;
- 3) avvio alle fase di reclutamento dei soggetti partecipanti.

1) Formalizzazione dello studio:

- a. Perfezionamento del protocollo dello studio con definizione degli strumenti e messa a punto degli stimoli da utilizzare nel corso delle sessioni di osservazione dei bambini.
- b. Stesura dei documenti relativi alla privacy (lettera informativa genitori, consenso informato alla ricerca, alle procedure previste da protocollo e al trattamento dei dati).
- c. Il protocollo dello studio sarà poi sottoposto al Comitato Etico dell'Istituto e

alla eventuale ratifica, se richiesta, da parte degli altri Enti coinvolti.

2) Organizzazione dell'operatività:

- a. Acquisto della strumentazione hardware e software necessaria alla somministrazione degli stimoli e all'acquisizione delle risposte comportamentali del bambino.
- b. Verifica della strumentazione hardware e software per la somministrazione degli stimoli e l'acquisizione delle risposte comportamentali del bambino, con i colleghi del Dipartimento di Psicologia dell'Università degli Studi di Milano Bicocca (Prof.ssa Chiara Turati).
- c. Incontri con il Responsabile della Divisione di Neonatologia del Policlinico Universitario di Modena (Prof. Fabrizio Ferrari) per il perfezionamento della collaborazione, incluso le necessarie procedure formali di accesso al reparto e il coinvolgimento sia del personale che dei genitori.
- d. Formazione del personale del reparto individuato dal responsabile locale dello studio (Prof. Fabrizio Ferrari). Il personale menzionato collaborerà fattivamente alla selezione della casistica, al coinvolgimento dei genitori dei bambini eleggibili e fornirà il supporto operativo-logistico nel corso delle sessioni di osservazione del comportamento del bambino.
- e. Selezione (tramite bando) e formazione di un borsista di ricerca che supporterà tutte le fasi operative di reclutamento (in collaborazione con il personale della Divisione di Neonatologia del Policlinico Universitario di Modena), nonché la registrazione, l'acquisizione e l'analisi dei dati dello studio.

3) Avvio alle fase di reclutamento dei soggetti partecipanti:

- a. Al completamento delle attività previste ai punti 1) e 2) sarà possibile avviare il reclutamento dei bambini secondo i criteri di inclusione descritti nel protocollo dello studio; ovvero: un gruppo di bambini nati pretermine sani a basso rischio (età gestazionale compresa tra le 36 e le 32 settimane; peso alla nascita compreso tra i 2500 e i 1500 g) e un gruppo di bambini nati pretermine sani ad alto rischio (età gestazionale inferiore alle 32 settimane; peso alla nascita < 1500 g). La proposta di partecipazione al progetto verrà rivolta alle madri durante la degenza del bambino in ospedale e le registrazioni verranno effettuate nella 36a settimana post-concezionale, nel rispetto della disponibilità della madre e delle condizioni cliniche e comportamentali del bambino. Le sessioni avranno una durata di circa 10 minuti ciascuna e saranno sufficientemente distanziate l'una dall'altra al fine di non affaticare i bambini.

- b. Il reclutamento dei soggetti include l'acquisizione dei dati perinatali e neonatologici del bambino tramite la consultazione dei record medici e dei dati socio-demografici della famiglia.

FENOTIPO SOCIALE, ENDOFENOTIPO E NEUROGENETICA COMPORTAMENTALE NELLE SINDROMI CON RITARDO MENTALE GENETICAMENTE DEFINITE

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea: Poli di Ostuni, San Vito, Conegliano

DESCRIZIONE

Disordini genetici che impediscono il normale sviluppo cognitivo comportamentale nei bambini sono presenti in più dell'1% della popolazione generale (Fisch, 2000), e più del 25% dei soggetti con ritardo mentale presenta importanti problematiche di comportamento, con una prevalenza quindi circa quattro volte maggiore rispetto alla popolazione generale (Rush et al 2004). Interpretati nel passato come dipendenti dal deficit cognitivo spesso concomitante, i disordini del comportamento negli anni recenti sono stati sempre più identificati come specifica componente del quadro complessivo, legata quindi al genotipo (behavioural neurogenetics, Reiss 2000 e 2003; Feinstein & Singh 2007). Pur se molto rilevanti dal punto di vista gestionale e di grande impatto sociale (dual diagnosis), le problematiche comportamentali sono però spesso sottodiagnosticate sia perché meno imponenti che per la mancanza di criteri diagnostici appropriati. Lo studio sistematico nei quadri con base genetica definita può consentire invece sia di seguire l'ontogenesi della relazione cervello/cognitivo/comportamento nel tempo che di studiare l'organizzazione e la correlazione struttura funzione in una situazione "esperimento di natura" (Reiss 2003). Gli studi si sono concentrati negli anni recenti su alcune sindromi (ad esempio: Williams, Charge, FRAX, Prader-Willy, Smith-Magenis, Turner, NF1, Down) per le quali sono stati descritte le caratteristiche comportamentali e sociali, pur con importanti differenze sia nell'ampiezza che nella precisione degli studi. Gli studi di neuroimaging funzionale hanno documentato come disfunzioni a livello dell'amigdala siano sottese alle ano-

malie comportamentali e sociali presenti nella sindrome di Williams (Haas et al., 2009 e 2010; Meyer-Lindenberg et al., 2005; Reiss et al., 2004; Munoz 2010); analoghi studi di neuroimaging funzionale sono stati condotti con altri quadri genetici definiti (22 q del, CHARGE). Le peculiarità del fenotipo comportamentale e sociale nella Sindrome di Williams sono state descritte anche dal nostro gruppo, così come le capacità di riconoscimento delle emozioni espresse dai volti, cruciali nelle interazioni sociali e correlate con il funzionamento dell'amigdala (Gagliardi et al 2003; Frigerio et al 2006; Gagliardi et al 2011; dati evolutivi tra i 4 e i 18 anni in Montirosso et al 2010). Più recente è la descrizione dell'endofenotipo nei quadri geneticamente ben definiti; il termine fa riferimento a tratti misurabili associati con geni che sottendono alla suscettibilità, associati con patologie, ereditari e stato-indipendenti (presenti anche quando la malattia non sia attiva). Quadri quali 22qdel e premutation carriers FRAX, sono stati considerati endofenotipi di suscettibilità per condizioni psichiatriche (rispettivamente schizofrenia e autismo).

La presenza di un quadro sindromico definito e dei disordini evolutivi conseguenti/connessi può comportare restrizioni della partecipazione ed un aumento dei livelli di stress; molti dati documentano l'importanza dell'asse ipotalamo ipofisario (e quindi del cortisolo) nella modulazione della risposta allo stress, a livello cognitivo e nella risposta emozionale/sociale. L'interazione tra cortisolo e neurotrasmettitori è nota da tempo; i glucocorticoidi aumentano l'attivazione in alcune aree cerebrali quali l'amigdala, l'ippocampo, le regioni medio e orbito frontali. Il dosaggio del cortisolo è un indicatore di semplice accesso di funzionamento sia dell'asse ipotalamo ipofisario che della modulazione cerebrale. Metodiche più tradizionali utilizzano il dosaggio del cortisolo basale o in risposta ad un evento stressante, con elevata variabilità interindividuale (dosaggio salivare, vedi Kudielka et al 2009); il dosaggio del cortisolo nel capello invece (metodica semplice e poco invasiva) può consentire invece di misurare livelli di stress cronico ed è stata recentemente utilizzata negli studi sui disturbi ansiosi (Steudte et al 2010).

Obiettivi della presente ricerca sono:

1. Identificazione delle caratteristiche cliniche del fenotipo comportamentale e sociale, definizione della incidenza e prevalenza dei disturbi sociali ed adattivi in una popolazione ampia di pazienti con quadro sindrome a base geneticamente definita con utilizzazione di protocolli definiti, evidence based e con confronti in letteratura
2. Su sottopopolazioni definite ed omogenee di studio neurofunzionale delle strutture coinvolte nella modulazione del comportamento emotivo e sociale accoppiata con uno studio della funzione neuroendocrina
3. Correlazioni genotipo/fenotipo in quadri omogenei dal punto di vista

genetico

4. Individuazione indicatori specifici (sia per tipologia che per età di insorgenza)
5. Individuazione di percorsi genotipo/specifici di monitoraggio e terapia

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

1° anno di ricerca (2011). Nel corso del primo anno di ricerca sono stati reclutati i pazienti che sono stati avviati al protocollo di valutazione funzionale previsto:

Criteri di inclusione:

età tra 4 e 18 anni

quadro sindromico con base genetica definita

Valutazione funzionale

Tutti i pazienti reclutati sono sottoposti ad una batteria di valutazione con utilizzazione di questionari e tests già in uso a livello clinico, riuniti in una batteria, in modo da poter configurare un profilo specifico sia per ogni soggetto che per quadro geneticamente omogeneo. Gli strumenti utilizzati in letteratura variano rendendo i dati riportati tra di loro non sempre confrontabili; inoltre l'approccio basato sulla classificazione psichiatrica (DSM) dei disturbi del comportamento nei quadri geneticamente determinati può risultare solo parzialmente informativo. Basato infatti su classi a presumibile genesi multifattoriale e poligenica, tende nei quadri con disordine genetico - specie se ben definito – a descrivere un “fenotipo psichiatrico” che da una parte prescinde dalla base genetica nota e dall'altra appartiene a multiple voci della classificazione stessa, spesso in modo non completamente rispondente. Se per questi motivi si è rivelato relativamente adatto agli studi di ricerca di correlazione genotipo/fenotipo, resta nello stesso tempo uno strumento che consente di classificare con terminologia condivisa a livello internazionale l'incidenza/prevalenza e l'andamento diacronico di problematiche psichiatriche.

Il protocollo è costituito da:

- valutazione competenze cognitive generali: QI (Scale Wechsler)
- valutazione competenze adattive: Scala Vineland
- valutazione disturbi psicopatologici: Scala K-SADS-PL
- valutazione stress ambientale: Scala PSI

Sono state effettuate le riunioni del team di ricerca per la impostazione della raccolta dati; sono state inoltre effettuati gli incontri con i referenti dei poli

dell'IRCCS da parte del Dr. R. Borgatti, responsabile della ricerca; a seguito è stato condiviso ed inviato il materiale necessario, sia in formato cartaceo che su supporto informatizzato. Di fatto nel corso del 2011 il reclutamento è stato limitato alla sede di Bosisio Parini ai pazienti afferenti alla U.O. NR1. Il materiale raccolto è stato inserito nel data base come previsto. Sono stati reclutati fino ad ora 37 pazienti, di cui la maggior parte portatori di Sindrome di Williams.

È stata pertanto analizzata una prima parte dei dati raccolti, in particolare quelli legati alle problematiche psicopatologiche nella Sindrome di Williams attraverso la somministrazione della scala KSADS, in uso routinario ai fini clinici. I dati raccolti sono stati riuniti ad analoghi raccolti in fase immediatamente precedente presso l'AFSW e all'AIWS (associazione famiglie di persone con sindrome di Williams); tale raccolta (con consenso informato raccolto dalla associazione stessa) rispondeva da una parte al bisogno di definizione clinica ed aveva quindi immediata ricaduta operativa nelle attività proposte dalla associazione. Per consentire l'ampliamento delle conoscenze, veniva proposta da parte della associazione la possibilità di elaborazione dei dati raccolti (in forma anonima) da parte di IRCCS Medea e di ospedale Bambino Gesù (rispettivamente referenti per il follow up da anni per le diverse zone geografiche del Paese) in modo da consentire di raccogliere un campione più significativo. I dati anonimi delle persone che hanno consentito alla elaborazione sono confluiti quindi in un'unica elaborazione.

È stata studiata la prevalenza e distribuzione della comorbidità psichiatrica nella WS, la relazione fra psicopatologia e altri fattori (età, genere e competenze cognitive generali) ed analizzati i trattamenti farmacologici con farmaci psicotropi. Per meglio studiare l'andamento evolutivo, lo studio ha individuato all'interno del campione due gruppi: infradiciottenni e persone con più di 18 anni. Il 46,7% del campione totale mostrava almeno un disturbo psichiatrico, il 15,6% presentavano almeno 2 disturbi. (nel 10,5% dei giovani e nel 20,5% degli adulti). Il disturbo ansioso era presente nel 29,9% dei soggetti, mentre erano identicamente distribuite (11,7%) ADHD e psicosi. Assenti nel campione i disturbi disadattivi del comportamento (disturbo oppositivo-provocatorio; abuso di sostanze stupefacenti). Non è stata verificata alcuna differenza di genere nella distribuzione del disturbo psicopatologico fra sessi [$\chi^2(1) = 0.01$; $P = 0.9$]. Il quoziente intellettivo dei partecipanti che presentavano un disturbo psicopatologico (QI medio = 48.7; DS = 11.9) era significativamente più basso [$t(72) = 1.9$; $P = 0.04$] di chi non presentava alcun disturbo (QI medio = 54.3; DS = 12.1). Il disturbo psicotico era significativamente più presente nel gruppo dei soggetti adulti ($\chi^2(1) = 6.8$; $2(1) = 6.8$; $P = 0.009$). Per quanto attiene al trattamento farmacologico, tra i soggetti con almeno un disturbo psichiatrico, l'83,3% dei minorenni e il 66,6% degli adulti non avevano

mai ricevuto cure farmacologiche. Tra quelli trattati farmacologicamente, si è registrata a volte la utilizzazione di farmaci diversi (nel gruppo dei minorenni; SSRI in quadro psicotico, BDZ in disturbo dell'umore. Tra gli adulti risperidone ma anche oxcarbamezepina per disturbo psicotico, BDZ per disturbo ansioso e per disturbo dell'umore, olanzapina per disturbo bipolare).

Nel complesso, la prevalenza della psicopatologia nella nostra popolazione (46.7%) conferma i dati di altri studi – ad esempio Dodd et al - . che avevano usato il medesimo strumento di valutazione (K-SADS-PL), mentre altri studi basati sull'uso di strumenti di valutazione diversi hanno verificato percentuali di incidenza più alte (per esempio l'83% in Stinton et al.; l'80,7% in Leyfer et al; 61,4% in Einfeld et al.). Anche un nostro studio precedente (Gagliardi et al 2011) condotto utilizzando il medesimo strumento di Einfeld, individuava nel 65% dei soggetti con WS la presenza di disturbi del comportamento, con un'incidenza superiore a quanto atteso rispetto all'impairment cognitivo, con il disturbo di tipo ansioso presente a tutte le età. Le differenze sia nell'incidenza che nell'andamento temporale dei disturbi psichiatrici possono in prima ipotesi essere legate al tipo di strumento utilizzato: molti dati (e tra questi i nostri precedenti) sono raccolti tramite un questionario rivolto ai genitori, mentre nello studio presente oltre alle risposte dei genitori vengono analizzate quelle della persona stessa e i dati desunti dalla osservazione clinica.

L'ansia risulta essere il disturbo prevalente nella SW come in altri studi (ad esempio: Dodd et al.), mentre risultano differenti sia l'incidenza di ADHD (inferiore nel nostro studio) che quella di psicosi (maggiore nel nostro campione). Come spesso nei quadri di sindrome rara, è necessario un allargamento del campione per ottenere dati dirimenti; d'altra parte i nostri dati sembrano essere in linea con la maggiore incidenza delle problematiche psicotiche nella popolazione con ritardo mentale (3 volte maggiore rispetto alla popolazione generale). Nella medesima linea è interpretabile il dato della correlazione tra minori competenze cognitive generali e maggiore incidenza di disturbi psicopatologici, legato alla presenza di una interazione dinamica fra QI e disturbi psichiatrici in termini di effetto negativo giocato dalla morbilità psichiatrica sul funzionamento intellettuale.

Rilevante e solo in parte inatteso è risultato il dato relativo al trattamento farmacologico. La letteratura è poco definita rispetto all'adeguato trattamento (tipo, durata, posologia) nei quadri con ritardo mentale, e spesso i pazienti continuano ad essere o troppo o troppo poco trattati. In precedenza solo due studi sulle WS avevano approfondito l'argomento, segnalando come solo una parte (11/19 e 13%, rispettivamente) dei pazienti WS con diagnosi psichiatrica ricevessero terapia farmacologica. Il problema del trattamento insufficiente del disturbo psichiatrico che è stato rilevato nel nostro studio sembra quindi essere frequente sia in questa sindrome che più in generale

nei quadri che presentino associazione tra ritardo mentale e disturbo psichiatrico (anche se sono necessari ulteriori studi).

La conclusione dello studio permette di sottolineare l'urgenza di porre una maggiore attenzione agli aspetti psicopatologici nel ritardo mentale, che sembra un aspetto diagnostico significativamente trascurato. Tale aspetto sembra avere una ricaduta immediata sia sugli aspetti clinici (valutazione e management) che sulle scelte terapeutiche (submitted to *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*: Stefano Vicari, Marco Armando, Giovanni Carbonara, Maria Cristina Digilio, Chiara Gagliardi, Sara Martelli and Deny Menghini Underestimated and undertreated psychopathological comorbidity in Intellectual Disability: the case of Williams Syndrome)

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del secondo anno di ricerca si proseguirà nel reclutamento dei pazienti afferenti ai diversi Poli dell'IRCCS; verrà proposto il protocollo di valutazione funzionale sopra descritto. L'ampliamento della casistica dovrebbe consentire di ottenere dati sufficienti per l'individuazione di profili in diversi quadri sindromici: la problematica maggiore infatti nelle sindromi rare è l'esiguità dei dati (=casi) disponibili, e quindi l'inevitabile incidenza della variabilità individuale sui risultati ottenuti. L'approfondimento del profilo per sindrome, quindi, sarà effettuato in modo progressivo per gruppi omogenei (per quadro sindromico) sufficientemente numerosi.

Lo studio delle problematiche psicopatologiche nella Sindrome di Williams proseguirà anche nel secondo anno di ricerca, con particolare attenzione alle problematiche dei giovani adulti anche in considerazione dei dati emersi dall'analisi condotta nel corso del primo anno. Pur se malattia rara, infatti, la numerosità della casistica raccolta ha consentito di raccogliere elementi significativi che rafforzano di fatto i presupposti su cui si fonda il presente progetto di ricerca. Si prevede di mettere a punto nel corso del secondo anno di ricerca il paradigma per lo studio di neuroimaging funzionale basato sulla dissociazione tra competenze sociali (forte spinta sociale, relativa facilità al contatto) e componente ansiosa. Lo studio in fMRI è previsto per il terzo anno di ricerca.

Tra i pazienti già reclutati nel corso del primo anno, diversi soggetti presentano un quadro riconducibile alla Sindrome di Joubert e alle condizioni correlate (Joubert Syndrome and related disorders- JSRDs), caratterizzata da una malformazione congenita del tronco cerebrale e un'agenesia o ipoplasia del verme cerebellare, cui possono essere associate altre anomalie del sistema nervoso centrale. La malformazione del cervelletto e della fossa cranica po-

steriore all'indagine neuroradiologica si presenta con un aspetto tipico noto come "segno del dente molare". Il quadro clinico è molto variabile comprendendo disturbi motori (ipotonia, atassia, disartria, aprassia oculomotoria), ritardo dello sviluppo psicomotorio, anomalie respiratorie e ritardo mentale (da lieve a profondo). Il quadro può essere ulteriormente complicato dal coinvolgimento oculare (retinopatia, colobomi, atrofia ottica) e/o renale (che varia da minime alterazione della capacità di concentrazione urinaria fino alla totale insufficienza renale). Interessamenti più occasionali riguardano il fegato e l'intestino, lo scheletro, il cuore, l'albero respiratorio (bronchi e polmoni). La sindrome è geneticamente eterogenea e diversi geni sono stati associati - tra cui: AHI1 (6q23), NPHP1 (2q13), CEP290 (12q21), TMEM67 (8q22), RPGRIP1L (16q12), ARL13B (3p12.3-q12.3) e CC2D2A (4p15), WPP5E (9q34), TMEM216 (11q13), CXORF5 (Xp22.3). I geni coinvolti codificano per proteine espresse a livello del cilio primario. Le ciglia primarie funzionano come sensori cellulari che trasmettono segnali al nucleo regolando il ciclo e la proliferazione cellulare. Nel sistema nervoso centrale regolano la migrazione neuronale, la proliferazione e l'orientamento assonale. È interessante notare come la variabilità genetica si esprima con una ampia variabilità fenotipica clinica (organi ed apparati coinvolti), ma riconduca sempre ad un unico fenotipo neuropatologico rappresentato, all'indagine neuroradiologica, dal "segno del dente molare". A tutt'oggi non è ancora chiaro perché le malformazioni cerebrali sopradescritte, che rappresentano il "segno" comune ai diversi quadri sindromici, si correlino con una così ampia variabilità fenotipica, in particolare per quanto riguarda gli aspetti cognitivo/linguistici/comportamentali e motori. Il ritardo sul piano neuropsicologico e linguistico può infatti variare da un interessamento minimo ad una compromissione anche molto grave e, allo stesso modo, il disturbo motorio si può esprimere attraverso un certo range di variabilità: la marcia può essere francamente atassica, atasso-spastica o solo lievemente impacciata. Gli studi degli anni recenti si sono concentrati in prevalenza sull'aspetto genetico, neuroradiologico e clinico; molto meno descritto è il fenotipo comportamentale (sia per gli aspetti cognitivi che per quelli psicopatologici), pur essendo nota una elevata variabilità della compromissione. La letteratura è comunque concorde nel definire l'importanza di studi di correlazione dei profili cognitivo-linguistici, e dei pattern neuromotori per una migliore comprensione del ruolo giocato dal cervelletto e dalle strutture ponto-mesencefaliche nel controllo di queste funzioni.

Nel 1998 Schmahmann and Sherman hanno descritto in bambini ed adulti con lesioni cerebellari acquisite la 'Cerebellar Cognitive Affective Syndrome', caratterizzata dallo sviluppo di un complesso pattern comportamentale con riduzione dell'efficienza cognitiva associata con deficit neuropsicologici spe-

cifici (esecutivi e visuospatiali), disturbi del linguaggio espressivo e dell'affettività/comportamento. Nel 2007, uno studio condotto presso questo Istituto (Tavano et al, 2007) ha documentato in pazienti con quadri cerebellari malformativi la presenza di una pattern nel complesso riconducibile alla "Cerebellar Cognitive Affective Syndrome", sottolineando di nuovo l'importanza del ruolo del cervelletto nell'acquisizione di competenze cognitive ed affettive. In particolare il coinvolgimento delle strutture filogeneticamente più antiche quali il verme cerebellare era risultato presente in quadri con maggiori disturbi affettivi, sociali e comportamentali (dalla fragilità/rigidità con tratti ansiosi fino al Disturbo Pervasivo dello Sviluppo). Le malformazioni degli emisferi cerebellari (strutture filogeneticamente più recenti) erano più frequentemente associate con deficit esecutivi e visuospatiali, nonché con disturbi del linguaggio. Nel corso del secondo anno di ricerca verranno pertanto analizzati prioritariamente i dati relativi al gruppo di pazienti con Sindrome di Joubert o Joubert related disorder. Si prevede inoltre uno studio di neuroimaging (MRI 3 TESLA; trattografia e connettività) i cui risultati potranno essere correlati sia con il quadro genetico che con le caratteristiche del profilo funzionale. Si cercherà di individuare clusters di pazienti, con caratteristiche cognitivo/comportamentali simili, ricercando la correlazione tra fenotipo comportamentale e pattern neuroradiologico, anche ai fini della definizione di percorsi diagnostico/terapeutici più mirati.

RUOLO DELLE TUBULINE (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8) NELLE MALFORMAZIONI DELLO SVILUPPO CORTICALE (MCD): STUDIO GENETICO-MOLECOLARE, CLINICO E NEURORADIOLOGICO DI UN'AMPIA CASISTICA DI SOGGETTI AFFETTI

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: U.O Neuroriabilitazione 1; Laboratorio di Biologia Molecolare; CeSNE – Centro Studi di Neuroimaging dell'Età Evolutiva
IRCCS E. Medea: Poli Scientifici di Conegliano, San Vito e Ostuni

DESCRIZIONE

Oggetto del presente studio è una migliore definizione del ruolo delle Tubuline (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8) nel determinismo delle malformazioni dello sviluppo corticale (MCD). Le Tubuline alfa e beta sono proteine codificate da famiglie di geni altamente conservati nelle diverse specie, espressi in neuroni post-mitotici, con differente pattern spazio-temporale, coinvolti in processi cellulari cruciali per lo sviluppo corticale come la proliferazione, l'organizzazione e la migrazione neuronale. È stato dimostrato inoltre il loro coinvolgimento in meccanismi di guida assonale nei processi di organizzazione della glia radiale. Mutazioni nei geni codificanti le tubuline, determinando un sovvertimento della organizzazione laminare corticale e una disorganizzazione dei processi di glia radiale, sono pertanto responsabili di un ampio spettro di MCD che includono lissencefalia, pachigiria, polimicrogria e schizencefalia come da noi documentato recentemente (Romaniello et al.2012). Possono essere associati ad alterazioni della motilità oculare e ad aspetti malformativi coinvolgenti altre strutture cerebrali (corpo calloso e brainstem), nel complesso definiti "Tubuline-related disorders" (Jackson et al 2009, Jaglin et al 2009, Singh et al 2010, Tischfield et al 2010). In particolare sembra che i geni TUBB2B e TUBA1A svolgano, con differente profilo spazio-temporale, un ruolo principale nei processi di corticogenesi e di migrazione neuronale.

Pertanto, mutazioni del gene TUBB2B sono state recentemente descritte in quadri di Polimicrogiria (PMG) bilaterale asimmetrica (Jaglin et al 2009), e mutazioni del gene TUBA1A in quadri di Lissencefalia tipo 1 (Poirer et al 2007, Tian et al 2010) e più di recente in due pazienti con PMG (Jansen et al 2011). Sebbene mutazioni del gene TUBB3 siano state osservate primariamente in quadri di alterazione di movimenti oculari, ptosi, spasticità, agenesia del corpo calloso e polineuropatia, mettendo in evidenza il ruolo principale di tale gene in meccanismi di guida assonale (Tischfield 2010), in un recente lavoro di Poirer et al (2010) vengono descritte mutazioni di TUBB3 in quadri clinici in cui sono associate MCD (polimicrogiria e anomalie di girazione) e anomalie in fossa cranica posteriore. Mutazioni di TUBA8 sono state riscontrate in quadri di polimicrogiria e ipoplasia de nervi ottici (Abdollahi et al 2009).

Pertanto alla luce di quanto emerso fino ad oggi dai dati della letteratura, lo spettro di malformazioni cerebrali associato a mutazioni di geni codificanti Tubuline è in continuo ampliamento e tutt'ora in via di definizione, così come i reali meccanismi che sottendono la morfogenesi delle strutture corticali e i meccanismi di guida assonale (Tischfield 2011).

Al fine di verificare il ruolo esercitato da mutazioni nei geni codificanti per proteine appartenenti alla famiglia delle Tubuline nella eziopatogenesi delle MCD ed effettuare una migliore correlazione genotipo-fenotipo clinico e neuroradiologico, lo studio si è proposto l'obiettivo di rivalutare un' ampia casistica di soggetti (ad oggi sono stati reclutati 123 soggetti) nei quali (105/123) una precedente indagine neuroradiologica abbia documentato una MCD, già valutati e risultati negativi per i principali geni noti e specifici per le singole malformazioni (DCX, EMX2, ARX, HESX1, GPR56, SRPX2, LIS1, REL, FLNA) (Barkovich et al 2005) e all'analisi del cariotipo molecolare mediante tecnica CGH-array effettuata in soggetti con quadri malformativi complessi (casi con malformazioni coinvolgenti altre strutture cerebrali ed extra cerebrali). Nei restanti 18 pazienti è stata effettuata nuova diagnosi di MCD nel corso dell'ultimo anno, mediante esame neuroradiologico.

Il lavoro al momento non è ancora concluso. Obiettivi del progetto di ricerca saranno:

- migliore comprensione del ruolo delle Tubuline (TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8) nella eziopatogenesi delle MCD
- migliore definizione dello spettro di MCD associate a mutazioni nei geni codificanti Tubuline
- comprensione dei meccanismi di tali geni nella morfogenesi delle strutture corticali, e nei processi cellulari cruciali per lo sviluppo corticale come la proliferazione, l'organizzazione e la migrazione neuronale, e nei meccanismi di guida assonale e dei processi di organizzazione della glia

radiale

- indicazioni per stesura di possibili iter diagnostici e neuroradiologici specifici per i soggetti con MCD.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel primo anno della ricerca sono stati arruolati complessivamente 123 soggetti con malformazione dello sviluppo corticale (MCD), 59 maschi e 64 femmine, di età compresa tra i 4 mesi e i 43 anni. 107/123 soggetti provengono dal Reparto Neuroriabilitazione 1 IRCCS E. Medea Bosisio Parini. 16/123 soggetti provengono dal Polo Scientifico di Conegliano.

Per ogni soggetto è stato ottenuto un consenso informato da entrambi i genitori. È stato inoltre compilato un questionario clinico specifico (Scheda Rilevamento Dati) per la raccolta di dati anamnestici dettagliati, esami strumentali e genetici eseguiti in precedenza.

Ogni soggetto è stato sottoposto a: un'attenta raccolta anamnestica familiare (presenza di familiari con lo 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.

Per ogni soggetto è stato inoltre prelevato un campione di sangue (6 ml di sangue intero in EDTA) per l'analisi di mutazione dei geni TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8 mediante sequenziamento diretto del DNA amplificato.

È stata inoltre condotta una rivalutazione delle indagini neuroradiologiche precedentemente effettuate e riclassificazione preliminare (secondo Classificazione di Barkovich et al 2005) in tutti i soggetti reclutati nello studio con precedente diagnosi di MCD. I medesimi criteri classificatori sono stati applicati nei soggetti con nuova diagnosi di MCD effettuata nel corso dell'ultimo anno.

Le malformazioni dello sviluppo corticale riscontrate nella popolazione in studio sono differenziabili nei seguenti quadri malformativi:

Malformazione correlata a disordine della proliferazione neuronale:

Non-neoplastic abnormal proliferation/ hemimegalencephaly: Isolata (3/123; 2.4%), nessuna malformazione associata

Malformazione correlata a disordine della migrazione neuronale:

Lissencefalia (13/13; 10.5%): Isolata (6/13). Associata a: Oloprosencefalia semilobare (1/13), Atrofia/ipoplasia cerebellare (4/13), ACC parziale (1/13), Eterotopie (1/13)

Eterotopie a banda (7/123; 5.7%): Isolata (2/7). Associata a: BPNH + dismorfismi cerebellari (1/7), Displasia cerebellare (1/7), Displasia ndb + ipoplasia nervi ottici e chiasma (1/7), Ipoplasia CC (1/7), Dismorfismi ndb (1/7)

Eterotopie nodulari 4/123 (3.25 %): Isolata (3/123). Associata a: Atrofia nervi ottici e chiasma, giri corticali semplificati, ndb semplificati, anomala girazione cerebellare, ipoplasia del verme (1/4)*

*in corso controlli TUBB2B

Eterotopie nodulari periventricolari bilaterali (BPNH) 13/123 (10.5%): Isolata (9/17). Associata a: Lissencefalia (1/17), PMG + displasia cerebellare (1/17), Ipoplasia CC (1/17), Ipoplasia cerebellare (1/17)

Cobblestone complex 1/123 (0.8%). Isolata (nessuno). Associata ad Atrofia cerebellare (1/123)

Malformazione correlata a disordine della organizzazione neuronale:

Polimicrogirie 61/123 (49 %):

Bilaterali: Isolate (23/61). Associate ad altri quadri malformativi (19/61)

Frontale: Isolata (4). Associate ad altri quadri malformativi cerebrali (ipoplasia nervi e tratti ottici) (5)

Frontoparietale: Isolata (4). Associate ad altri quadri malformativi cerebrali (eterotopie, ACC) (3)

Perisilviana: Isolata (7). Associate ad altri quadri malformativi cerebrali (ipoplasia cerebellare) (4)

Parasaggittale parieto-occipitale: Isolata (2). Nessuna malformazione associata

Generalizzata: Isolate (6). Associate ad altri quadri malformativi cerebrali (semplificazione giri corticali, malformazioni in fossa cranica posteriore) (7)

Unilaterali: Isolate (9/61). Associate ad altri quadri malformativi cerebrali (10/61)

Schizencefalie (SCH) 13/123 (10.5%): Isolata (nessuna). Associate a PMG + ASP (3/13), PMG + ASP + ipoplasia nervi ottici e chiasma (1/13), PMG (3/13), Ipoplasia dei nervi ottici (1/13), ACC (2/13), PNH (1/13), Agenesia del verme cerebellare + ipoplasia degli emisferi cerebellari (1/13), PMG + ACC + ipoplasia III nervo cranico + dismorfismi ndb e del brainstem) (1/13)§

§ mutazione TUBB2B

Displasie Corticali Focali 7/123 (5.7%): Isolata (5/7). Associata a: Sclerosi ippocampale mesiale (1/7), Giri corticali semplificati (1/7)°

° in corso controlli TUBA1A

ACC= agenesia del corpo calloso; CC= corpo calloso; ndb= nuclei della

base; ASP= agenesia setto pellucido.

Un paziente con quadro malformativo cerebrale complesso caratterizzato da parziale fusione dei talami alla porzione superiore del tronco encefalico-mesencefalico e alla giunzione ponto-encefalica. Ipoplasia del verme cerebellare, aspetto ipoplasico del nucleo striato e dei nuclei lenticolari e caudato. Aumento dei ventricoli laterali con corpo calloso assottigliato.

Dall'analisi dei dati preliminari emerge quanto segue:

Nei 123 soggetti arruolati nello studio il quadro di MCD prevalente risulta a essere quello a carico dell'organizzazione neuronale (81/123, 66%). Malformazioni della migrazione neuronale sono state riscontrate in 38/123 soggetti (31%), mentre solo 3 soggetti presentano malformazioni a carico della proliferazione neuronale (100% isolata).

Tra i disturbi della migrazione neuronale, quadri di Lissencefalia sono presenti in 13/123 soggetti (10.5%), isolata in 6/13, associata a quadri malformativi sopra/sottotentoriali (disturbi linea mediana e atrofia/ipoplasia cerebellare) nei restanti 7 pazienti. Eterotopie sono presenti in 24/123 soggetti, suddivise in Eterotopie a banda (7/123, 5.7%), Eterotopie nodulari (13/123, 10.5%) e BPNH (13/123, 10.5%). Tali forme si presentano isolate in 14 soggetti. In uno dei pazienti con Eterotopie nodulari associate ad atrofia dei nervi ottici e del chiasma, giri corticali semplificati, anomala girazione cerebellare e ipoplasia del verme sono in corso controlli a carico del gene TUBB2B. Un paziente presenta un quadro di Cobblestone complex associato ad atrofia cerebellare.

Disturbi dell'organizzazione neuronale sono presenti nella maggior parte dei pazienti reclutati nello studio (81/123, 66%). Tra questi il 49% è rappresentato da forme di Polimicrogiria, bilaterali (42 pazienti) e unilaterali (19 pazienti). Tra le forme bilaterali si evidenziano: PMG frontale (9 casi), frontoparietale (7 casi), Perisilviana (11 casi), Parasagittale parieto-occipitale (2 casi), Generalizzata (13 casi). PMG bilaterali e unilaterali sono presenti sia in forma isolata (32 soggetti) che associata a quadri malformativi sopra/sottotentoriali/ipoplasia dei nervi e/o dei tratti ottici (29 soggetti). Quadri di Schizencefalia sono presenti nel 10.5% dei soggetti (13/123). In tutti i soggetti la SCH appare associata, prevalentemente a PMG, agenesia del setto pellucido, ipoplasia dei nervi ottici, ACC e quadri malformativi in fossa cranica posteriore. Tra i soggetti con SCH, nel paziente con associate PMG, ACC, ipoplasia III nervo cranico, dismorfismi dei nuclei della base e del brainstem, è stata riscontrata una nuova mutazione nel gene TUBB2B (vedi oltre per descrizione dettagliata). Cinque pazienti presentano una Displasia Corticale Focale. In uno di questi, con associata semplificazione dei giri corticali, sono in corso controlli a carico del gene TUBA1A.

Dal punto di vista clinico, ritardo mentale è presente nella quasi totalità dei

soggetti (ritardo mentale grave in più dell'80% dei casi). Tre soggetti presentano QI nella norma, in sei casi si evidenzia uno stato cognitivo limite, con caduta prevalentemente in ambito linguistico. L'esame neurologico evidenzia quadri di tetraparesi aposturale/spastica nella maggioranza dei casi. In 7 soggetti è presente emiparesi, in circa il 20% dei casi sono presenti deficit motori minori. Circa l'80% dei casi presenta Epilessia (prevalentemente forme di encefalopatia epilettica tipo sindrome di West, CSWS- o forme focali con crisi farmacoresistenti). Deficit in ambito visivo (CVI, disturbi dell'oculomotazione, riduzione di acuità visiva, nistagmo) sono presenti in circa il 20 % dei casi. Tre soggetti presentano ipoacusia neurosensoriale.

Analisi molecolare dei geni TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8

I risultati in dettaglio sono qui di seguito illustrati:

Analisi del gene TUBA1A: è stata conclusa in 48/123 (39%) soggetti; risultato: negativo. In un paziente (*) controlli in corso;

Analisi del gene TUBB2B: è stata conclusa in 75/123 (61%) soggetti; risultato: negativo. In due pazienti (§°) controlli in corso;

Analisi del gene TUBB3: è stata conclusa in 12/123 (98.75%) soggetti; risultato: negativo.

Analisi del gene TUBA8: non è stata conclusa in nessun paziente.

Dato di rilievo in ambito molecolare è stato sino ad ora:

- il riscontro di nuova mutazione in eterozigosi nel gene TUBB2B, in una bambina di 8 anni e 8 mesi, seguita presso il nostro Istituto dal 2004, che presenta malformazione dello sviluppo corticale caratterizzata da schizencefalia (SCH) a labbra aperte in regione parietale posteriore sinistra, associata ad estese aree di polimicrogira bilateralmente, completa agenesia del corpo calloso, dismorfismi del tronco e ipoplasia del verme cerebellare in fossa cranica posteriore, ipoplasia del terzo nervo cranico dx. Il quadro clinico è caratterizzato da grave ritardo dello sviluppo neuropsichico, tetraparesi aposturale, ptosi e oftalmoplegia in occhio destro, epilessia farmacoresistente con crisi polimorfe. La mutazione, in precedenza mai descritta a carico del gene TUBB2B, è di tipo missense, localizzata nell'esone 4, c.419G>C, e determina la sostituzione di una Glicina con una Alanina (p.Gly140Ala) all'interno di una regione altamente conservata, causando un malfunzionamento della proteina, in particolare impedendo la formazione di microtubuli. Tale segnalazione consente di dimostrare una possibile eziologia genetica della SCH e il meccanismo fisiopatologico comune tra polimicrogira e SCH. Alla luce del risultato genetico è possibile inoltre includere la SCH nei "Tubulin-related disorders" ed ampliare lo spettro delle malformazioni dello sviluppo corticale associate a mutazioni del gene TUBB2B. Ciò conferma l'ipotesi che lo spettro di malformazioni cerebrali associato a mutazioni di geni codificanti

Tubuline è in continuo ampliamento, così come in via di definizione sono tutt'ora i reali meccanismi che sottendono la morfogenesi delle strutture corticali e i meccanismi di guida assonale.

I risultati della presente attività di ricerca corrente sono stati inoltre oggetto della seguente pubblicazione su rivista internazionale:

- R Romaniello, A Tonelli, F Arrigoni, C Baschiroto, F Triulzi, N Bresolin, MT Bassi, R Borgatti. A novel mutation in the β -tubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficit in axonal guidance. *Developmental Medicine & Child Neurology*. In press

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del 2012 verrà ampliato ulteriormente il campione di pazienti oggetto di studio, mediante il reclutamento di tutti i soggetti che afferiscono al nostro Istituto (Reparto Neuroriabilitazione 1, Laboratorio di Biologia Molecolare, Unità di Neuroradiologia IRCCS E. Medea Bosisio Parini; Poli Scientifici di Conegliano, San Vito e Ostuni) con malformazione dello sviluppo corticale individuati sulla base del reperto neuroradiologico.

Verrà completata l'analisi molecolare dei geni TUBA1A, TUBB2B, TUBB3, TUBA8 in ciascun soggetto arruolato nello studio.

Verrà approfondito e completato lo studio neuroradiologico di rivalutazione e classificazione dei quadri di MCD (secondo Classificazione di Barkovich 2005).

I casi risultati positivi all'analisi di mutazione, verranno sottoposti ad

- * un dettagliato protocollo di studio clinico

- * uno specifico protocollo neuroradiologico con MRI a 3 Tesla dotato di bobina dell'encefalo a 32 canali, comprendente valutazioni di trattografia mediante l'utilizzo di tecniche di diffusion tensor imaging DTI (Wahl et al 2010).

L'indagine neuroradiologica verrà condotta mediante scanner Philips-Achieva a 3 Tesla (Philips Medical Systems, Best, The Netherlands) con bobina phased-array a 32 canali. Verranno acquisite immagini morfologiche 3D T1-pesate (voxel isotropico 1x1x1 mm) e multiplanari 2D TSE T2-pesate (spessore 2 mm) e sequenza DTI sino a 32 direzioni (voxel isotropico 2x2x2 mm, b-values 0, 300, 1100). I dati DTI verranno processati mediante software TORTOISE (Diffusion Tensor MRI center, NIH, Bethesda, MD, United States) per la correzione degli artefatti e la valutazione dei parametri tensoriali derivati (FA, Lattice index, skewness ecc).

Una volta conclusa la ricerca, sarà possibile effettuare una migliore correlazione genotipo-fenotipo clinico e neuroradiologico, e verificare il ruolo esercitato da mutazioni nei geni codificanti per proteine appartenenti alla famiglia delle Tubuline nella eziopatogenesi delle MCD.

STUDIO DELLA REATTIVITÀ DELL'ASSE IPOTALAMO IPOFISARIO IN BAMBINI NATI FORTEMENTE PRETERMINE: FATTORI GENETICI E MECCANISMI EPIGENETICI ASSOCIATI ALLO STRESS SOCIALE

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio d'analisi cliniche; Laboratorio di Biologia Molecolare

Ospedale Generale di zona "Sacra Famiglia Fatebenefratelli" di Erba: Unità di Pediatria e Unità Operativa di Ostetricia e Ginecologia

Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano: Unità Operativa di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale

DESCRIZIONE

La nascita pretermine espone il bambino ad una condizione altamente stressante a causa della precoce separazione dalla figura materna e dell'esposizione prolungata ad un ambiente avverso il quale, oltre a fattori esterni (luci, rumori, ecc), prevede interventi invasivi e dolorosi. Globalmente, queste esperienze possono associarsi ad una maggiore reattività allo stress rilevata in questi bambini nel corso dello sviluppo (Perlman, 2001). La risposta allo stress è mediata dall'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-corticosurrene (HPA) che regola i meccanismi omeostatici in chiave adattativa. D'altra parte, uno stress prolungato può avere effetti dannosi sull'individuo (Tsigos & Chrousos, 2002) e pertanto le condizioni avverse a cui sono esposti i bambini pretermine si configurano come una situazione di alto rischio che può alterare la capacità di regolare le risposte agli eventi stressanti con effetti anche lungo termine (Perlman, 2001). È stato suggerito che la risposta allo stress sia mediata sia da meccanismi di natura genetica che di tipo epigenetico (Meaney, 2010), tuttavia il contributo di tali fattori alla reattività allo stress dei bambini pretermine non è ancora stato esplorato.

Per quanto riguarda i fattori genetici, ricerche sui modelli animali e umani han-

no evidenziato il ruolo giocato dal polimorfismo del 5-HTTLPR che coinvolge un'inserzione/delezione nella regione del promotore del gene del trasportatore della serotonina. Il polimorfismo ha effetti sulla regolazione dell'espressione dei recettori glucocorticoidi (GR) che consentono la ricaptazione del cortisolo a livello ippocampale (Meaney et al., 2000). Il 5-HTTLPR contempla due versioni alleliche: l'allele corto (S) del 5-HTTLPR è associato ad una più bassa efficienza trascrizionale rispetto alla versione lunga (L) (Lesch et al., 1996). L'allele S inoltre sarebbe correlato ad elevata reattività fisiologica allo stress (Kendler et al., 2005), con la secrezione di livelli più elevati di cortisolo anche in età adulta (Gotlib et al., 2008).

Accanto ai fattori genetici, è stata recentemente avanzata la possibilità che la reattività allo stress sia modulata da meccanismi funzionali di natura epigenetica. Studi condotti sui roditori hanno evidenziato che variazioni nelle cure materne nei primi giorni di vita sono associate a differenze nella risposta HPA allo stress nei cuccioli (Meaney et al., 2000). I cuccioli di madri che forniscono alti livelli di cure (ovvero comportamenti quali: leccarlo, tenere pulito il pelo, favorire l'allattamento) appaiono meno paurosi e mostrano una ridotta risposta HPA allo stress rispetto a cuccioli di madri con bassi livelli di cure. Inoltre, la qualità delle cure è associata ad alterazioni epigenetiche nell'espressione genica: la maggiore reattività allo stress nei cuccioli con madri con bassa qualità di accudimento si associa alla metilazione di alcuni siti CpG sul gene dei GR (Nr3c1), con conseguente diminuzione della espressione genica a livello ippocampale (Meaney et al., 2000). Un meccanismo simile è stato recentemente riportato anche con soggetti umani, in uno studio che ha coinvolto figli di madri depresse (Oberlander et al., 2008). Non solo la depressione materna pre-partum appare associata, nel bambino, ad una maggiore metilazione sul sito di codifica per i GR ippocampali (CpG3), ma l'aumentato stato di metilazione del gene Nr3c1 sul medesimo sito sarebbe predittivo della reattività dell'asse HPA del bambino quando, all'età di tre mesi, veniva posto di fronte ad una condizione sociale stressante.

Alla luce di quanto riportato la presente ricerca si propone di esaminare la reattività allo stress nei primi mesi di vita sia in bambini nati a termine che in bambini nati pretermine. Data la lunga esposizione di questi bambini nel corso delle ricovero in TIN a situazione avverse (separazione dalla madre, stimolazioni dolorose, stress ambientale, ecc.), la condizione di nascita pretermine rappresenta un modello non-sperimentale ideale per analizzare gli effetti precoci dello stress in chiave epigenetica. Le differenze individuali nella reattività ad uno stress sociale (paradigma Still-Face), a 3 mesi di vita (età corretta), saranno valutate attraverso la concentrazione dei livelli di cortisolo salivare e dell'attività vagale. Obiettivi principali dello studio sono: a) valutare il ruolo del polimorfismo 5-HTTLPR associato alle differenze individuali nella

reattività allo stress; b) valutare se la condizione di precoce esposizione allo stress in TIN si associ, nei pretermine comparati ai nati a termine, a differenti livelli di metilazione del gene Nr3c1, responsabile della sintesi di proteine che formano i recettori GR per il cortisolo.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso del 2011 sono state svolte le seguenti principali attività:

- 1) formalizzazione dello studio;
- 2) organizzazione dell'operatività;
- 3) avvio alle fase di reclutamento dei soggetti partecipanti.

1) Formalizzazione dello studio:

a. Analisi della letteratura e perfezionamento del protocollo dello studio con definizione operativa delle fasi del progetto, degli strumenti e delle procedure da utilizzare;

b. Stesura dei documenti relativi alla privacy (lettera informativa genitori, consenso informato alla ricerca, alle procedure previste da protocollo e al trattamento dei dati, ecc.);

c. Il protocollo è stato sottoposto al Comitato Etico dell'Istituto nel Gennaio 2011 ed è stato ratificato nel mese di Marzo 2011.

d. Il protocollo è stato successivamente ratificato dal Comitato Etico degli enti collaboranti (Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli di Milano e Ospedale Fatebenefratelli di Erba) rispettivamente nei mesi di Ottobre e Novembre 2011.

2) Organizzazione dell'operatività:

a. Acquisto della strumentazione: test self-report; hardware (videocamere, personal, ecc.); materiale di laboratorio per le analisi genetiche e biologiche;

b. Verifica della funzionalità della strumentazione;

c. Incontri con i responsabili dei reparti e ricercatori locali degli Enti che partecipano al progetto per il perfezionamento della collaborazione, incluso le necessarie procedure formali di accesso alle Unità e le modalità per il coinvolgimento sia del personale che dei genitori;

d. Incontri rivolti al personale dei reparti di entrambi gli Enti coinvolti nello studio sugli scopi e le procedure della ricerca con l'obiettivo principale di favorirne la compliance;

e. Incontri operativi con i ricercatori locali per la messa a punto delle procedure di selezione della casistica, di coinvolgimento dei genitori dei bambini

eleggibili e di supporto operativo-logistico.

3) Avvio alle fase di reclutamento dei soggetti partecipanti:

a. Nel mese di Ottobre ha seguito della ratifica del progetto da parte dei Comitati Etici (vedi punto 1.d) ha preso avvio il reclutamento dei bambini pretermine presso l'Unità Operativa di Neonatologia e Terapia Intensiva Neonatale della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. Al momento sono state reclutate 10 diadi madre-bambino. Come previsto dalle procedure operative del protocollo sono stati acquisiti i moduli di consenso, le informazioni socio-anagrafiche e cliniche. Sono stati inoltre raccolti i campioni di materiale biologico che sono stati trasferiti e conservati presso l'IRCCS Medea;

b. Nel mese di Dicembre presso l'Ospedale Fatebenefratelli di Erba (CO) si sono avviate le fasi iniziali del reclutamento dei bambini nati a termine (primo contatto con madri partecipanti ai corsi preparto).

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del prossimo anno si prevede di attuare le seguenti principali attività:

1. Proseguimento del reclutamento dei bambini pretermine e delle attività di raccolta, registrazione e archiviazione/conservazione dei dati clinici e biologici previsti dal protocollo per la fase neonatale e predimissiva. In queste fasi è inclusa la somministrazione dei questionari alle madri relativi al loro stato emozionale.
2. Proseguimento del reclutamento dei bambini a termine e delle attività di raccolta, registrazione e archiviazione/conservazione dei dati clinici e biologici previsti dal protocollo per la fase neonatale.
3. Con il compimento del terzo mese di vita dei bambini (età corretta nel caso dei pretermine) saranno effettuate le videoregistrazione dell'interazione madre-bambino secondo il paradigma Still-Face. In concomitanza verranno eseguiti i prelievi di livelli di cortisolo salivare e dell'attività vagale dei partecipanti. Inoltre questa fase è inclusa la somministrazione dei questionari alle madri relativi sia al loro stato emozionale, al supporto sociale percepito che alle caratteristiche comportamentali del bambino.

STUDIO DELLO STRESS CRONICO NEI BAMBINI PRETERMINE: ANALISI DEL CORTISOLO DEL CAPELLO COME BIOMARKER BIOLOGICO A LUNGO TERMINE E DELLA COVARIAZIONE DEI FATTORI GENETICI, EPIGENETICI E AMBIENTALI NELLA RESILIENZA INFANTILE

DR. RENATO BORGATTI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio d'analisi cliniche; Laboratorio di Biologia Molecolare

Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena di Milano: Unità di Patologia Neonatale

Ospedale Generale di zona "Sacra Famiglia Fatebenefratelli" di Erba: Unità di Pediatria,

University of Massachusetts, Boston, USA: Department of Psychology

DESCRIZIONE

I bambini nati pretermine presentano un'alterazione del funzionamento dell'asse HPA e la condizione di stress prolungato a cui sono esposti si configura come una situazione ad alto rischio che può alterare la formazione e il funzionamento della risposta allo stress con effetti anche a lungo termine (Perlman 2001). Gli studi che si sono occupati dello stress nel bambino pretermine hanno finora utilizzato marker biologici utili a rilevare la risposta a fattori di stress acuto, come il cortisolo misurato nel sangue, nelle urine e nella saliva. Tuttavia, questi marker variano ampiamente nel corso del giorno e sono altamente sensibili al contesto. Inoltre, non sono informativi dell'accumulo di stress che il bambino subisce in un certo lasso di tempo. Studi recenti sull'animale e sull'uomo hanno identificato come possibile biomarker dello stress cronico il livello di cortisolo del capello (Van Uum et al., 2008; Yamada et al., 2007; Dettenborn et al., 2010; Pereg et al., 2010). Il livello del cortisolo nel capello è una misura non-invasiva di stress e della dis-regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi surrene (HPA) che ha dato prova di essere un indice affidabile di stress cronico e cumulativo, in genere relativo ad un

periodo compreso tra i 3 e i 6 mesi (Hamel, et al, 2011; De Santis et al, 2007). Il presente studio si propone di analizzare lo stress cronico nei bambini nati pretermine e nelle loro madri utilizzando il cortisolo del capello come marker biologico. Una precedente ricerca ha evidenziato una differenza nei livelli di cortisolo del capello tra bambini nati a termine e pretermine ospedalizzati per almeno 30 giorni (Yamada e al., 2006). Tuttavia, lo studio non teneva conto di altri fattori che possono modulare la risposta lo stress ed era limitato al periodo di ospedalizzazione. In effetti esistono ampie differenze individuali nell'adattamento allo stress che possono in parte essere attribuibili sia al ruolo di alcuni polimorfismi genetici che a meccanismi di natura epigenetica. Inoltre, alcuni variabili ambientali (ad esempio la qualità della relazione madre bambino) possono svolgere una funzione di modulazione dello stress cronico infantile (resilienza).

L'obiettivo della presente ricerca corrente è indagare i livelli di stress cronico nel corso dei primi sei mesi di vita in bambini pretermine e delle loro madri utilizzando la metodica del cortisolo del capello. Per valutare il contributo di fattori genetici ed epigenetici sulla resilienza dei bambini sarà analizzati il polimorfismo del gene 5-HTTLPR e lo stato di metilazione del gene NR3C1. Entrambi hanno importanti implicazioni nella regolazione dell'espressione dei recettori glucocorticoidi (GR) che consentono la ricaptazione del cortisolo a livello ippocampale (Uher & McGuffin, 2010; Meaney et al., 2000). Infine, per determinare il ruolo della relazione affettiva precoce nella risposta allo stress cronico del bambino, sarà valutato lo stile relazionale materno e il comportamento socio-emozionale del bambino il comportamento materno nel corso di interazioni viso-a-viso.

Allo studio prenderanno parte un gruppo di bambini fortemente pretermine sani (≤ 32 settimane di età gestazionale e/o ≤ 1500 grammi di peso alla nascita) e le rispettive madri e un gruppo di controllo di bambini nati a termine sani e le rispettive madri. L'analisi dei polimorfismi e dello stato di metilazione dell'Nr3c1 sarà condotta utilizzando campioni di sangue. Nel caso dei pretermine il materiale ematico sarà ottenuto da due prelievi: il primo dal funicolo ombelicale e il secondo in predimissione, in concomitanza di prelievi che fanno parte delle procedure previste dalla prassi clinica delle terapie Intensive neonatali. Nel caso dei nati a termine il sangue sarà ottenuto dal funicolo ombelicale che normalmente viene prelevato per i controlli relativi all'analisi della compatibilità materno-fetale. Per indagare i livelli di stress cronico del bambino e della madre, al terzo (T1) e al sesto mese (T2) di vita del bambino (età corretta per i pretermine) sarà prelevato da entrambi un campione di capelli secondo una procedura e una metodologia standard (3 cm x 1cm²; 50 mg; Davenport, et al., 2006). Inoltre, sempre a T1 e a T2 la madre e il bambino parteciperanno ad un'interazione viso-a-viso. Infine, verranno raccolti

dati socio-demografici e somministrati alla madre strumenti self-report utili a rilevare: il profilo temperamentale del bambino, il proprio stato emotivo e le eventuali esperienze avverse sperimentate nei mesi precedenti.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del 2012 sono previste le seguenti principali attività:

- 1) formalizzazione dello studio;
- 2) organizzazione dell'operatività;
- 3) avvio alle fasi di reclutamento dei soggetti partecipanti e criticità.

1) Formalizzazione dello studio:

- a. Stesura dei documenti relativi alla privacy (lettera informativa genitori, consenso informato alla ricerca, alle procedure previste da protocollo e al trattamento dei dati);
- b. Il protocollo dello studio sarà poi sottoposto al Comitato Etico dell'Istituto e alla eventuale ratifica, se richiesta, da parte degli altri Enti coinvolti.

2) Organizzazione dell'operatività:

- a. Acquisto e attuazione delle procedure di verifica della strumentazione necessaria all'analisi dei campioni di capelli prelevati, da effettuarsi a carico del Laboratorio d'analisi cliniche (Dr.ssa Maria Elisabetta Raggi) dell' IRCCS "E. Medea" di Bosisio Parini (LC).
- b. Il reclutamento dei bambini pretermine e dei bambini nati a termine sarà reso possibile grazie alla collaborazione di due strutture ospedaliere esterne all'IRCCS E. Medea: l'Unità di Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell'Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano, e i Reparti di Pediatria e Ginecologia dell'Ospedale Fatebenefratelli di Erba (CO).
- c. Sono previsti incontri di natura organizzativa con i Responsabili dell'Unità esterne partecipanti allo studio per la messa a punto delle necessarie procedure formali di accesso al reparto e per il coinvolgimento sia del personale che dei genitori.
- d. Saranno tenuti incontri di formazione del personale dell'Unità esterne per l'organizzazione relativa alla selezione della casistica, al coinvolgimento dei genitori dei bambini eleggibili e al supporto operativo-logistico nel corso delle sessioni di osservazione dell'interazione madre bambino previste dal protocollo a 3 e 6 mesi di vita del bambino.

3) Avvio alle fase di reclutamento dei soggetti partecipanti e criticità:

a. Al completamento delle attività previste ai punti 1) e 2) sarà possibile avviare il reclutamento dei bambini secondo i criteri di inclusione descritti nel protocollo dello studio.

b. Rispetto al prelievo del capello prevediamo due criticità. A causa di una notevole differenza individuale nella crescita del capello è possibile che in T1 non sarà sempre possibile raccogliere una sufficiente quantità di capelli per tutti i bambini. Allo stesso tempo pur aderendo alla ricerca alcune madri potrebbero per ragioni estetiche essere riluttanti ad acconsentire al prelievo della quantità di capelli necessaria per le analisi.

ELABORAZIONE CONFIGURALE E DI DETTAGLIO NELLA PERCEZIONE DI STIMOLI SOCIALI: BASI NEURALI, SVILUPPO E INFLUENZA DELL'INTERAZIONE MADRE BAMBINO

DR. COSIMO URGESI

E-MAIL: COSIMO.URGESI@UNIUD.IT

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: U.O. Neuroriabilitazione 1

DESCRIZIONE

Introduzione

La rappresentazione nervosa dell'oggetto corpo sembra essere parzialmente indipendente da quella degli oggetti extracorporei (Berlucchi & S. Aglioti 1997). In particolare, la percezione visiva del corpo coinvolge aree occipito-temporali (Downing et al. 2001; Urgesi et al. 2004) e fronto-parietali (Rizzolatti & Craighero 2004) (Urgesi, Candidi, et al. 2007), che sono coinvolte in due diverse strategie di elaborazione (Urgesi, Calvo-Merino, et al. 2007). La modulazione dell'uso di strategie di elaborazione configurale o locale di corpi può essere effettuata presentando le immagini in orientamento canonico o rovesciato (effetto di inversione). L'inversione degli stimoli corporei peggiora la prestazione, in quanto impedisce una strategia di elaborazione globale. L'effetto di inversione è presente per stimoli sociali (corpi e volti), ma non per altre categorie di oggetti. L'elaborazione configurale delle posture corporee sembra coinvolgere rappresentazioni simulative nelle aree motorie che sono implicate sia durante l'esecuzione di un'azione che durante l'osservazione e l'imitazione della stessa (Rizzolatti & Craighero 2004; Carr et al. 2003; Hennenlotter et al. 2005). In particolare, la stimolazione magnetica della corteccia premotoria ventrale di sinistra interferisce con la prestazione di individui sani sia nella imitazione (Heiser et al. 2003) sia riconoscimento visivo di azioni (Urgesi, Candidi, et al. 2007), eliminando il tipico effetto di inversione per le posture corporee (Urgesi, Calvo-Merino, et al. 2007). Questi risultati suggeriscono, quindi, che l'efficienza dell'elaborazione configurale del corpo (e

probabilmente dei volti) possa essere correlata alle capacità di imitazione (Carr et al. 2003). Poco è noto su come questi due processi possano influenzare la qualità dell'interazione precoce madre-bambino. Questo è un po' sorprendente se si pensa che la relazione madre-bambino costituisce una condizione interattiva "naturale" nel corso della quale le madri, data la ridotta possibilità di ricorso all'utilizzo del linguaggio verbale, utilizzano notevolmente l'imitazione per rendere efficace la comunicazione con il loro bambino (Moran et al., 1987; Striano, Henning, & Stahl, 2005). Peraltro, in situazioni di rischio evolutivo, come nel caso della nascita pretermine, si osserva una minore sensibilità materna e più bassi livelli di sincronia madre-bambino (Feldman, 2007; Montiroso et al., 2010). La condizione di stress emozionale sperimentato da questi madri (Montiroso et al., 2011) potrebbe influenzare la loro efficienza sia dell'elaborazione configurale che dell'imitazione sociale, con effetti sulla qualità della loro responsività nell'interazione precoce.

Obiettivi e Risultati Attesi

Un filone di studi indagherà lo sviluppo tipico dell'elaborazione configurale di stimoli sociali. Mentre diversi studi suggeriscono una comparsa precoce dell'effetto di inversione per le facce, nessuno studio ha finora indagato lo sviluppo dell'effetto inversione per i corpi.

In un primo studio sarà studiato come cambia l'effetto di inversione con l'aumentare dell'età in bambini in età prescolare e scolare. Si valuterà anche come la somiglianza della struttura corporea tra modello e osservatore possa influenzare l'elaborazione configurale di stimoli sociali. Tale aspetto è di notevole importanza teorica e clinica, in quanto potrebbe trovare applicazioni importanti nell'ambito dello studio delle abilità di percezione sociale in madri e bambini con malformazioni somatiche (Montiroso et al. 2011). In fasi successive saranno anche utilizzati la registrazione dei movimenti saccadici, in bambini e adulti, e la Stimolazione Magnetica Transcranica su aree premotorie, parietali e temporali in adulti. Questo consentirà una più approfondita descrizione del pattern di elaborazione configurale degli stimoli e delle sue basi neurali. Tali studi potrebbero fornire informazioni importanti sugli effetti di patologie del neurosviluppo sulla percezione di stimoli sociali.

In un secondo filone sarà esplorata la reciproca influenza tra elaborazione configurale di stimoli sociali e relazione madre-bambino nel primo anno di vita. La prima sarà indagata sottoponendo alle madri un paradigma di effetto di inversione che utilizza stimoli sociali familiari ed estranei (volto e corpo del proprio figlio vs. di altri bambini), mentre la relazione precoce sarà valutata in termini di imitazione reciproca attraverso una procedura di interazione faccia-a-faccia tra madre e bambino. Verranno presi in considerazione due gruppi

di diadi, uno composto da madri e bambini nati a termine e un altro composto da madri e bambini nati pretermine. Questo permetterà di esaminare i possibili effetti di una condizione di rischio quale la nascita pretermine sull'elaborazione configurale di stimoli sociali da parte della madre e sull'abilità di imitazione reciproca della diade, descrivendo un correlato neuropsicologico delle possibili difficoltà che si possono presentare.

ATTIVITÀ PREVISTE

Il presente progetto di ricerca si propone di indagare come l'utilizzo di strategie di elaborazione configurale di stimoli sociali sia influenzato e influenzi a sua volta le interazioni sociali del bambino in età prescolare. Verranno utilizzati metodi psicofisici, di registrazione dei movimenti oculari in bambini e adulti, tecniche neurofisiologiche (stimolazione magnetica transcranica) in individui adulti, metodi di videoregistrazione delle interazioni madre-bambino e strumenti self-report compilati dalle madri.

Il progetto prevede tre fasi annuali da svolgersi nell'arco di tempo gennaio 2012 – dicembre 2014.

Fase 1 (gennaio 2012-dicembre 2012). Nella prima fase sarà indagato lo sviluppo tipico dell'elaborazione configurale di stimoli sociali attraverso uno studio trasversale di bambini di diverse fasce di età e di adulti. In un primo studio sarà studiato come cambia l'effetto di inversione con l'aumentare dell'età in bambini in età prescolare e scolare. I bambini avranno un'età variabile tra i 3 e i 9 anni e saranno reclutati in alcune scuole dell'infanzia e primarie del Friuli Venezia Giulia. Saranno reclutati bambini senza alcuna patologia neurologica o psichiatrica. Il numero approssimativo di bambini che si intende testare è di 10 bambini per fascia di età, per un numero complessivo di 70 soggetti circa. Sarà testato inoltre un gruppo di 40 soggetti adulti. Il sesso dei partecipanti sarà bilanciato in ogni fascia di età.

Sarà usato un paradigma comportamentale di delayed matching to sample, in cui i partecipanti dovranno indicare quale di due stimoli di confronto corrisponde ad uno stimolo di riferimento presentato precedentemente. Gli stimoli potranno rappresentare le posture corporee o i volti di diversi individui o immagini di scarpe. Per le immagini del corpo saranno usati corpi interi con la faccia degli attori (una coppia maschile ed una femminile) sfumata, al fine di garantire che l'esecuzione della discriminazione sia trasmessa esclusivamente dal corpo, senza essere alterata dalla componente facciale. Le posture corporee saranno selezionate in modo da suggerire una percezione di movimento implicato. Gli stimoli facciali rappresenteranno 8 coppie di individui (4 maschili e 4 femminili) con espressione neutrale. Come stimolo di

controllo saranno utilizzate foto di scarpe di tipo femminile e di tipo maschile. Tutti gli stimoli saranno presentati sia in orientamento canonico che invertito, quest'ultimo ottenuto ruotando di 180° le immagini originali. Saranno presentati 64 trial per ogni categoria di stimolo, con presentazione randomizzata di stimoli in orientamento canonico e invertito. In ogni trial ogni postura verrà presentata per 2 secondi seguita dalla presentazione per 500 msec di una maschera. Successivamente saranno presentate due immagini di confronto tra le quali i partecipanti dovranno individuare lo stimolo target. I due stimoli di confronto rappresenteranno le posture corporee o i volti di due individui diversi oppure due diversi modelli di scarpe. Le risposte saranno fornite verbalmente e l'esaminatore registrerà le risposte sul computer. Questa procedura, pur non consentendo di registrare i tempi di reazione, assicurerà una maggiore affidabilità di registrazione delle risposte dei bambini.

In un secondo studio parallelo sarà esplorata la reciproca influenza tra elaborazione configurale di stimoli sociali e relazione madre-bambino nel primo anno di vita in condizioni di rischio e non. Prenderanno parte allo studio due gruppi di diadi madre-bambino, uno con bambini nati a termine e l'altro con bambini pretermine (peso alla nascita ≤ 1500 grammi e/o età gestazionale ≤ 32 settimane). Le coppie parteciperanno ad una sessione osservativa al raggiungimento dei sei mesi di età del bambino (età corretta nel caso dei bambini pretermine). La sessione comprenderà una procedura di interazione faccia-a-faccia, della durata di 5 minuti, che permetterà di valutare la frequenza dei comportamenti di imitazione reciproca messi in atto da madre e bambino. Inoltre le madri parteciperanno ad un paradigma di effetto di inversione in cui saranno usati corpi e volti dei propri figli o di bambini sconosciuti presentati in orientamento canonico o invertito. Nella stessa sessione saranno raccolte informazioni relative allo stato emotivo e al grado di reattività interpersonale della madre e alla percezione materna del temperamento del proprio bambino. A tal fine, alle madri sarà chiesto di compilare una batteria di strumenti self-report.

Fase 2 (Gennaio 2013-Dicembre 2013): Nella seconda fase un gruppo selezionato di bambini e un gruppo di adulti svolgeranno un compito di discriminazione same-different con stimoli in orientamento canonico o invertito mentre saranno registrati i movimenti saccadici di esplorazione dello stimolo di confronto. In questo modo sarà possibile valutare su quali parti del corpi si concentrino bambini e adulti e come questo influenzi la percezione sociale. La preparazione di questo studio consentirà inoltre di acquisire presso i gruppi dell'IRCCS Medea di San Vito al Tagliamento e di Bosisio Parini il know how e l'apparecchiatura per utilizzare l'eye tracker nei bambini, che ha importanti potenzialità per lo studio non invasivo dello sviluppo neurocognitivo della percezione sociale e non.

Fase 3 (Gennaio 2014-Dicembre 2014). Nella terza fase saranno esplorate le basi neurali dell'elaborazione configurale di stimoli sociali utilizzando la Stimolazione Magnetica Transcranica in individui adulti durante l'esecuzione di un paradigma di effetto di inversione. In accordo al nostro precedente studio (Urgesi, Calvo-Merino, et al. 2007), saranno stimulate aree premotorie, parietali e temporali durante un paradigma di effetto di inversione con corpi, volti e oggetti. La novità di questo studio sarà la possibilità di valutare l'effetto della stimolazione sui movimenti oculari di esplorazione dello stimolo di confronto, consentendo quindi una più approfondita descrizione del pattern di elaborazione degli stimoli. Saranno stimulate aree premotorie, parietali e temporali durante un paradigma di effetto di inversione con corpi, volti e oggetti. Saranno reclutati 48 soggetti (studenti dell'Università degli Studi di Udine) senza disturbi di tipo neurologico, psichiatrico e/o di altro tipo e senza controindicazioni all'uso della TMS. In due gruppi separati saranno stimulate le aree premotorie, parietali e temporali dell'emisfero sinistro e destro. Per determinare l'intensità di stimolazione da applicare durante rTMS, verrà stimolata con singoli impulsi l'area motoria primaria di ciascun soggetto onde individuare la soglia di eccitabilità motoria. Per registrare i Potenziali Evocati Motori (PEM) di ciascun soggetto, verrà utilizzato un elettromiografo Viking IV con degli elettrodi di superficie Ag-AgCl di 1 cm di diametro posizionati a livello del muscolo primo interosseo dorsale (first dorsal interosseus: FDI) della mano destra. In accordo a precedenti studi (Urgesi, Calvo-Merino, et al. 2007) sarà usato un paradigma di rTMS on line consistente in 2 impulsi a una frequenza di 10Hz (intervallo interimpulso di 100 msec) con un ritardo di 150 msec rispetto all'onset dello stimolo target. L'intensità della stimolazione sarà fissata al 120% della soglia motoria a riposo. Per la localizzazione dei siti di stimolazione sarà usato un sistema di neuronavigazione stereotassica, il Softaxic (EMS, Bologna), che consentirà anche di monitorare la posizione del coil sullo scalpo durante l'esperimento. Saranno registrate sia le risposte fornite dai soggetti che il loro pattern di movimenti oculari durante l'osservazione degli stimoli di confronto, in modo da evidenziare cambiamenti non solo nell'efficienza del sistema di elaborazione percettiva di tipo configurale ma anche eventuali cambiamenti della strategia esplorativa utilizzata dai soggetti per rispondere.

Risultati attesi. I risultati degli studi consentiranno una maggiore comprensione delle dinamiche di sviluppo e delle basi neurali dell'elaborazione configurale di stimoli sociali. Consentiranno inoltre di mettere in relazione tale abilità con la capacità di imitazione reciproca tra madre e bambino nei primi mesi di vita. I risultati degli studi saranno pubblicati in riviste scientifiche internazionali peer-reviewed e saranno presentati a congressi nazionali e internazionali. Si

prevede la pubblicazione di due articoli su riviste psicologiche e due articoli su riviste di neuroscienze.

Riferimenti Bibliografici

- Berlucchi, G. & Aglioti, S., 1997. The body in the brain: neural bases of corporeal awareness. *Trends in neurosciences*, 20(12), pp.560-4.
- Carr, L. et al., 2003. Neural mechanisms of empathy in humans: a relay from neural systems for imitation to limbic areas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), pp.5497-502.
- Downing, P.E. et al., 2001. A cortical area selective for visual processing of the human body. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5539), pp.2470-3.
- Feldman R. & Eidelman A.I., 2007. Maternal Postpartum Behavior and the Emergence of Infant–Mother and Infant–Father Synchrony in Preterm and Full-Term Infants: The Role of Neonatal Vagal Tone. *Developmental Psychobiology*, 49: 290–302.
- Heiser, M. et al., 2003. The essential role of Broca’s area in imitation. *European Journal of Neuroscience*, 17(5), pp.1123-1128.
- Hennenlotter, A. et al., 2005. A common neural basis for receptive and expressive communication of pleasant facial affect. *NeuroImage*, 26(2), pp.581-91.
- Montiroso, R. et al., 2010. A comparison of dyadic interactions and coping with still-face in healthy pre-term and full-term infants. *The British journal of developmental psychology*, 28(Pt 2), pp.347-68.
- Montiroso, R. et al., 2011. The Role of Negative Maternal Affective States and Infant Temperament in Early Interactions Between Infants With Cleft Lip and Their Mothers. *Journal of pediatric psychology*.
- Moran, G., Krupka, A., Tutton, A. & Symons, D., 1987. Patterns of maternal and infant imitation during play. *Infant Behavior and Development*, 10, pp.477-491.
- Rizzolatti, G. & Craighero, L., 2004. The mirror-neuron system. *Annual review of neuroscience*, 27, pp.169-92.
- Striano T., Henning A. & Stahl D. (2005). Sensitivity to social contingencies between 1 and 3 months of age. *Developmental Science* 8, 509–518.
- Urgesi, C., Berlucchi, G. & Aglioti, S.M., 2004. Magnetic stimulation of extrastriate body area impairs visual processing of nonfacial body parts. *Current Biology*, 14(23), pp.2130–2134.
- Urgesi, C., Calvo-Merino, B., et al., 2007. Transcranial magnetic stimula-

tion reveals two cortical pathways for visual body processing. *The Journal of Neuroscience*, 27(30), pp.8023-30.

- Urgesi, C., Candidi, M., et al., 2007. Representation of body identity and body actions in extrastriate body area and ventral premotor cortex. *Nature neuroscience*, 10(1), pp.30-1.

SINDROME DI ANGELMAN: DEFINIZIONE DI LINEE GUIDA PER LA RIABILITAZIONE

DR. PAOLO BONANNI

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

Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

Centri di Riabilitazione dell'Associazione "La Nostra Famiglia"

DESCRIZIONE

La Sindrome di Angelman (AS) è una malattia neurogenetica rara clinicamente caratterizzata da: grave ritardo mentale; assenza di linguaggio con netta discrepanza tra linguaggio espressivo e ricettivo; facies tipica, atassia, marcia su base allargata con braccia a guardia alta; ipotonia assiale; alterazione della motricità fine e grossolana; incoordinazione motoria con movimenti scomposti; scoliosi; epilessia con elettroencefalogramma tipico; iperattività, deficit d'attenzione; disturbi del sonno. Esistono quattro meccanismi molecolari che portano a SA: microdelezione interstiziale della regione 15q11-13 del cromosoma 15 materno, classe genetica I; disomia uniparentale paterna (DUP), classe genetica II; difetto dell'imprinting, classe genetica III; mutazione del gene UBE3A, classe genetica IV. Esiste la classe genetica V che comprende soggetti con diagnosi clinica di SA e negatività dei test molecolari. La mancanza funzionale del gene UBE3A è alla base del fenotipo.

L'eterogeneità, la specificità del fenotipo clinico e comportamentale comportano necessariamente un approccio "complesso-globale" al bambino affetto da SA condotto da un'equipe multidisciplinare. L'inquadramento dei bisogni, il profilo funzionale ed il progetto riabilitativo devono essere realizzati a partire da una stretta collaborazione tra neuropsichiatra infantile, fisiatra, pediatra, oculista, fisioterapista, logopedista, psicologo, psicomotricista, terapeuta occupazionale e pedagogo.

Nella letteratura internazionale non esistono linee guida per la riabilitazione

dei pazienti affetti da SA e risultano scarsi anche lavori riguardo l'approccio riabilitativo specifico per la sindrome, in particolar modo logopedico e fisioterapico.

Premesso questo e considerate anche la varietà di presentazione clinica e la complessità delle funzioni coinvolte le proposte terapeutico-riabilitative attuate dai diversi servizi risultano estremamente disomogenee talvolta addirittura contrastanti. Emerge quindi chiaramente quanto sia necessaria la costituzione di linee guida riabilitative da un lato per il paziente e la famiglia che potranno finalmente ricevere indicazioni chiare ed univoche e prestazioni altrettanto coerenti, dall'altro per tutti i medici e gli specialisti che prendono in carico il paziente affetto da SA.

Dal 2006 presso la UO di Epilessia e Neurofisiologia Clinica dell'IRCCS "E. Medea", Polo Regionale di Conegliano (TV), grazie alla stretta collaborazione con l'associazione Italiana della Sindrome di Angelman, è stato avviato un follow-up dedicato a pazienti affetti da SA provenienti da tutta Italia. Per ciascun paziente accolto in regime di ricovero ordinario o di day-hospital viene effettuata una completa presa in carico diagnostica, terapeutica e riabilitativa (diretta se i pazienti sono delle vicinanze o indiretta, con formulazione di indicazioni di trattamento per l'equipe territoriale, se fuori regione). Direttamente presso il nostro Centro eseguiamo la valutazione epilettologica e neurofisiologica, la valutazione neuropsichiatrica, fisiatrica, fisioterapica, logopedica e psicologica a cui si aggiungono visita oculistica, odontoiatrica, valutazioni di psicomotricità e di terapia occupazionale quando necessari. In caso di necessità di diagnosi genetica ci rivolgiamo al laboratorio di genetica della sede dell'IRCCS di Bosisio o all'IRCCS Auxologico. Per la parte di neuroimmagini (morfologiche e funzionali) è stata avviata una collaborazione con il CNR di Pisa.

Casistica: complessivamente sono seguiti per il follow-up valutativo circa 70 pazienti affetti da S. di Angelman

Questo progetto nasce con lo scopo di:

- Individuare indicazioni di trattamento sulla base dell'esperienza clinica maturata fino ad oggi.
- Definire le linee guida per la riabilitazione dei pazienti affetti da SA destinate ai medici specialisti responsabili dei progetti riabilitativi individuali, a tutti gli specialisti che intervengono in diversi ambiti nella valutazione e nel trattamento dei pazienti affetti da SA nonché alle loro famiglie.
- Validare le linee guida su un gruppo selezionato di pazienti che eseguono valutazione e riabilitazione presso altri centri nazionali de La Nostra Famiglia.

ATTIVITÀ PREVISTE

Per ciascun paziente accolto in regime di ricovero programmato o di Day-Hospital si conducono sedute di valutazione neuropsichiatrica e neurofisiologica, fisiatrica, fisioterapica, logopedica e psicologica a cui si aggiungono visita oculistica, odontoiatrica, valutazioni di psicomotricità e di terapia occupazionale quando necessari.

Gli strumenti valutativi ed i cenni di approccio riabilitativo sono qui di seguito riportati:

Indagini neurofisiologiche: Video-EEG poligrafico veglia e sonno; Back averaging; Potenziali Evocati Somatosensoriali arti superiori; Potenziali Evocati visivi da Flash; Potenziali Evocati Acustici

Obiettivi delle registrazioni: individuare l'eziologia epilettica/non-epilettica degli episodi; diagnosi differenziale con disturbi del comportamento, del movimento, stati di agitazione, tremore, mioclono. Lo studio con potenziali evocati contribuirà alla comprensione della patogenesi del disturbo.

Valutazione neuropsichiatrica: Colloquio clinico al fine di definire la storia del paziente con una particolare attenzione riservata alla ricostruzione della storia naturale dell'epilessia (esordio, eventi concomitanti, tipo/tipi di crisi, frequenza degli episodi, durata di malattia) correlata alla storia farmacologica (terapia in atto, terapie precedenti, risposta ai farmaci). Interferenza dell'epilessia sullo sviluppo neurologico e cognitivo del bambino. Ricerca di eventuali manifestazioni parossistiche non epilettiche come accessi di riso, stereotipie, episodi di incantamento, reflusso gastro-esofageo.

Valutazione delle indagini neurofisiologiche correlate alle manifestazioni cliniche

Definizione del trattamento farmacologico, efficacia, effetti collaterali ed interazione con la vita quotidiana.

Valutazione fisiatrica: Osservazione della motilità e del comportamento spontaneo; valutazione della modalità di spostamento a tappeto; Valutazione di rachide, bacino, ginocchia e piedi in stazione eretta; Distanza intermalleolare; Impronta dei piedi; Valutazione dei disturbi del movimento a riposo e nei cambi posturali; Valutazione articolare passiva; Valutazione di tono muscolare e clono con manovre di stiramento muscolare lento e veloce; Riflessi osteo-tendinei; Misurazione della lunghezza degli arti inferiori; Valutazione di abilità motorie dinamiche; Elettromiografia dinamica.

Valutazione fisioterapica: G.M.F.M. (Gross Motor Function Measure); Wee-FIM (Functional Independence Measure); Esame articolare (STRF); Esame del tono secondo Ashworth; Esame del clono; Videoregistrazione di passaggi posturali, modalità di spostamento a terra, cammino con o senza ausili/

ortesi se in uso

Obiettivi della riabilitazione: favorire i passaggi posturali; la stabilizzazione in stazione eretta; l'appoggio dei piedi di pianta; l'equilibrio in posizione seduta ed eretta; il carico simmetrico; la deambulazione autonoma; l'acquisizione di abilità motorie complesse (salire/scendere le scale, bicicletta); ridurre la base d'appoggio e l'atteggiamento degli arti superiori a guardia alta; rendere armonici fluidi e più sicuri i movimenti già acquisiti; prevenire/limitare l'insorgenza di retrazioni muscolari; limitare il progredire delle deformità scoliotiche. Valutazione logopedica: Aspetto comunicativo: intenzionalità comunicativa; contatto oculare; mimica facciale; triangolazione dello sguardo; scelta tra oggetti, foto, simboli; capacità di esprimere sì/no; capacità di puntamento; Aspetto prassico-alimentare: prassie orali attive; prassie passive; valutazione della scialorrea; sensibilità del distretto orale.

Obiettivi della riabilitazione: stimolazione delle prassie orali attivamente e passivamente; integrazione di modalità comunicative non verbali naturali come gesti ed espressioni del viso con percorso di CAA.

Valutazione psicologica: Colloquio con i genitori, somministrazione di scale Vineland; analisi delle modalità comportamentali, relazionali, comunicative; Valutazione cognitiva: somministrazione di Bayley III/Griffiths (GMDS-ER).

Obiettivi: stesura di un progetto abilitativo/riabilitativo individualizzato tenendo conto le caratteristiche peculiari del soggetto ed il suo contesto di vita al fine di fornire indicazioni alle figure di riferimento (famiglia, scuola, educatori, terapisti) con lo scopo di potenziare le abilità, migliorare l'autonomia e l'integrazione sociale; migliorare la tenuta attentiva e ridurre la distraibilità; potenziare le abilità cognitive, le abilità di motricità fine e coordinazione oculo-manuale; comprensione del linguaggio; intenzionalità comunicativa ed uso di oggetti/foto per la CAA.

Visita oculistica: Ipopigmentazione iridea e coroideale; Esotropia/axotropia; Errori refrattivi

Dal punto di vista metodologico il progetto si dividerà in due fasi: nella Fase 1 basandoci sull'esperienza clinica, verranno elaborate delle indicazioni di trattamento divise per fasce d'età; sempre in questa fase dalla elaborazione dei dati clinici ottenuti contiamo di ricavare evidenze scientifiche clinicamente rilevanti da pubblicare su riviste internazionali e che costituiranno la base per la costituzione delle linee guida di trattamento; nella fase 2 le indicazioni di trattamento riabilitativo verranno applicate ad un gruppo di pazienti (valutazione – trattamento - rivalutazione) presso i centri di riabilitazione della NF (Padova, Udine, Vicenza, Cava dei Tirreni, Ostuni) dopo opportuna formazione del personale tramite incontri.

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

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: CeSNE - Centro Studi di Neuroimaging dell'età Evolutiva

Fondazione IRCCS "San Raffaele del Monte Tabor" di Milano

DESCRIZIONE

Le cerebrolesioni 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'immatunità 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 mo-

mento 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).

a) 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.

b) 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.

c) 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.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Anni 2010 e 2011:

1. Approvazione ricerca da parte del Comitato Etico con formulazione Fogli Informativi e Consenso Informato
2. Messa a punto dei protocolli clinico diagnostici da parte della neuropsicologa
3. Creazione del paradigma di studio per la f-RM (collaborazione neuropsicologa e ingegneri)

4. Noleggio f-NIRS e corso di addestramento per utilizzo strumento
5. Preparazione data base
6. Richiesta per utilizzo RM a 3 Tesla al Ministero della Salute
7. Reclutamento dei pazienti: 22 pazienti e 4 controlli sani
8. Studio clinico della casistica (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)
9. RM morfologica
10. e fRM (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)
11. preparazione paradigma con nuova strumentazione Fnirs

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel 2012 sono previsti:

12. Estensione dello studio a pazienti maggiorenni
13. Estensione dello studio a pazienti in fase degli esiti
14. Reclutamento dei pazienti fino a giugno 2012
15. Studio clinico della casistica (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)
16. RRM morfologica
17. Valutazione fNIRS e fRM (ingresso studio/termine riabilitazione cognitiva in fase subacuta)
18. Raccolta dati
19. Elaborazione dati e preparazione lavoro scientifico

Selezione e studio dei pazienti

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 45 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'even-

to 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 - i Nuovo, 1992). Il training durerà 2-3 mesi, con 4 - 5 sedute individuali settimanali di quarantacinque minuti l'una.

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 45 anni, con evento non recente (fase degli esiti).

I pazienti in fase subacuta 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 responsività, 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, tertaplegia, 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.

I pazienti in fase degli esiti riceveranno in ingresso nello studio 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 responsività, 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, tertaplegia, atassia).

I pazienti eseguiranno una valutazione funzionale NIRS e di RM in fase di ingresso nello studio. 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'appropriate 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. Que-

sta 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 Infra-red 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.

ATASSIE EREDODEGENERATIVE AD ESORDIO PRECOCE: DESCRIZIONE DEL PATTERN DI ALTERAZIONE PATOLOGICA MEDIANTE NEUROIMAGING AVANZATO E STUDIO NEUROPSICOLOGICO PER LA DEFINIZIONE DI INDICATORI PARACLINICI UTILI AL MONITORAGGIO DELL'EVOLUZIONE O ALLA VERIFICA DI EFFICACIA DI TRATTAMENTO

DR. ANDREA MARTINUZZI

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

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

DESCRIZIONE

Le atassie eredodegenerative comprendono una famiglia eterogenea di malattie neurodegenerative ad evoluzione progressiva. Il quadro clinico appare caratterizzato da una sindrome atassica con disturbo del cammino, tremore, dismetria, disartria a cui si associano a seconda dei sottotipi neuropatia periferica, deficit dei nervi cranici e patologie internistiche. Se il pattern di danno neuromotorio caratterizza e quasi si identifica con le forme in oggetto, altri aspetti più subdoli ma altrettanto significativi sul piano funzionale si riscontrano in queste forme. Dal punto di vista neuropsicologico profili specifici sono stati evidenziati solo per alcuni sottotipi di atassie eredodegenerative, in particolare per l'atassia di Friedreich che si caratterizza per deficit delle funzioni esecutive e di memoria (7).

In generale per nessuna di queste forme è disponibile un trattamento efficace, e i pochi trials condotti finora hanno dimostrato la debolezza degli indicatori utilizzati per monitorare l'efficacia del trattamento (6).

L'imaging cerebrale avanzato (morfometria, spettroscopia, DTI, fMRI) potrebbe offrire da un lato il necessario complemento alla descrizione delle basi neuropatologiche dei deficit complessi riscontrati nelle eredoatassie, dall'altro lato rappresentare un oggettivo indicatore di progressione utilizzabile anche come indicatore di end point paraclinico in trials terapeutici.

Negli ultimi anni alcuni studi di Risonanza Magnetica hanno consentito di documentare in vivo le sedi del danno cerebellare, il coinvolgimento di aree

cerebrali e del midollo spinale e di monitorarne l'evoluzione. Il pattern di interessamento morfologico risulta eterogeneo anche se il danno principalmente evidenziato è a livello del cervelletto, tronco encefalico e midollo spinale con risparmio degli emisferi cerebrali se non nelle forme di atassia ad esordio più tardivo (8,9) o negli stadi più avanzati delle forme precoci (8). Grazie all'applicazione della volumetria voxel-based è possibile quantificare il grado di atrofia e monitorarlo nel tempo ed individuare sottotipi diversi di SCA (4). Diversi studi (2,4,5,7,9) hanno evidenziato una correlazione significativa tra grado di atrofia cerebellare e gravità del quadro clinico e la durata della malattia.

Due gli studi di Risonanza magnetica funzionale di cui uno condotto in pazienti con atassia di Friedreich che mostra un'attivazione corticale eterogenea durante movimenti delle dita (7) e l'altro su pazienti con SCA1 che mostra una mancata attivazione del cervelletto e dello striato durante movimenti di pronazione rispetto ai controlli normali (3). Nessuno dei due studi prevedeva una valutazione di follow-up per documentare l'evoluzione del quadro.

Nessuno studio ha utilizzato sistematicamente ed in modo combinato le ultime metodiche di neuroimaging in questa classe di patologie.

Obiettivi generali del progetto

- analizzare le caratteristiche ed i pattern del danno a livello cerebrale e cerebellare tramite neuroimaging avanzato (DTI, spettroscopia, fMRI) nelle diverse forme di atassie ereditarie, ed in particolare nelle forme Early Onset (atassia di Friedreich, AOAI e II, ATM);
- descrivere il profilo neuropsicologico in pazienti con atassie ereditarie evidenziando eventuali pattern specifici;
- correlare i dati clinici (motorio e cognitivo) con i dati neuro radiologici;
- estrapolare indicatori utili al monitoraggio e alla definizione prognostica ed alla valutazione di efficacia di eventuali trattamenti.

Metodi

Sarà selezionato dalla popolazione afferente tutti i Centri della Nostra Famiglia e i Poli IRCCS un campione di soggetti con atassia ereditaria ad esordio precoce che saranno valutati mediante scale di valutazione motoria e neuropsicologica. I pazienti saranno sottoposti a RM encefalo con studio volumetrico e fMRI. I risultati saranno paragonati ad un gruppo di controllo di soggetti sani di pari età, sesso e quoziente intellettivo.

Dal primo match di valutazioni verranno selezionati indicatori specifici e sensibili, che saranno successivamente il fulcro delle valutazioni di follow-up che

seguiranno con cadenza annuale per 2 aa successivi.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso del 2011 sono stati organizzati incontri con i referenti della Ricerca presso i Centri coinvolti (Bosisio Parini, Conegliano e Udine), nell'ambito dei quali si sono discussi e definiti gli obiettivi del progetto con i rispettivi ruoli.

In base alla revisione della letteratura, è stato definito un protocollo diagnostico per la valutazione degli aspetti motori e cognitivi.

Per quanto riguarda la valutazione motoria saranno utilizzate scale specifiche per l'atassia quali la International Cooperative Ataxia Ranking Scale (ICARS), la Freidreich Ataxia Rating Sscale (FARS) e la Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA).

Il protocollo cognitivo comprenderà la valutazione non solo del quoziente intellettivo ma anche degli aspetti neuropsicologici con particolare attenzione alle funzioni attentive, mnesiche ed esecutive.

Le **funzioni cognitive** saranno esplorate con prove differenziate in base alla fascia d'età (12-16anni e 16-40 anni) come di seguito illustrato.

Fascia di età 12-16 anni: WISC III - Matrici di Raven Avanzate

Fascia di età 16-40 anni: WAIS III

Le funzioni neuropsicologiche vengono esplorate con i seguenti test uguali per le due fasce d'età:

Funzioni attentive

Software attenzione e concentrazione

Trail Making Test A-B

Funzioni mnesiche

Span diretto

Span inverso

Test di corsi

Memoria di prosa

Figura di Rey recall

Funzioni esecutive

Fluenza verbale semantica

Fluenza verbale categoriale

Torre di Londra

È in corso di elaborazione un elenco dei pazienti affetti da Atassia ereditaria ad esordio precoce afferenti ai Centri coinvolti e selezionabili per lo studio. Parallelamente sarà individuato il gruppo di controllo di soggetti sani di pari età, sesso e quoziente intellettivo.

È stato attivato un Dottorato di Ricerca in Medicina dello sviluppo e scienze

della programmazione presso l'Università di Padova della durata di 3 anni con decorrenza dall'anno accademico 2011/2012. Tale dottorato verterà sul progetto in esame comprendendo gli aspetti clinici e di ricerca e sarà svolto principalmente presso l'IRCSS Eugenio Medea - Polo di Conegliano/Pieve di Soligo.

Un gruppo di lavoro sta elaborando un protocollo di neuroimaging avanzato comprendente analisi volumetrica, DTI e fMRI a cui saranno sottoposti sia i pazienti affetti che i controlli normali. In particolare sono in corso di definizione i task motori e neuropsicologici da utilizzare in fMRI.

ATTIVITÀ PREVISTE

Una volta completato l'elenco dei pazienti affetti si passerà alla fase del reclutamento in cui i pazienti saranno informati sul progetto in esame e esprimeranno il volere o meno di parteciparvi con la raccolta del consenso informato. Sulla base delle caratteristiche dei pazienti reclutati inizieremo a selezionare la popolazione di controllo.

Sarà avviata l'applicazione dei protocolli clinici e di neuroimaging avanzato in entrambi i gruppi. In particolare, i pazienti reclutati saranno sottoposti a valutazioni funzionali di tipo motorio, cognitivo e neuropsicologico secondo protocollo standardizzato. I controlli normali saranno sottoposti ai soli test cognitivi e neuropsicologici.

Inoltre dopo aver definito il protocollo di neuroimaging avanzato con particolare elaborazione dei task motori e neuropsicologici, saranno testati nei controlli e in alcuni pazienti affetti.

Verrà creato un database comprendente i dati generali e i dati relativi alle varie valutazioni sia cliniche che di neuroimaging dei pazienti e dei controlli normali.

Infine, continuerà il reclutamento di nuovi casi affetti con eventuale coinvolgimenti di altri Centri.

Bibliografia

- Henry L. Paulson, MD, PhD. The Spinocerebellar Ataxias review. *J Neuroophthalmol.* 2009 September; 29(3): 227-237.
- Prakash N, Hageman N, Hua X, Toga AW, Perlman SL, Salamon N. Patterns of fractional anisotropy changes in white matter of cerebellar peduncles distinguish spinocerebellar ataxia-1 from multiple system atrophy and other ataxia syndromes. *Neuroimage.* 2009 Aug;47 Suppl 2:T72-81. Epub 2009 May 14.

- Jayakumar PN, Desai S, Pal PK, Balivada S, Ellika S, Kalladka D. Functional correlates of incoordination in patients with spinocerebellar ataxia 1: a preliminary fMRI study. *J Clin Neurosci*. 2008 Mar;15(3):269-77. Epub 2008 Jan 10.
- Della Nave R, Ginestroni A, Tessa C, Salvatore E, Bartolomei I, Salvi F, Dotti MT, De Michele G, Piacentini S, Mascalchi M. Brain white matter tracts degeneration in Friedreich ataxia. An in vivo MRI study using tract-based spatial statistics and voxel-based morphometry. *Neuroimage*. 2008 Mar 1;40(1):19-25. Epub 2007 Dec 14.
- Della Nave R, Ginestroni A, Giannelli M, Tessa C, Salvatore E, Salvi F, Dotti MT, De Michele G, Piacentini S, Mascalchi M. Brain structural damage in Friedreich's ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008 Jan;79(1):82-5. Epub 2007 Jul 18.
- Nicholas A. Di Prospero, Angela Baker, Neal Jeffries, Kenneth H Fishbeck. Neurological effects of high-dose Idebenone in patients with Friedreich's ataxia: a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 878-886.
- Mantovan MC, Martinuzzi A, Squarzanti F, Bolla A, Silvestri I, Liessi G, Macchi C, Ruzza G, Trevisan CP, Angelini C. Exploring mental status in Friedreich's ataxia: a combined neuropsychological, behavioral and neuroimaging study. *Eur J Neurol*. 2006 Aug;13(8):827-35.
- Villanueva-Haba V, Garcés-Sánchez M, Bataller L, Palau F, Vílchez J. Neuroimaging study with morphometric analysis of hereditary and idiopathic ataxia. *Neurologia*. 2001 Mar;16(3):105-11.
- Ormerod IE, Harding AE, Miller DH, Johnson G, MacManus D, du Boulay EP, Kendall BE, Moseley IF, McDonald WI. Magnetic resonance imaging in degenerative ataxic disorders. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1994 Jan;57(1):51-7.

CREAZIONE DI RETE DI NETWORK E DI DATA BASE DI POPOLAZIONE DI SOGGETTI AFFETTI DA PATOLOGIE NEUROMUSCOLARI E NEURODEGENERATIVE IN ETÀ PEDIATRICA ED ADULTA

DR.SSA MARIA GRAZIA D'ANGELO

E-MAIL: GRAZIA.DANGELO@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione Neuromotoria e
Neuropsicologia Funzionale

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Unità Neuromuscolare

DESCRIZIONE

I progressi della ricerca nell'ambito delle malattie neuromuscolari, sia in relazione all'eziopatogenesi che allo sviluppo di eventuali possibilità terapeutiche (genetiche, farmacologiche e cellule-mediate) sta in tempi rapidi portando al passaggio della sperimentazione dal modello animale ai soggetti umani.

L'adeguata selezione dei pazienti e la necessità di valutazioni/rivalutazioni cliniche conformi ai criteri definiti dalle linee guida internazionali (laddove presenti) risulta pertanto indispensabile per consentire al nostro Centro di aderire ai protocolli delle nuove sperimentazioni cliniche in fase di realizzazione o di progettazione a livello nazionale ed internazionale (ad es. studio di exon-skipping in soggetti affetti da distrofia di Duchenne; studio Trofos in pazienti SMA; fase II-III del trial farmacologico con donatori di ossido nitrico e antiinfiammatori non steroidei nelle distrofie dei cingoli).

Il pz affetto da patologia neuromuscolare viene preso in carico dal momento della diagnosi per tutto il decorso della malattia, per il necessario monitoraggio, oltre che dell'evoluzione del quadro neuromuscolare, anche della progressiva comparsa di segni/sintomi di coinvolgimento multisistemico, diverso in rapporto all'età ed alle fasi della singola patologia.

Risulta pertanto essenziale dare una configurazione omogenea ed immediatamente fruibile a tutti i dati raccolti nei diversi ambiti di valutazione per ogni paziente nel corso della sua storia clinica.

Gli scopi che il presente progetto si propone sono dunque i seguenti:

- raccogliere la casistica, ripartita per patologia, della popolazione di pazienti affetti da patologie neuromuscolari afferenti alla Unità Neuromuscolare dell'IRCCS E. Medea nella sede di Bosisio Parini;
- organizzare un sistema di raccolta dei dati che ne consenta un rapido recupero ed aggiornamento;
- creare una banca dati utile sia per la gestione clinica dei pazienti, la cui storia di malattia sarà ricapitolabile in qualsiasi momento in maniera più semplice ed immediata da parte del neurologo di riferimento, qualora autorizzato, sia ai fini di ricerca, per una più approfondita caratterizzazione di patologie che rientrano nell'ambito delle malattie rare;
- elaborare sistemi di estrapolazione dei dati in base a criteri di selezione specifici, con ripercussioni positive sia in ambito clinico che di ricerca.

Ciò renderà infatti in prospettiva più facile la rilevazione di analogie o differenze di decorso tra le diverse forme di patologie neuromuscolari, aiutando ad orientare l'iter diagnostico dei pazienti ancora privi di una diagnosi definitiva, e semplificherà la selezione dei pazienti elegibili per la partecipazione ad un dato protocollo sperimentale, in base al possesso dei criteri di inclusione ed all'assenza dei criteri di esclusione specificati.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Ad oggi, nell'ambito del progetto "Database di pazienti affetti da patologie neuromuscolari" sono state svolte le seguenti attività:

*** Individuazione innanzitutto dei gruppi patologici di interesse**, in rapporto alla tipologia prevalente di pazienti che hanno accesso alla Unità Neuromuscolare dell' IRCCS E. Medea nella sede di Bosisio Parini.

La casistica dei soggetti seguiti presso il nostro Centro attualmente include oltre 600 pazienti, così ripartiti:

- 155 pz affetti da distrofia di Duchenne;
- 60 pz affetti da distrofia di Becker;
- 80 pz affetti da forme di distrofia muscolare dei cingoli, a loro volta articolate in sottogruppi in base alla specifica diagnosi genetica;
- 82 pz affetti da distrofie miotoniche di tipo 1 o 2;
- 70 pz affetti da distrofia facio-scapolo-omerale;
- 30 pz affetti da forme di distrofia congenita;
- 24 pz affetti da miopatie congenite;
- 10 pz affetti da glicogenosi;

- 38 pz affetti da encefalomiopatie mitocondriali;
- 25 pz affetti da SMA;
- 30 pz affetti da altre patologie muscolari geneticamente definite;
- 30 pz affetti da patologie muscolari ancora prive di una definizione diagnostica;
- 30 pz affetti da neuropatie ereditarie.

* **Sono state contattate le altre Sedi IRCCS E. Medea**, di Conegliano e Ostuni. Al momento si è in attesa da parte dei colleghi della segnalazione della numerosità della loro casistica.

* **Individuazione delle informazioni anagrafiche e medico-specialistiche** utili alla raccolta dati che ci si propone di effettuare con questo strumento.

* **Ripartizione delle informazioni medico-specialistiche** in:

1. informazioni relative ai principali dati anamnestici di interesse (esordio della patologia; diagnosi genetica, se già formulata; caratteristiche della biopsia muscolare, se eseguita) considerabili “fisse”, cioè da inserire una volta sola;
2. informazioni relative alle visite specialistiche/esami ematochimici e strumentali/tests neuropsicologici e valutazioni fisioterapiche effettuate dal paziente nel corso di ogni accesso presso il nostro Istituto, da registrare invece in maniera cumulativa a partire dal primo ingresso.

* **Elaborazione di un modello grezzo di database** in versione excell, prima piattaforma di confronto tra i medici e gli ingegneri impegnati nel progetto, al fine di fornire una rappresentazione schematica dei parametri di interesse, indicando la necessità di espressione di ciascuno di essi in forma di variabili chiuse a scelta multipla (con le specifiche del caso) o in forma di campi liberamente compilabili con valori numerici o “note” scritte.

* Dopo diversi incontri chiarificatori e revisioni del modello grezzo, **inizio dell’elaborazione del modello grafico definitivo** di rappresentazione del database a PC

Nel frattempo, tutti i dati di interesse relativi ai pazienti affetti da patologie neuromuscolari sono comunque stati inseriti in documenti excell provvisori. Dalla metà di Novembre 2011 si è iniziato l’inserimento dei dati nel database, che verrà progressivamente perfezionato in base alle difficoltà e/o nuove esigenze che si evidenzieranno con la fruizione dello strumento.

ATTIVITÀ PREVISTE

Il completamento del progetto prevede l'inserimento dei dati relativi a più di 600 pazienti, per i quali andranno registrati più di 10 accessi dal primo ingresso presso il nostro Istituto.

Per agevolare e rendere più rapido l'inserimento dei dati in futuro, si valuterà anche la possibilità di collegare il database al sistema interno di cartella/dimissione informatizzata (sistema Clinsuite), in modo che i dati di interesse, opportunamente selezionati, possano, attraverso la compilazione dei referti visite e delle relazioni di dimissione, essere direttamente convogliati nel database senza necessità di una seconda ridigitazione.

I dati verranno caricati nella rete interna della sede dell' IRCCS Eugenio Medea di Bosisio Parini. È possibile prevedere una evoluzione successiva del sistema per consentire l'inserimento dei dati anche dalle altre sedi dell'Associazione ed eventualmente da altre strutture ospedaliere (previa l'attuazione di misure di protezione dei dati), qualora lo si riterrà opportuno.

Il passaggio successivo all'inserimento dei dati prevede infine l'elaborazione di sistemi di estrapolazione degli stessi sulla base di criteri di selezione modificabili a seconda delle necessità del clinico ricercatore, attraverso algoritmi informatici che andranno individuati dagli ingegneri ed eventualmente creati ad hoc.

STUDIO PILOTA DI DEFINIZIONE DI PARADIGMI UTILI ALLA VALUTAZIONE MEDIANTE AD FMRI DEL PROFILO DI MODIFICAZIONE PATOLOGICA E DELLA EFFICACIA DI INTERVENTI RIABILITATIVI INDIVIDUALIZZATI IN PCI SPASTICA AD ESPRESSIONE BILATERALE

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

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea: Poli Scientifici di Conegliano, San Vito: UDGEE Udine e Ostuni - Brindisi

DESCRIZIONE

La Paralisi Cerebrale Infantile (PCI) è un disturbo neurologico dello sviluppo con una prevalenza di circa 1.5–2.5 pazienti per 1000 nati vivi. Sono colpiti in modo particolare i bambini nati prematuri durante il terzo trimestre tra 24 e 32 settimane di età gestazionale. Il danno neuroanatomico frequentemente sotteso ai quadri di PCI comprende danni assonali e neuronali nella materia bianca e grigia dell'encefalo, riduzione delle connessioni talamocorticali (Hoon et al. 2002, 2009; Thomas et al. 2005; Nagae et al. 2007), e danni alle strutture subcorticali (Volpe 2009), nuclei della base, (Kulak et al 2009) e cervelletto (Kulak et al 2007). La diplegia spastica, una forma comune di PCI bilaterale, è spesso caratterizzata da un danno non progressivo della sostanza bianca periventricolare (PWMI) (Kulak et al. 2007; Leviton and Gressens 2007; Korzeniewski et al. 2008) che va da lesioni diffuse difficilmente visualizzabili a evidenti cisti poroencefaliche (Kuban and Leviton 1994; Volpe 2009). Gli studi neuroradiologici hanno consentito di migliorare la conoscenza morfologica delle lesioni (Risonanza Magnetica, RM) e delle vie nervose (Trattografia, DTI); l'utilizzo della Risonanza Funzionale (fMRI) ha inoltre la potenzialità di definire negli ambiti rilevanti (esecutività motoria, input sensitivo, pianificazione motoria) le caratteristiche delle modificazioni alla base dei fenotipi clinici osservati nelle PCI. Un'altra misura che ci consente di eviden-

ziare i network corticali ci viene fornita dalla Risonanza Funzionale di Connessione (fcMRI). I networks corticali evidenziati con questa tecnica predicono in modo affidabile la distribuzione delle aree corticali attivate in studi di imaging convenzionali task related (Vincent et al. 2006, 2007) anche in presenza di lesioni cerebrali (Quigley et al. 2001). Pur non ancora studiato in modo sistematico nelle PCI, è ipotizzabile che il danno sia di tipo distribuito, con alterazioni presenti in zone tra loro anatomicamente lontane ma funzionalmente correlate. Lo studio di connettività sembra quindi poter costituire un passaggio cruciale, a fianco dell'analisi della funzione di singole regioni, per meglio comprendere e studiare il quadro patologico ed individuare possibili meccanismi di terapie efficaci (Rowe 2010). La valutazione clinico funzionale è necessaria per la definizione sia del profilo che del progetto riabilitativo individualizzato; l'uso di parametri obiettivi consente di inoltre di evidenziare indici di outcome evidence based con la doppia valenza di monitorare l'evoluzione del singolo soggetto (within subject) che di permettere la comparazione di andamento tra più soggetti (among subjects). La possibilità di affiancare uno studio di funzionalità cerebrale agli indicatori clinico/comportamentali potrebbe costituire la base per una maggiore conoscenza sia della patologia che dell'efficacia degli interventi riabilitativi.

In una popolazione di soggetti affetti da esiti di Paralisi Cerebrale Infantile bilaterale, il progetto proposto studia e compara le valutazioni funzionali con quelle strumentali neuroradiologiche.

Obiettivi

- identificare protocolli-paradigmi per lo studio delle modificazioni patologiche nelle PCI
- identificare profili funzionali diversificati nelle PCI
- correlare fenotipo-quadro neuropatologico
- identificare protocolli di trattamenti specifici
- studiare l'outcome sull'efficacia di trattamenti
- costruire programmi riabilitativi individualizzati e valutare la loro efficacia.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Il progetto iniziato nel 2011 è di tipo clinico osservazionale e ha visto la partecipazione di alcuni poli dell'IRCCS Medea (Friuli, Veneto) con Bosisio capofila.

Il 26 luglio 2011 è pervenuta l'autorizzazione del ministero e conseguentemente quella dell'istituto a procedere col progetto.

Precedentemente vi era stata una fase preliminare per mettere a punto il protocollo di neuroimmagini che aveva richiesto una vasta ricerca bibliografica, la valutazione di tutta la letteratura, l'identificazione di paradigmi utili agli obiettivi dello studio, la definizione dei tempi di somministrazione e il reperimento di un sistema di rilevazione standardizzato e RM compatibile.

A questa fase erano seguite una serie di riunioni con l'equipe multidisciplinare della ricerca (Prof. F. Di Salle, Dr.ssa C. Gagliardi, Ing. M. Re, Dr. F. Arrigoni, Dr.ssa A.C. Turconi).

Il 23 marzo 2011 è stato effettuato il primo incontro per valutare la fattibilità e gli obiettivi dello studio che sono stati spiegati e condivisi da tutto il gruppo.

Il 24 marzo è stata effettuata una nuova riunione dove, sulla base delle premesse del giorno precedente, si è focalizzata la discussione sulla Functional Connectivity che potrà rappresentare un vero e proprio indice di modificabilità dopo il trattamento riabilitativo.

Si è discusso anche in merito ai tempi di permanenza dei soggetti in Risonanza durante il protocollo. La valutazione neuroradiologica completa deve comprendere una valutazione morfologica di base, studio di trattografia relativa ai fasci, Resting state e Risonanza Funzionale con applicazione di paradigma specifico per il test sulle abilità manuali.

Vasta discussione è stata indirizzata alla scelta e alla formulazione del paradigma selezionato nei precedenti incontri per la sua applicabilità come test per la mano. Il paradigma scelto è di tipo "Finger tapping" di cui si portano in visione numerosi articoli della letteratura.

In seguito i lavori sono proseguiti con incontri periodici allo scopo di definire un protocollo di riabilitazione da proporre ai soggetti.

Anche in questo ambito qui si era partiti con una approfondita ricerca bibliografica e una valutazione della letteratura per la scelta di un protocollo utile per gli obiettivi dello studio con esercizi funzionali per il reclutamento prossimale e distale dell'arto superiore meno compromesso comprensivo anche di alcune attività bimanuali.

Il protocollo è stato messo a punto e completato e comprende esercizi per attività manuali prossimali (tracciati su piani diversificati, movimenti di prono supinazione, imitazione di gesti e sequenze) e esercizi per attività manuali distali (tastiere, imitazione movimenti fini delle dita, attività per ritmo e fluenza).

Tra gli strumenti utili identificati per il trattamento è stato introdotto l'uso di ARMEO (presidio robotizzato per l'arto superiore) e di tablet con valutazione per impostazione di applicazioni specifiche. Inoltre dal 2012 si includeranno nelle attività da valutare anche quelle relative alla deambulazione. Per questo scopo alcuni soggetti verranno avviati a trattamento con Driver Gait Orthosis robotizzata per il cammino. Si è organizzata per gennaio 2012 una riunione con i terapisti dei Poli per la presentazione e l'agreement del protocollo di

trattamento messo a punto.

I pazienti attesi dovrebbero essere 5 per ogni Polo inviante.

Il trattamento verrà effettuato presso le varie sedi mentre i pazienti provenienti da Conegliano dovranno essere inviati per effettuare le Risonanze a Bosisio Parini.

Per il Polo Friuli che è dotato di Risonanza si è deciso che la Dr.ssa Tommasino specialista neropsicologa collaborerà con l'Ing. Re per la messa in opera del paradigma già scelto (Bilateral Complex Finger Tapping).

Sono stati reclutati nel Polo di Bosisio 4 soggetti che inizieranno le valutazioni e il trattamento nei primi mesi del 2012.

ATTIVITÀ PREVISTE

Proseguirà il reclutamento dei pazienti che prevede, oltre i 4 già reclutati di arrivare a un massimo di 15 soggetti affetti da esiti con forma bilaterale di PCI spastica con i seguenti criteri di inclusione:

Età 7-16 aa

Quadro noto di Leucomalacia Periventricolare

Buona collaborazione e capacità di comprendere ed eseguire il compito definito dal paradigma

Compromissione motoria medio-lieve: Gross Motor Function Classification System (GMFCS) I-II-III

Assenza di ipovisus

Nessuna controindicazione ad effettuare esami di Risonanza Magnetica

I pazienti saranno sottoposti in seguito a una batteria di test funzionali in modo da poter configurare un profilo specifico per ogni soggetto secondo il seguente schema:

Competenze cognitive generali: Quoziente intellettivo (IQ) tramite Scale Wechsler

Classificazione impairment motorio e di manipolazione: GMFCS e Manual Ability Classification System (MACS)

Competenze visuocognitive: Test Visual Perceptual Skills (TVPS)

Competenze fine motorie: QUEST e Melbourne Scale

Competenze relative al cammino (Gait Analysis, 6 min walking test)

Integrazione sensoriale: stereognosi e grafoestesia

Partecipazione

Seguirà lo studio neuroradiologico:

Studio MRI di base, trattografia e functional connectivity (resting state): estesi a tutti i soggetti reclutati. La sedazione per questi esami sarà riservata ai bambini non collaboranti e sarà effettuata seguendo le regole della corret-

ta prassi clinica sia nell'impiego di sostanze adatte all'età evolutiva, sia nel rispetto rigoroso dei dosaggi raccomandati in letteratura.

Studio di specifiche (Regions of Interest) aree e funzioni - fMRI: limitata a 8-10 soggetti, con livelli di collaborazione elevata: task motorio (Finger Tapping)
-I pazienti verranno avviati a trattamento riabilitativo individualizzato dopo le valutazioni clinico-funzionali-strumentali.

Per i pazienti che effettueranno lo studio di regioni specifiche con fMRI relativamente all'attività manuale il protocollo di trattamento messo a punto sarà il seguente:

Protocollo di trattamento per la riabilitazione dell'arto superiore (miglioramento delle modalità di controllo e della selettività)

Macroobiettivi: controllo, fluidità (ritmo e velocità), accuratezza

Modalità di somministrazione: 40 sedute (2 sedute giornaliere)

Obiettivi specifici per il controllo prossimale (reaching e controllo spalla, braccio e avambraccio, polso con pronazione/supinazione, controllo sui gradi di libertà, ampiezza del movimento): precisione visuomotoria, velocità, fluidità, accuratezza, sequenze

Obiettivi specifici per il controllo distale (fissazione prossimale e al gomito; selettività dita + pronazione/supinazione. Attività monomanuale della mano preferenziale con fissazione funzionale dell'altra mano la mano non preferenziale è in appoggio funzionale ed alcune attività sono comunque proposte in bimanuale. Anche nelle attività monomanuali la mano non coinvolta sarebbe in appoggio funzionale anche in condizioni ecologiche: non viene funzionalmente esclusa): precisione visuomotoria, velocità, accuratezza, sequenze, ritmo, stereognosi

Attività per controllo prossimale

Tracciati su piano orizzontale e verticale costituiti da linee curve, ellissi, spirali da riprodurre con manopola con colore o luce

Pronazione/supinazione e controllo su percorsi vincolati rigidi

Kinestesia: tracciati OO chiusi su imitazione

Imitazione di gesti: braccio/avambraccio, polso, spalla

Sequenze e precisione

Attività per controllo distale

Tastiere: sequenze variabili (Numero elementi, colore, forma), dislocazione spaziale

Sequenze variabili: Numero elementi

Stereognosi difficoltà crescente (oggetti, forme; riconoscimento o matching)

Imitazione movimenti dita.

IPAD: sequenze, tagliare, pinza superiore, allontanamento, flessione/estensione dita Al termine del trattamento verranno ripetute le valutazioni effettuate nel baseline: valutazioni funzionali e fMRI. Infine verrà effettuata l'analisi dei dati.

VERSO UNA DEFINIZIONE DEL FENOTIPO LINGUISTICO DELL'AUTISMO: UN CONFRONTO CON I DISTURBI SPECIFICI DEL LINGUAGGIO

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

2012

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

IRCCS "Bambin Gesù" di Roma

IRCCS Fondazione "Stella Maris" di Calambrone

DESCRIZIONE

I disturbi dello spettro autistico (Autistic Spectrum Disorders, ASD) sono caratterizzati da una mancata maturazione dell'area socio-affettivo-emotiva che influenza l'elaborazione, l'integrazione e l'organizzazione delle informazioni alla base della comunicazione ed interazione interpersonale (Surian, Siegal, 2008). Gli individui con ASD presentano caratteristiche difficoltà comunicative di natura sia verbale che non verbale. Per quanto riguarda il linguaggio, in genere i bambini con ASD hanno caratteristiche difficoltà macroelaborative nella gestione degli aspetti pragmatici e discorsivi (Marini, 2008; Bishop & Norbury, 2002). Queste difficoltà si manifestano ad esempio nell'uso di un linguaggio ripetitivo, a volte tangenziale e scarsamente informativo. Occorre tuttavia rilevare che un certo numero di questi bambini può presentare anche disturbi nello sviluppo e uso delle abilità microelaborative del linguaggio. In uno studio in cui numerosi tests linguistici sono stati somministrati a bambini con ASD di età compresa tra i 4 e i 13 anni, Kjelgaard e Tager-Flusberg (2001) hanno mostrato l'esistenza di un gruppo di bambini senza disturbi linguistici, un gruppo di bambini con prestazione borderline nei test che valutano le abilità linguistiche ed un gruppo di bambini con disturbi di natura semantica e morfo-sintattica simili a quelli riscontrabili in bambini con diagnosi di Disturbo Specifico del Linguaggio (DSL). A questo proposito vale la pena osservare che 1) è vivo il dibattito sulle caratteristiche del Pragmatic Language

Impairment (PLI), un tipo di DSL caratterizzato da un uso pragmaticamente anomalo del linguaggio (ad es. Bishop & Norbury, 2002; Bishop, 2000); 2) la diagnosi di DSL può mutare nel tempo e in alcuni casi bambini che a 5 anni hanno ricevuto una diagnosi di DSL potrebbero in seguito mostrare sintomi caratteristici degli ASD (Conti-Ramsden, Simkin, & Botting, 2006; Mawhood, Howlin, & Rutter, 2000); 3) un numero significativo di bambini con ASD ha una bassa performance in tests (come ad es. il test di ripetizione di non parole, Bishop et al., 2004) tipicamente usati per valutare le abilità linguistiche dei bambini con DSL (Kjelgaard & Tager-Flusberg, 2001).

Alla luce di queste considerazioni s'impone dunque la necessità di analizzare le competenze linguistiche di bambini con DSL e DSA con strumenti valutativi versatili e soprattutto in grado di esaminare contemporaneamente tanto abilità microelaborative (lessicali: articolatorie, fonologiche, morfologiche, semantiche; frasali: morfosintattiche e sintattiche) quanto abilità macroelaborative (pragmatiche e discorsive). Negli ultimi tre anni il Polo friulano dell'Associazione "La Nostra Famiglia" è stato impegnato nella costruzione e standardizzazione di uno strumento valutativo versatile e in grado di analizzare in modo approfondito abilità lessicali, grammaticali, semantiche, pragmatiche e discorsive in tre modalità: produzione, comprensione e ripetizione orale. Si tratta della "Batteria per la Valutazione del Linguaggio in Bambini dai 4 ai 12 anni" (BVL_4-12, Marini e coll., in fieri). Allo stato attuale la BVL_4-12 è stata somministrata a 1.014 bambini con normale sviluppo e nel giro di alcuni mesi saranno disponibili i dati normativi relativi a gran parte dei test in essa inclusi. Tutto ciò costituisce un'opportunità per studiare a fondo le caratteristiche linguistiche dei bambini con ASD.

Il presente progetto di ricerca prevede la somministrazione della BVL_4-12 a quattro gruppi di bambini confrontabili per età cronologica, livello intellettivo e livello di scolarità. Il primo gruppo sarà costituito da 20 bambini con diagnosi di DSL con disturbo di comprensione e produzione (ICD-10: F80.2). Il secondo gruppo sarà costituito da 20 bambini con diagnosi di ASD senza disturbi linguistici di natura microelaborativa. Il terzo gruppo sarà costituito da 20 bambini con diagnosi di ASD e con disturbi linguistici di natura microelaborativa. Infine, il quarto gruppo sarà costituito da 20 bambini con normale sviluppo. I tre gruppi di bambini con ASD e DSL dovranno avere un PIQ uguale o superiore a 80.

Questo studio permetterà di indagare l'eventuale relazione tra le caratteristiche del disturbo nello sviluppo ed uso del linguaggio in bambini con ASD e in bambini con DSL col duplice scopo di 1) comprendere meglio i meccanismi del disturbo linguistico in queste due patologie per poi procedere all'identificazione di protocolli riabilitativi maggiormente mirati ed efficaci rispetto a quelli attualmente in uso, e 2) confermare anche nel caso di bambini con

diagnosi di ASD di lingua italiana la possibile esistenza di un sottogruppo con associati disturbi linguistici di natura microelaborativa oltre che macroelaborativa.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nell'ambito del progetto si prevede di reclutare bambini con diagnosi di DSL e ASD. Si procederà poi alla somministrazione dei test della BVL 4-12 ed alla loro analisi. Ultime le analisi verrà redatto un articolo per divulgare i risultati della ricerca.

Bibliografia

- Bishop, DVM. (2000). Pragmatic language impairment: A correlate of SLI, a distinct subgroup, or part of the autistic continuum?. In: Bishop, DVM.; Leonard, LB., editors. *Speech and language impairments in children: Causes, characteristics, intervention and outcome*. Psychology Press; UK: p. 99-113.
- Bishop DVM, Norbury CF. (2002). Exploring borderlands of autistic disorder and specific language impairment: A study using standardised diagnostic instruments. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*;43:917–929.
- Conti-Ramsden G, Simkin Z, Botting N. (2006). The prevalence of autistic spectrum disorders in adolescents with a history of specific language impairment (SLI). *Journal of Child Psychology and Psychiatry*;47:621–628.
- Kjelgaard MM, Tager-Flusberg H. (2001). An investigation of language impairment in autism: Implications for genetic subgroups. *Language and Cognitive Processes*;16:287–308.
- Marini A. (2008). *Manuale di Neurolinguistica*. Carocci, Roma
- Marini, A., Marotta, L., Riva, D., Fabbro, F. (in progress). *Batteri per la Valutazione del Linguaggio in Bambini dai 4 ai 12 anni (BVL 4-12)*.
- Mawhood L, Howlin P, Rutter M. (2000). Autism and developmental receptive language disorder – a comparative follow up in Early Adult Life. I: Cognitive and language outcomes. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*;41:547–559.
- Surian I., Siegal M. (2008), *Language and Communication Disorders in Autism and Asperger Syndrome*, in B. Stemmer, H. A. Whitaker (eds.), *Handbook of the Neuroscience of Language*, Elsevier, Oxford.

APPLICAZIONE DELLA BATTERIA PER LA VALUTAZIONE DEL LINGUAGGIO IN BAMBINI DAI 4 AI 12 ANNI CON DISTURBI SPECIFICI DEL LINGUAGGIO

DR.SSA CINZIA GIOVANNA GENTILI

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

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea: Poli Scientifici di Bosisio e San Vito

DESCRIZIONE

I disturbi specifici del linguaggio interessano bambini con sviluppo linguistico ritardato o insufficiente (Cipriani e Chilosi, 1995) pur in presenza di normale sviluppo cognitivo ed intellettuale e in assenza di sordità, ipoacusia o danni neurologici di alcun tipo (Leonard, 1998). Si tratta di disturbi con una incidenza molto elevata (dal 5 all'8% della popolazione scolastica generale) che necessitano quindi di adeguati interventi riabilitativi. Nel complesso, tuttavia, si tratta di disturbi tutt'altro che omogenei, potendosi presentare sotto forma di disturbi sul versante dell'articolazione (classificazione ICD-10: F80.0), su quello della produzione (ovvero selezione delle parole e accesso alle loro informazioni nel lessico mentale oltre a problemi di elaborazione grammaticale) con o senza disturbi articolatori (F80.1), oppure su quello della comprensione linguistica con o senza concomitanti disturbi sul versante della produzione (F80.2). Questa classificazione è spesso apparsa troppo rigida e negli ultimi anni si stanno imponendo descrizioni maggiormente improntate a una caratterizzazione linguistica dei DSL. (Bishop, 2004). Per esempio, Conti-Ramsden and Botting (1999) suggeriscono di distinguere tra bambini con disturbi semantico-lessicali, aprassia verbale, con disturbi nella programmazione fonologica e con disturbi semantico-pragmatici. Inoltre, Van der Lely e colleghi (Van der Lely, 2005; Van der Lely, Rosen, & McClell, 1998) hanno proposto di identificare un ulteriore sottogruppo di bambini con disturbi eminentemente grammaticali (definiti Grammatical Speech Language Impairment o

G-SLI), caratterizzati da disturbi di natura morfologica e sintattica anche oltre i 9 anni (cfr. Marini et al., 2008).

Alla luce di queste considerazioni s'impone dunque la necessità di analizzare le competenze linguistiche di bambini con DSL con strumenti valutativi versatili e soprattutto in grado di esaminare contemporaneamente tanto abilità microelaborative (lessicali: articolatorie, fonologiche, morfologiche, semantiche; frasali: morfosintattiche e sintattiche) quanto abilità macroelaborative (pragmatiche e discorsive). A questo proposito negli ultimi tre anni il Polo friulano dell'Associazione "La Nostra Famiglia" è stato impegnato nella costruzione e standardizzazione di uno strumento valutativo molto versatile e in grado di analizzare in modo approfondito abilità lessicali, grammaticali, semantiche, pragmatiche e discorsive in tre modalità: produzione, comprensione e ripetizione orale. Si tratta della "Batteria per la Valutazione del Linguaggio in Bambini dai 4 ai 12 anni" (BVL_4-12, Marini e coll., in fieri). Allo stato attuale la BVL_4-12 è stata somministrata a circa 1.200 bambini con normale sviluppo e a breve saranno disponibili i primi dati normativi relativi a gran parte dei test in essa inclusi. Tutto ciò costituisce un'opportunità per studiare a fondo le caratteristiche linguistiche dei DSL.

ATTIVITÀ PREVISTE

Il presente progetto di ricerca prevede la somministrazione della BVL_4-12 a 60 bambini con DSL con diagnosi ICD-10 F80.2 reclutati nel polo di Bosisio e nel polo friulano dell'Associazione "La Nostra Famiglia" per la validazione dello strumento per l'uso clinico.

In relazione alla comprensione linguistica i bambini dovranno eseguire una serie di test atti a valutare il livello di elaborazione metafonologica (discriminazione uditivo-verbale), comprensione lessicale, elaborazione grammaticale (comprensione di strutture sintattiche e giudizio grammaticale), elaborazione prosodica (comprensione della prosodia linguistica e emotiva) e pragmatica (comprensione di modi di dire). Sul versante della produzione, ai bambini verrà richiesto di eseguire compiti in cui vengono esaminate le loro abilità articolatorie e di denominazione (denominazione), le loro abilità di fluency fonologica e semantica, la capacità di completare frasi seguendo criteri morfologici (morfologia flessiva e derivazionale) e la capacità di produrre discorsi narrativi (test di descrizione di storie). Sul versante della ripetizione, infine, verrà richiesto loro di eseguire test di ripetizione di parole, di ripetizione di non parole e di frasi.

Questo progetto rappresenta l'opportunità per il nostro istituto di partecipare al team nazionale per la validazione dello strumento e, contestualmente, di

approfondire la conoscenza delle modalità di somministrazione e attribuzione di punteggi nell'ottica di una futura adozione della BVL_4-12 nel nostro istituto.

FUNZIONI PERCETTIVO-ATTENZIONALI NEI DISTURBI DELLO SPETTRO AUTISTICO: UNO STUDIO NEUROPSICOLOGICO

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

2012

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Centro di Riabilitazione Associazione "La Nostra Famiglia" di Padova
Università di Padova: Dipartimento di Psicologia Generale

DESCRIZIONE

Il Disturbo dello Spettro Autistico (DSA) è un grave e complesso disturbo neuroevolutivo che interessa circa 1 bambino su 110 nati (Weintraub, 2011) e colpisce prevalentemente i maschi rispetto alle femmine con un rapporto di circa 4:1. La causa rimane ancora pressoché ignota (Amaral et al., 2008). Il disturbo è caratterizzato a livello comportamentale da una marcata anomalia nello sviluppo delle relazioni sociali, da limitazioni comunicative e da una ristretta gamma di interessi e comportamenti (American Psychiatric Association, 1994). Le caratteristiche variano però grandemente da caso a caso, e in relazione al grado di sviluppo mentale raggiunto e all'età cronologica. Il bambino affetto da disturbo autistico ha grosse difficoltà a mettere in atto una serie di comportamenti non verbali, come ad esempio mantenere il contatto oculare con un'altra persona e riconoscerne le emozioni tramite le espressioni facciali (felicità, tristezza, rabbia, etc.). Tutto ciò porta ad una importante carenza nell'abilità di comunicare con gli altri. Un altro aspetto molto invalidante del disturbo è la tendenza a mettere in atto comportamenti stereotipati (es. sfregarsi le mani in continuazione, torcere le dita) e la marcata inflessibilità cognitiva, che li porta ad aderire sempre a specifiche e ossessive routine o ad avere un interesse morboso per parti di oggetti.

La presente ricerca mira ad approfondire la conoscenza relativa a specifiche funzioni neuro-cognitive che sembrano essere alterate nei DSA. In partico-

lare, la nostra ricerca prevede l'indagine dei meccanismi di percezione e attenzione visiva. I DSA sono oggi diagnosticati sulla base di una triade sintomatologica che prevede: (i) problemi nella comunicazione e nel linguaggio, (ii) gravi difficoltà nell'interazione sociale e (iii) la presenza di comportamenti e interessi ristretti e stereotipati. A contribuire allo sviluppo di parte di questi sintomi ci potrebbero essere processi di base percettivi e attentivi anomali, la cui traiettoria deviata nel corso dello sviluppo potrebbe essere uno dei fattori che contribuiscono all'instaurarsi di anomalie della sfera comportamentale e sociale. Un crescente numero di studi in letteratura hanno infatti dimostrato che le persone affette da un DSA mostrano anomalie nella percezione visiva, esibendo uno stile percettivo orientato ai dettagli della scena visiva (Dakin & Frith, 2005; Happé & Frith, 2006; Mottron, Dawson, Soulières, Hubert, & Burack, 2006). Questa difficoltà ad elaborare la globalità dell'informazione, preferendo un'analisi dei dettagli, ha preso il nome di "debole coerenza centrale" (Frith, 2003). Spesso la debole coerenza centrale si manifesta in performance superiori alla norma in diverse tipologie di compiti che prevedono un'analisi dettagliata dell'informazione visiva. Un esempio sono i compiti di ricerca visiva, in cui una figura bersaglio va ricercata all'interno di una configurazione di distrattori, nei quali i soggetti affetti da un DSA riportano prestazioni superiori rispetto a soggetti a sviluppo tipico (O'Riordan, Plaisted, Driver, & Baron-Cohen, 2001). Nei DSA, le traiettorie anomale di questi processi nelle prime fasi dello sviluppo, potrebbero contribuire all'instaurarsi di difficoltà nell'analizzare i volti e le informazioni in esso contenute, ed influenzare quindi l'intero dominio della cognizione sociale. Per questo una comprensione dei meccanismi neurocognitivi alla base di queste anomalie è di fondamentale importanza.

ATTIVITÀ PREVISTE

La partecipazione al progetto non comporta nessun rischio e nessun intervento invasivo sui partecipanti coinvolti. I bambini che parteciperanno difficilmente avranno benefici diretti. Tuttavia, l'obiettivo principale della ricerca è a lungo termine e mira a chiarire il più possibile le implicazioni eziologiche del DSA. Lo studio si articola in più fasi, prevede il coinvolgimento dei bambini, ma anche una collaborazione da parte dei genitori. La partecipazione allo studio è subordinata alla decisione da parte del soggetto di aderire alla ricerca. Le fasi dello studio sono le seguenti:

I. Raccolta di informazioni cliniche relative alla gravità della sintomatologia autistica tramite scale valutative eseguiti da un operatore (psicologo), e tramite la raccolta di questionari compilati dai genitori:

- Autism Diagnostic Observation Scale – (ADOS; Lord, Rutter, DiLavore & Risi, 2002)
- Social Communication Questionnaire – (SCQ; Rutter, Bailey, Lord, & Berument, 2003)

II. Prove computerizzate sottoposte al partecipante per valutare le seguenti abilità: i) orientare l'attenzione e di modularne l'ampiezza nel campo visivo; ii) selezionare correttamente l'informazione rilevante modulando la grandezza del fuoco dell'attenzione visiva; iii) discriminare un target visivo in condizioni di "affollamento" percettivo; iv) percepire la luminosità di uno stimolo in un contesto di analisi locale/globale; v) percepire le frequenze spaziali costituenti uno stimolo visivo.

MECCANISMI NEURALI E COGNITIVI RUOLO DELLA CORTECCIA SENSORIMOTORIA IN FUNZIONI COGNITIVE ELEVATE

DR.SSA BARBARA TOMASINO

E-MAIL: BTOMASINO@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasion di Prato

Collaborazioni

Azienda Ospedaliero Universitaria S. Maria della Misericordia di Udine: SOC di Neurochirurgia

DESCRIZIONE

Questo progetto è volto a testare il ruolo dell'area sensorimotoria in funzioni cognitive elevate. In letteratura, il ruolo della corteccia sensorimotoria è stato riferito al controllo dei movimenti volontari e delle sensazioni tattili.

Il suo possibile coinvolgimento in funzioni cognitive più elevate - quali ad esempio la simulazione mentale motoria, la rappresentazione di azioni e concetti motori, la memoria motoria e l'elaborazione linguistica di parole o frasi che descrivono movimenti o azioni - ha suscitato un acceso dibattito in seno alla comunità scientifica. In particolare, studi di neuroimmagine funzionale (fMRI) e di stimolazione magnetica transcranica (TMS), hanno documentato come la corteccia sensorimotoria si attivi durante compiti di "embodied cognition", un approccio emergente nell'ambito delle scienze cognitive, che ha recentemente posto l'accento sul ruolo del corpo nella cognizione.

L'idea è quella di una mente "incorporata" e situata in un ambiente esterno con il quale intrattiene un attivo rapporto dialettico. Un esempio di embodied cognition è la simulazione mentale di movimenti delle proprie parti del corpo. Risultati simili provengono dalla neurofisiologia.

Tuttavia, una meta-analisi di studi di neuroimmagine funzionale che hanno utilizzato compiti di esecuzione, simulazione mentale, osservazione di azioni, elaborazione di verbi, ha dimostrato che la corteccia sensorimotoria è attivata

solo in compiti di esecuzione reale di azioni (87.5% degli studi inclusi nella meta-analisi). Dunque, non è ancora chiaro come tale area contribuisca alla simulazione dei movimenti del corpo e, come parte del network dei neuroni a specchio, concorra funzionalmente alla comprensione e anticipazione delle azioni altrui, alla percezione linguistica¹⁴, e come sia coinvolta nella distinzione tra il sé e gli altri. In maniera simile, nonostante i crescenti sforzi di ricerca, i meccanismi cognitivi e la causa dell'attività della corteccia sensorimotoria durante elaborazione di verbi di azione restano elusive.

Le rappresentazioni motorie potrebbero essere attivate implicitamente mediante il meccanismo della simulazione mentale e tale meccanismo potrebbe essere la causa dell'attivazione osservata nella corteccia sensorimotoria. Questo tipo di ipotesi cade sotto il dominio dell'embodied cognition. Le persone possono immaginare scene, suoni e azioni in assenza di stimoli reali o esecuzione motoria reale, attraverso la simulazione mentale, abilità che ci permette di simulare mentalmente in maniera molto accurata dal punto di vista motorio e sensoriale tutte le esperienze percettive.

La simulazione mentale di un atto motorio non è accompagnata da esecuzione reale del movimento di una parte del corpo e corrisponde ad un processo attraverso il quale il cervello attiva un piano motorio e monitora il suo sviluppo attraverso modelli di feed-back interno, mantenendo inibiti l'esecuzione e l'output motoneuronale. Il network coinvolto nella simulazione motoria infatti è lo stesso che viene attivato durante l'esecuzione motoria reale, e include, nonostante non ci sia consenso su questo aspetto anche la corteccia sensorimotoria probabilmente in maniera somatotopica.

Dunque, le persone, durante lo svolgimento delle operazioni cognitive sopra descritte potrebbero usare strategie di simulazione mentale, immaginando di eseguire l'azione corrispondente.

È stato mostrato infatti che la simulazione mentale può essere evocata sia mediante istruzioni esplicite che invitano a simulare i movimenti³³ o può essere evocata implicitamente in maniera inconsapevole e automatica senza che i soggetti ricevano istruzioni di immaginare i movimenti, come ad esempio avviene durante compiti di decisione di lateralità delle parti del corpo, di giudizi circa la difficoltà-facilità-impossibilità di eseguire una determinata azione, o di riconoscimento di azioni proprie ed altrui.

Tuttavia, se tale attivazione e simulazione mentale sia necessaria o accessoria durante lo svolgimento di operazioni cognitive, se sia conseguenza di spargimento di attivazioni da aree corticali connesse alla corteccia sensorimotoria, come ad esempio la corteccia premotoria, è ancora fonte di dibattito. In particolare nell'ambito linguistico non è chiaro se la comprensione linguistica richieda e avvenga mediante la simulazione mentale.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

In una pubblicazione (Motor Simulation during Action Word Processing in Neurosurgical Patients. Tomasino B, Ceschia M, Fabbro F, Skrap M.J Cogn Neurosci. 2011 Nov 18. [Epub ahead of print] MID: 22098262) abbiamo studiato nove pazienti neurochirurgici con lesioni selettive della corteccia sensorimotoria e precentrale durante un compito immaginativo e un compito linguistico assieme a 15 soggetti sani di controllo. Una lesione nell'area che rappresenta una parte del corpo (ad es. la mano) rallenta i tempi di risposta nel compito di immaginazione di movimenti da eseguire con la stessa parte del corpo (nel compito di controllo linguistico i tempi restano invariati). Questa dissociazione mostra che l'area sensorimotoria è coinvolta durante l'elaborazione di verbi di azione solamente quando vengono simulati i movimenti corrispondenti.

Abbiamo mostrato, che il ruolo dell'area premotoria durante elaborazione linguistica è piuttosto concentrato sul versante articolatorio, in assenza di disartria, speech apraxia o afasia. In uno studio multimodale (Foreign accent syndrome: A multimodal mapping study. Tomasino B, Marin D, Maieron M, Lus T, Budai R, Fabbro F, Skrap M. Cortex. 2011 Oct 29. [Epub ahead of print] PMID: 22130092) abbiamo esplorato la neuroanatomia funzionale dell'area premotoria in una paziente che presentava la sindrome da accento straniero (FAS) con melodia e ritmo alterati a seguito di una piccola lesione all'area premotoria. Analisi strutturali, funzionali, delle fibre e dei dati intra-operatori hanno mostrato che la paziente (vs. 12 controlli) attivava in maniera sparsa aree addizionali durante i vari compiti linguistici, attorno al giro pre/postcentrale (area della laringe), i dati intra-operatori mostrano la rappresentazione della bocca sopra la lesione e l'area che provoca arresto del linguaggio sotto di essa. Questi dati sono discussi all'interno dei nuovi modelli della produzione del linguaggio e enfatizzano il ruolo delle aree motorie nell'elaborazione e produzione linguistica.

Tale area sensorimotoria è sottoposta all'effetto dell'esperienza sensorimotoria, come avviene ad esempio negli atleti (The role of volleyball expertise in motor simulation. Tomasino B, Guatto E, Rumiati RI, Fabbro F. Acta Psychol (Amst). 2012 Jan;139(1):1-6. Epub 2011 Dec 9.). La simulazione motoria dipende dall'esperienza, dalla fattibilità delle azioni da simulare e dal tipo di presentazione, ovvero se le scene motorie sono presentate come imperativi negativi suggerendo che l'attivare implicitamente le rappresentazioni sensorimotorie è modulato dal contesto, ed è adattato al repertorio motorio delle persone, questo, anche quando le azioni sono descritte verbalmente e non

eseguite.

Uno studio di imaging funzionale (B. Tomasino, Rumiati, R. & F. Fabbro, in preparation. Experience-dependent effects on Sport-Specific Sentences Processing in Elite Volleyball Players) ha permesso un approfondimento della relazione tra corteccia sensorimotoria ed esperienza motoria, in un gruppo di atleti (pallavoliste esperte, N= 12) e di non esperti (N= 12) per verificare l'impatto dell'esperienza motoria sulle attivazioni fMRI durante l'elaborazione di frasi che descrivono movimenti. Il risultati mostrano che l'esperienza motoria ha un'influenza sull'attivazione delle aree motorie durante elaborazione linguistica e durante la simulazione mentale dei movimenti. Terminata la stesura dell'articolo, in fase di ultime correzioni.

In uno studio di cranio-agopuntura, abbiamo sottoposto a RM funzionale quattordici volontari sani destrimani, uomini. Sono stati impiegati quattro run diversi in un disegno a blocchi. In ognuno ,ai soggetti, veniva chiesto di muovere rispettivamente: le mani, i piedi, la lingua (compiti motori espliciti). I movimenti erano rispettivamente: flesso-estensione delle dita, flesso-estensione del piede, movimento alto-basso della lingua a bocca chiusa. Nell'ultimo run (compito motorio implicito) venivano mostrate delle immagini di mani ruotate nello spazio, e i soggetti dovevano riconoscere se la mano-stimolo corrispondeva alla loro mano destra o sinistra, immaginando il movimento delle proprie mani. Le mani presentavano, in aggiunta, un marker rosso in corrispondenza di un dito: nel compito di controllo, il soggetto doveva decidere se il marker si trovasse a destra o sinistra dello schermo una volta portata la mano con le dita verso l'alto. I soggetti rispondevano tramite pulsanti posti su una pedaliera. I compiti sono stati eseguiti prima (Tempo 0) e dopo il posizionamento (Tempo 1), al di fuori della sala magnete, di due aghi da 0,30 mm di diametro e 25 mm di lunghezza posti ai 2/5 medi della linea MS 6 corrispondenti al segmento motorio dell'arto superiore sul lato sinistro. Si sono lasciati gli aghi per 30 minuti, a paziente giacente su lettino in posizione supina. Sono stati impiegati aghi standard in acciaio, sterili, monouso. Dopo la rimozione degli aghi i soggetti venivano riposizionati nel magnete per la ripetizione dell'esame funzionale. Abbiamo osservato una specifica attivazione delle aree corticali parietali superiori e del precuneo, necessarie alla pianificazione e al controllo degli eventi motori. La stimolazione con aghi sembrerebbe, pertanto, avere un effetto facilitatorio modulando le aree parietali implicate nella pianificazione dell'attività motoria e nel mantenimento dello schema corporeo. Articolo in fase di stesura.

In uno studio di simulazione mentale/elaborazione linguistica abbiamo sfruttato il principio secondo cui un compito può essere svolto in maniera diversa, in base al tipo di contesto in cui viene presentato. Il confronto critico è rappresentato dall'interazione, cioè dal contrasto tra l'attivazione nel compito

linguistico con verbi motori (versus non-motori), quando preceduto da compito di rotazione motoria versus compito di rotazione visiva. Tale confronto può infatti fornire interessanti spunti su cosa un contesto motorio possa aggiungere all'elaborazione del linguaggio motorio rispetto a quando lo stesso compito viene svolto in un contesto cognitivo non motorio, e contribuire a definire la questione dell'automaticità dell'attivazione del sistema motorio durante l'elaborazione linguistica. I risultati hanno mostrato una modulazione selettiva delle aree sensorimotorie quando il compito linguistico veniva svolto nel contesto motorio (vs. non motorio), indipendentemente dal tipo di verbo elaborato, sottolineando così il ruolo del contesto cognitivo sull'elaborazione di informazioni. Articolo sottomesso a PNAS.

In uno studio di pazienti neurochirurgici abbiamo indagato le aree sottese ad elaborazione di azioni e quelle implicate nell'elaborazione di nomi. 60 pazienti neurochirurgici hanno svolto i due compiti e hanno eseguito una serie di test neuropsicologici. I risultati mostrano una selettività di aree in base al tipo di elaborazione (nomi vs. verbi o azioni motorie) e una distribuzione diversa del pattern di attivazione nei pazienti che svolgono i compiti nel range di normalità e quelli che mostrano un deficit selettivo di denominazione di azioni o di nomi. Articolo in stesura.

In uno studio di pazienti neurochirurgici abbiamo indagato le aree sottese ad immaginazione di movimenti delle mani. 40 pazienti neurochirurgici hanno svolto un compito di simulazione di movimenti della mano. I risultati mostrano una distribuzione diversa del pattern di attivazione nei pazienti che svolgono i compiti nel range di normalità e quelli che mostrano un deficit selettivo di denominazione di immaginazione. Articolo in stesura.

Abbiamo messo a punto un protocollo intraoperatorio di test neuropsicologici che vengono eseguiti durante la resezione chirurgica e che testano funzioni motorie, linguistiche, di simulazione mentale. Sono stati testati circa 60 pazienti, operati sa svegli all'interno di un percorso di routine che viene seguito al dip. di Neurochirurgia di Udine. Il lavoro si svolge sia durante l'intervento per la raccolta dati che post per lo scoring e la catalogazione dei pazienti, mediante un riascolto del materiale video/audio e la trascrizione delle risposte dei pazienti. Articolo in stesura.

STANDARDIZZAZIONE DELL'ADULT SELF REPORT E DELLA BEHAVIOR CHECKLIST DI ACHENBACH

DR.SSA MONICA BELLINA

E-MAIL: MONICA.BELLINA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2012

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Azienda Ospedaliero Universitaria S. Maria della Misericordia di Udine: SOC di Neurochirurgia

DESCRIZIONE

Questo progetto di ricerca si inserisce all'interno di una collaborazione pluriennale tra il nostro Istituto e il professor Achenbach dell'Università del Vermont.

Thomas Achenbach è professore di psichiatria, professore di psicologia e Direttore del Centro per bambini, adolescenti e famiglie dell'Università del Vermont. Il professor Achenbach ha sviluppato un sistema empirico di valutazione (ASEBA- Achenbach System of Empirically Based Assessment) che offre un approccio completo per la valutazione del funzionamento adattivo e disadattivo di bambini, adolescenti e adulti. Sviluppato in decenni di ricerche ed esperienze pratiche per individuare modelli reali di funzionamento, ASEBA si compone di serie di questionari e interviste che si sono rivelate utili per lo screening dei problemi comportamentali di bambini, adolescenti e adulti provenienti da diversi contesti culturali (Crijnen et al. 1997); tali strumenti sono tra i più diffusi e utilizzati nella pratica clinica e nel campo della ricerca. Da diversi anni il professor Achenbach collabora con il nostro Istituto per promuovere lo sviluppo e la diffusione dei suoi strumenti nel contesto italiano. Per questa ragione il nostro Istituto si è occupato della traduzione e della validazione dei questionari per l'età prescolare e scolare (es. Frigerio et al., 2004; Frigerio et al., 2006) e tradotto anche quelli per l'età adulta. A seguito del nostro lavoro, il nostro Istituto è diventato l'unico distributore in

Italia autorizzato da Achenbach alla vendita dei prodotti ASEBA.

Obiettivi della ricerca

In linea con gli studi precedenti, gli scopi di questo progetto sono i seguenti:

1. Ottenere dati per la creazione di norme standardizzate del ASR e ABCL;
2. Analizzare gli effetti delle variabili sociodemografiche (sesso, età e livello socio-economico) sulla manifestazione dei problemi comportamentali;
3. Valutare la consistenza interna degli strumenti;
4. Analizzare la concordanza tra le valutazioni delle due diverse fonti (eterosomministrazione e autosomministrazione).

Metodologia

Campione. Si prevede la somministrazione di 1680 questionari ad un campione di adulti (fascia d'età 18-59 anni) della provincia di Lecco. Il campione sarà selezionato dalle liste elettorali di 13 comuni, selezionati casualmente tra i 90 comuni della provincia di Lecco. Per ciascun comune, rappresentativo dei comuni suddivisi in base alla numerosità della popolazione residente, verranno selezionati casualmente i soggetti.

Il piano di campionamento prevede la suddivisione della popolazione in quattro fasce d'età: 18-29 anni, 30-39 anni, 40-49 anni, 50-59 anni. Per ciascuna fascia d'età verranno distribuiti 400 questionari suddivisi in maniera uguale fra maschi e femmine, ad eccezione della prima fascia d'età che prevede una somministrazione totale di 480 questionari.

Tutti i soggetti così selezionati verranno preventivamente contattati telefonicamente prima dell'invio della busta con il questionario. Successivamente saranno ricontattati anche dopo l'invio della busta per accertarsi dell'arrivo della busta stessa ed eventualmente per rendersi disponibili per rispondere agli interrogativi che il soggetto selezionato può avere; questa metodologia di contatti e richiami telefonici ha l'obiettivo di favorire l'adesione alla ricerca.

Gli strumenti utilizzati: Adult Self Report e Adult Behavior Check list

I questionari per l'età adulta consentono di analizzare il comportamento del soggetto in base al funzionamento adattivo, alle scale sindromiche, a due scale globali di problematicità, ad una scala totale e a scale DSM-oriented.

Le scale sul funzionamento adattivo nella versione self report sono: amicizie, relazione con coniuge/partner, famiglia, lavoro, istruzione; nella versione eterosomministrata sono: amicizie e relazione con coniuge/partner.

Le scale sindromiche per l'età adulta sono: ansia/depressione, ritiro, lamentele somatiche, problemi di pensiero, problemi di attenzione, comportamento di trasgressione delle regole, comportamento invadente

Le scale di problematicità sono suddivise in problemi internalizzanti, esternalizzanti e problemi totali. Le scale DSM-oriented sono: problemi depressivi,

problemi d'ansia, problemi somatici, problemi di personalità evitante, problemi di attenzione e iperattività, problemi di personalità antisociale.

Analisi statistiche. Sui dati raccolti saranno effettuate le seguenti analisi:

- Analisi descrittive (distribuzione delle frequenze, percentuali, medie, ds)
- Analisi della validità interna (alpha di Cronbach)
- Correlazione fra i punteggi delle diverse sottoscale, per verificare la validità delle sottoscale
- Correlazione fra la versione autosomministrata e la versione eterosomministrata
- Confronto fra il campione normativo italiano e con il campione normativo americano
- Determinazione dei cut off, dei punti t per le norme divisi per età (18-29, 30-39, 40-49, 50-59), e sesso

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Di seguito sono riportate le attività svolte fino ad ora.

- *Revisione e stesura definitiva del protocollo di ricerca.*

Le attività svolte nei primi mesi sono state focalizzate alla stesura definitiva del protocollo di ricerca. In accordo con l'autore dello strumento abbiamo ritenuto opportuno modificare alcuni aspetti della metodologia pensata precedentemente per la somministrazione del questionario etero-somministrato Adult Behavior Check list.

In particolare abbiamo deciso di inviare in due distinti momenti e attraverso due buste diverse il questionario Adult Self Report (autosomministrato) e il questionario Adult Behavior Check List (etero-somministrato); per cui la raccolta dei due questionari è avvenuta in due fasi distinte:

1. invio in busta chiusa del questionario ASR, al soggetto selezionato casualmente, unitamente a una breve e informale lettera di primo contatto, al foglio informativo relativo le finalità e la metodologia della ricerca, al consenso informato alla ricerca e alla richiesta di fornire il nominativo di una persona che conosce bene il soggetto selezionato per la compilazione del questionario ABCL
2. invio separatamente in busta chiusa del questionario ABCL alla persona indicata dal soggetto selezionato

A causa di questa modifica abbiamo presentato nuovamente tutto il protocollo definitivo, le lettere informative e i consensi alla ricerca al Comitato Etico del nostro Istituto che ha approvato nuovamente il protocollo.

- *Selezione casuale dei comuni*

Sono stati selezionati attraverso un campionamento casuale 13 comuni della provincia di Lecco; i comuni sono suddivisi in piccoli, medi e grandi in base alla popolazione residente. I comuni selezionati sono: Lecco, Galbiate, Oggiono, Valmadrera, Casatenovo, Bosisio Parini, Dolzago, Costamasnaga, Garbagnate Monastero, Rogeno, Sirone, Annone Brianza, Suello.

- *Contatto con i comuni per il reperimento delle liste elettorali, selezione casuale dei soggetti e primo contatto, distribuzione dei questionari.*

Sono state reperite le liste elettorali dei seguenti comuni: Lecco, Galbiate, Costamasnaga, Casatenovo, Brivio, Garbagnate Monastero, Bosisio Parini. Per ciascun comune si sono susseguite le seguenti attività:

- selezione casuale dei soggetti
- reperimento del contatto telefonico di ciascun soggetto
- primo contatto telefonico
- invio della busta
- eventuale ri-contatto telefonico.

Nel frattempo è stato creato un database con i dati relativi ai soggetti partecipanti; i dati fino ad ora inseriti non sono quelli inerenti le risposte al questionario ma i dati sono identificativi di caratteristiche sociodemografiche (sesso, età, comune di residenza).

Sono state reperite anche le liste elettorali del comune di Dolzago ma non è stata ancora avviata la distribuzione delle buste; sono stati contattati altri comuni per le liste elettorali.

Sono stati distribuiti in tutto circa 960 questionari; la percentuale di adesione è per ora molto bassa e si aggira intorno al 35%. Per incrementare la percentuale di adesione abbiamo deciso di ricontattare tutti i soggetti selezionati per sollecitare coloro che pur intenzionati a partecipare alla ricerca non hanno ancora spedito il questionario e per chiarire eventualmente i dubbi delle persone che sono ancora indecise. Inoltre ad alcuni soggetti è stata re-inviata la busta dal momento che i soggetti dichiaravano di averla persa o non averla mai ricevuta.

ATTIVITÀ PREVISTE

Le attività previste per il 2012 sono le seguenti:

- Contatto con i comuni per il reperimento delle liste elettorali, selezione casuale dei soggetti, primo contatto, distribuzione dei questionari nei comuni rimanenti (6 comuni)

- Inserimento di tutti i dati inerenti il questionario ASR e ABCL nel programma computerizzato ADM.
- Creazione del dataset da inviare al prof. Achenbach per la stesura di articoli inerenti le norme Multiculturali.
- Analisi statistiche: analisi descrittive (distribuzione delle frequenze, percentuali, medie, ds); analisi della validità interna (alpha di Cronbach); correlazione fra i punteggi delle diverse sottoscale, per verificare la validità delle sottoscale; correlazione fra la versione autosomministrata e la versione eterosomministrata; confronto fra il campione normativo italiano e il campione normativo americano; determinazione dei cut off, dei punti t per le norme divisi per età (18-29, 30-39, 40-49, 50-59), e sesso.
- Stesura di un manoscritto per illustrare alla comunità scientifica i risultati emersi dalla ricerca.

TARATURA DI UNA BATTERIA DI VALUTAZIONE DELLE PRASSIE COSTRUTTIVE GRAFICHE PER L'ETÀ PRESCOLARE

DR.SSA VALERIA FLORI

E-MAIL: VALERIA.FLORI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2012

Polo scientifico

Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Scopo del lavoro è la messa a punto di una Batteria di valutazione per le competenze sviluppate dal bambino nel momento evolutivo compreso tra i 3 e i 7 anni, mirata all'analisi delle basi dell'organizzazione prassica costruttiva-grafica e costituita dall'aggiornamento di prove già esistenti e strumenti realizzati ex novo.

Il disegno che ne è la massima rappresentazione è uno degli strumenti maggiormente utilizzati dal terapeuta della Neuro-Psicomotricità dell'età evolutiva, per l'importanza che ha questa attività quale misura sia della capacità di rappresentazione del mondo interiore del bambino, sia del livello di sviluppo di abilità specifiche raggiunto dal bambino stesso; attraverso una modalità certamente a lui congeniale.

Nella pratica clinica quotidiana è stata riscontrata infatti la necessità di prove specifiche e complete per la valutazione delle prassie costruttive grafiche per i bambini di età prescolare e per tutte le abilità e competenze coinvolte: disegno su copia, disegno su rappresentazione, grafomotricità.

La ricaduta clinica è quella della disponibilità e dell'utilizzo di uno strumento completo, di semplice applicazione e polifunzionale, da applicarsi durante le diverse fasi dell'intervento riabilitativo ed anche all'interno di un contesto di screening e prevenzione.

Il progetto si pone come prosecuzione di una precedente ricerca condotta in un gruppo ristretto di bambini, attraverso la somministrazione di una batteria composta da:

- Test di Copia e Riproduzione di Immagini TPV (Erickson, 1994)
- Test di Copia della Figura B di Rey (Di Nuovo, 1976)
- Test di Produzione Grafica su Rappresentazione Mentale – Test dell'Elefan-

te (Flori, Giannasso, 2010)

Grazie all'elaborazione dei dati raccolti con la somministrazione della batteria abbiamo ottenuto per tutti e tre i test presi in esame degli indici di tendenza di sviluppo delle prassie costruttive grafiche stabili e uniformi e, pur riconoscendo come limite del lavoro, la ristrettezza del campione reclutato abbiamo ottenuto alcune differenze significative per la pratica clinica dal confronto dei dati raccolti (2010) con quelli di standardizzazione sia del TPV (1994) che del Rey B (1976).

La fase di lavoro attuale è rivolta a completare il progetto di validazione della batteria con la sua sperimentazione in una popolazione di numerosità più elevata e più rappresentata sul territorio nazionale, con lo scopo di aggiornare la taratura dei test già esistenti (Test di copia e riproduzione di immagini TPV e Test della Figura di Rey B) e di procedere alla validazione e standardizzazione del test da noi ideato (Test dell'elefante), dati i positivi risultati ottenuti durante la prima fase.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Il progetto si pone come prosecuzione di una precedente ricerca condotta nel periodo gennaio – settembre 2010, in un gruppo ristretto di bambini, attraverso la somministrazione di una batteria composta da:

- Test di Copia e Riproduzione di Immagini TPV (Erickson, 1994)
- Test di Copia della Figura B di Rey (Di Nuovo, 1976)
- Test di Produzione Grafica su Rappresentazione Mentale – Test dell'Elefante (Flori, Giannasso, 2010)

Il campione reclutato tutto nella regione Lombardia era composto da 573 bambini, di cui 300 femmine e 273 maschi, appartenenti alla fascia di età compresa tra i 36 e i 90 mesi ed in linea con le principali tappe di sviluppo neuropsicomotorio. Sono stati esclusi tutti i bambini con diagnosi certa di patologia neuropsichica e sono state proposte le prove da parte di personale addestrato alla modalità di somministrazione. Le prove sono state raccolte e sono stati analizzati gli andamenti dei risultati medi bilanciati per sesso ed equamente suddivisi in fasce di età (3 – 7 anni).

L'andamento dei risultati raccolti ha evidenziato per le prove TPV e REY delle curve di crescita lineari e indici di tendenza di sviluppo uniformi, e queste evidenze vengono considerate come buoni indici di validità delle prove scelte, soprattutto dal punto di vista predittivo.

L'andamento dei risultati medi del Test dell'Elefante ha evidenziato una curva di crescita progressiva e costante e un'evoluzione esponenziale delle abilità oggetto dello studio che dimostrano che la prova autocostituita risulta essere

valida e affidabile per l'obiettivo posto.

Infine il confronto fra i risultati ottenuti alle prove già esistenti tra la standardizzazione precedente e i risultati attuali ha evidenziato, seppur con la ristrettezza del campione, differenze statistiche degne di nota, senza andamento costante, ma con differenze peculiari per ognuna delle fasce di età considerate che giustificherebbero l'aggiornamento dei dati del passato per un reale miglioramento della pratica clinica quotidiana.

Appare pertanto opportuno un aggiornamento della taratura dei test già esistenti e la validazione e standardizzazione per il test da noi ideato, dati i positivi risultati ottenuti durante la prima sperimentazione.

ATTIVITÀ PREVISTE

Si prevede di raccogliere i dati su un campione pari a circa 2000 bambini ugualmente rappresentati nel Nord (Lombardia), Centro (Marche, Umbria) e Sud Italia (Sicilia, Basilicata) bilanciati per sesso ed equamente suddivisi in fasce di età (3 – 7 anni).

Verranno reclutati per lo studio solo bambini in linea con le principali tappe di sviluppo e verranno pertanto esclusi i bambini con diagnosi certa di patologia neuropsichica.

La raccolta dei dati normativi avvenuta durante tutta la fase sperimentale del progetto e nei mesi immediatamente successivi, grazie alle collaborazioni avviate per la prima fase conclusa; allo stato attuale risulta praticamente completata, sono stati raccolti i disegni presso le scuole dell'infanzia e la prima classe della scuola primaria di diverse scuole sul territorio nazionale, la raccolta è avvenuta ad opera di studenti del Corso di Laurea in Terapia della Neuropsicomotricità dell'età evolutiva dell'Università degli Studi di Milano, quale attività di tirocinio o di tesi.

Gli studenti, adeguatamente addestrati alla conoscenza e alle modalità di somministrazione degli strumenti, hanno provveduto a raccogliere le informazioni e i disegni dei bambini, ai quali hanno sottoposto individualmente le prove della batteria:

- Test di copiatura e riproduzione di figure semplici tratta dal test di percezione visiva TPV (Erickson): prova di copiatura da modello di figure semplici in ordine progressivo di complessità; è richiesta la copiatura fedele del modello in uno spazio predisposto. Il test viene utilizzato esattamente come descritto nel manuale del test standard (Hammil, Pearson, Voress; 1994), non sono state apportate modifiche, né alle figure né alla modalità di somministrazione e correzione.
- Test di copiatura e riproduzione di figura complessa Rey B: è richiesta la

copiatura fedele del modello su di un foglio bianco, al bambino vengono forniti da parte del clinico colori diversi durante l'esecuzione in modo da poter ricavare in seguito l'ordine di realizzazione delle diverse componenti della figura. Anche questa prova viene utilizzata esattamente come descritto nel manuale del test (Rey, 1941; Di Nuovo, 1976), non sono state apportate modifiche né alla figura né alla modalità di somministrazione e correzione.

- Test dell'elefante per la produzione grafica su rappresentazione mentale, la prova è stata realizzata appositamente nella fase preliminare (Flori, Giannaso; 2010): al bambino viene richiesto di disegnare un elefante e gli vengono forniti un foglio e dei colori. La prova prevede la valutazione in termini numerici di presenza/assenza e riconoscibilità/precisione di alcuni items ritenuti importanti e significativi per la realizzazione del disegno, correlati alle caratteristiche peculiari dell'immagine dell'elefante.

Gli studenti hanno provveduto sia alla raccolta dei materiali che delle generalità dei bambini che possono essere inclusi nel campione: età anagrafica espressa in mesi e sesso (maschio/femmina).

Nella fase attuale il referente del progetto si dedicherà alla correzione, all'analisi statistica e all'elaborazione delle norme.

Analogamente alla fase preliminare, per ciascuna variabile (TPV, REY B, ELEFANTE) verranno calcolati i percentili del punteggio medio standard e le età equivalenti. I calcoli verranno ripetuti per intervalli di età di sei mesi e di un anno.

Il calcolo dei percentili sarà ottenuto per ogni classe di età valutando la media M e la deviazione standard DS del punteggio. Per ottenere il valore X del punteggio corrispondente a ciascun percentile verrà calcolato il relativo valore Z della distribuzione normale standard (gaussiana con media 0 e deviazione standard 1) calcolando il corrispondente punteggio secondo la seguente formula: $X = Z * DS + M$.

Per quanto riguarda le età equivalenti verrà calcolata la media del punteggio per ciascuna classe di età e verranno interpolati i risultati in modo da ottenere il valore corrispondente a tutte le età con intervalli di un mese.

Tutti i calcoli verranno svolti utilizzando il software di calcolo statistico R [43]. Il processo di elaborazione dei dati verrà eseguito dal Ing. Pozzoli, presso gli uffici di Bioinformatica dell'IRCSS E. Medea.

Per tutta la parte metodologica sono previsti alcuni momenti di supervisione da parte della Dr.ssa Maria Luisa Lorusso, psicologa specializzata in neuropsicologia clinica e tecniche di ricerca.

CARATTERIZZAZIONE DI BAMBINI ED ADOLESCENTI CON PROFILO COMPORTAMENTALE DI DEFICIT DI AUTOREGOLAZIONE (DYSREGULATION PROFILE-DP)

DR.SSA MARIA NOBILE

E-MAIL: MARIA.NOBILE@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea: Poli Scientifici di Bosisio e San Vito - Udine

DESCRIZIONE

Nell'ambito di ricerca della psicopatologia dello sviluppo è stato recentemente identificato un profilo comportamentale particolarmente grave definito come 'Deficit di autoregolazione' (Dysregulation Profile – DP) o anche 'Deficit di autoregolazione emotiva' (deficient emotional self-regulation - DESR) (Doyle et al 2010). Tale profilo è caratterizzato dalla presenza di importanti difficoltà nell'autoregolazione sia i comportamenti esternalizzanti (aggressività, impulsività) sia i sentimenti e le emozioni (tono dell'umore marcatamente instabile ed irritabile) ed in particolare da: 1) deficit nell'autoregolazione dell'attivazione fisiologica caratterizzata da forti emozioni; 2) difficoltà ad inibire comportamenti inappropriati in risposta sia ad emozioni negative che ad emozioni positive; 3) difficoltà nel rifocalizzare l'attenzione una volta che questa sia stata posizionata su stimoli ad alto contenuto emotivo; 4) disorganizzazione nella pianificazione comportamentale in risposta ad una attivazione emotiva. Clinicamente include anche scarsa tolleranza alla frustrazione, frequente comparsa di scoppi di rabbia e iperreattività emotivo-comportamentale.

L'approccio attualmente più utilizzato per identificare questo profilo prevede l'uso della Child Behavior Checklist (CBCL) (Achenbach et al. 2001). Il profilo consiste di punteggi particolarmente elevati su tre scale che indagano ambiti comportamentali molto diversi: Ansia/Depressione, Attenzione e Comportamento aggressivo.

Sebbene questi tratti siano stati riconosciuti come clinicamente molto gravi e predittivi di un aumentato tasso di suicidi, di un'aumentata comorbidità con i disturbi dell'umore e con i disturbi di comportamento dirompente, un aumentato numero di ospedalizzazioni e una più grave compromissione funzionale, pochi studi hanno indagato i substrati neuropsicologici, genetici e di imaging in questi ragazzi (per una rassegna Doyle et al 2010).

I pochi studi che hanno finora indagato questo profilo comportamentale lo hanno fatto in campioni di ragazzi affetti da Disturbo da Deficit dell'Attenzione e Iperattività (ADHD) o affetti da Disturbo dell'Umore ad esordio giovanile e per lo più adottando un profilo trasversale (Spencer et al. 2011).

Gli studi gemellari condotti finora hanno stimato l'ereditabilità di questo tratto come compresa fra 60-70%, l'unico studio longitudinale indica un effetto genetico sulla stabilità del tratto dell'80%. Questi studi suggeriscono che nell'insieme il tratto sia altamente stabile ed ereditabile. Due studi genome-wide sono stati finora condotti (McCough et al 2011 e Spencer et al 2011), suggerendo delle possibili zone di interesse su 2q23, 1p21.1, 6p21.3 e 8q21.13, zone che sono state già precedentemente associate ad altre patologie psichiatriche maggiori come l'ADHD, il disturbo bipolare e la schizofrenia.

Nessuna di questi studi tiene tuttavia conto delle possibili interazioni gene x ambiente, né indaga i substrati neurali.

Sappiamo, al contrario che le cause eziopatogenetiche dei disturbi psicopatologici hanno origine a partire da complesse interazioni gene-ambiente (es. Hall et al., 2006; Nobile et al., 2007; Nobile et al 2009; Nobile et al 2010) e da potenziali processi alterati di neurosviluppo cerebrale.

Tra i principali fattori di rischio ambientali sono segnalati la familiarità, le complicanze ostetriche, i traumi perinatali, le infezioni, le patologie autoimmuni, le situazioni stressanti precoci (maltrattamenti e abusi) e più in generale, le caratteristiche del nucleo familiare dove il bambino cresce e che ne media le prime esperienze, il neuroticismo, il disadattamento sociale, l'esposizione all'uso di sostanze psicoattive tra cui l'abuso di cannabis, forme inusuali di attaccamento tra bambino e genitore. Fattori genetici, ambientali e di neurosviluppo, oltre che influenzare l'esordio, hanno un'azione anche sulla ricorrenza e la gravità di malattia, sull'espressione psicopatologica e comportamentale e sulla risposta ai trattamenti (Caspi et al. 2003).

Ora la ricerca punta ad indagare più accuratamente le modalità di interazione gene-ambiente e come queste si esprimano a livello comportamentale attraverso la mediazione di processi neurobiologici e, ad un livello più alto, di processi neuropsicologici.

Recenti studi di neuroimaging suggeriscono che anomalie morfo-funzionali e biochimiche della corteccia fronto-temporale e del sistema limbico sottendono la neurobiologia della regolazione emotiva e comportamentale (Sala

et al. 2004; Sassi et al. 2005; Thomas et al. 2001; Wood et al. 2006). In un recente studio, Rich et al. (2011) usando la magnetoencefalografia hanno comparato bambini con disregolazione severa dell'umore caratterizzata da umore alterato ed iperreattività agli stimoli emozionali negativi a bambini con disturbo bipolari e bambini sani durante un compito affettivo. Gli autori hanno mostrato un aumento della reattività rispetto a stimoli negativi in codesti bambini rispetto ai bipolari o ai sani. Essi inoltre rispondevano con un significativo aumento di attivazione della corteccia cingolata anteriore e del giro mediale frontale rispetto ai controlli sani. Tuttavia, non è chiaro se le vie di connessione costituite dalla sostanza bianca intra- ed inter-emisferica che collegano le regioni coinvolte in tale regolazione siano integre e normali e, in caso di evidenza negativa, se lo fossero prima dell'esordio della malattia. In secondo luogo, deve essere ancora chiarito il meccanismo mediante il quale tali anomalie eventualmente correlino con il disturbo della regolazione emotivo-comportamentale. Infatti, a nostra migliore conoscenza, ad oggi non esistono studi specifici di imaging effettuati su bambini con 'Deficit di autoregolazione' (Dysregulation Profile –DP) e dunque non ci sono prove che dimostrino se tale comunicazione sia deficitaria da un punto di vista morfofunzionale e quale ne sia la modulazione genetica.

Dati preliminari

Questo studio di focalizzazione su bambini e adolescenti con Dysregulation Profile nasce da una precedente ricerca corrente triennale, (RC " I substrati morfofunzionali e genetici delle pre-psicosi: uno studio multimodale con risonanza magnetica"), effettuato sempre in collaborazione tra le sedi di Bosisio Parini e Udine, che aveva come obiettivo la caratterizzazione di bambini a rischio di psicosi e depressione. In questo studio precedente, denominato 'GENESIS', abbiamo potuto raccogliere dati preliminari sull'incidenza e sulla prevalenza del DP. I dati preliminari finora raccolti ed analizzati sono in linea con la letteratura internazionale sopra riportata e suggeriscono che questo profilo è molto presente nella psicopatologia dello sviluppo ed è, come sopra riportato, un importante predittore di sviluppo di psicopatologia maggiore. Da quanto esposto sopra ed in base ai dati preliminari in nostro possesso abbiamo deciso di proporre un progetto specifico che andasse a caratterizzare questa dimensione psicopatologica, utilizzando la medesima metodologia utilizzata nel progetto Genesis, di modo di poter successivamente comparare le due coorti (quella a rischio di psicosi e depressione e quella con Dysregulation Profile).

Obiettivi

A partire dai dati raccolti durante la RC “I substrati morfofunzionali e genetici delle pre-psicosi: uno studio multimodale con risonanza magnetica”, questo studio triennale si propone di esplorare i correlati neuropsicologici, genetici e morfofunzionali –tramite un’applicazione multimodale di Risonanza Magnetica- associati alle difficoltà di autoregolazione dell’emotività e del comportamento. L’obiettivo verrà raggiunto focalizzandosi sulle analisi delle sottoscale CBCL che configurano il cosiddetto Dysregulation Profile –indice già incluso nei dati raccolti nella RC precedente- ed ampliando la raccolta del campione per aumentare il potere delle analisi statistiche e di associazione genetica. Questo studio si propone, inoltre, di adottare una prospettiva longitudinale, tipica della psicopatologia dello sviluppo, per valutare non solo il profilo trasversale ma l’andamento temporale di questo profilo comportamentale in relazione anche a variabili ambientali ritenute particolarmente a rischio o protettive per la risoluzione o per la stabilizzazione nel tempo di questo tratto psicopatologico.

Gli obiettivi si articoleranno come segue:

1. valutare l’andamento nel tempo del tratto psicopatologico DP;
2. valutare l’effetto di alcune variabili ambientali, in particolare riferite all’ambiente familiare, sull’andamento del tratto psicopatologico DP;
3. identificare se anomalie della connettività morfofunzionale siano substrati significativi e/o marker endofenotipici in bambini e adolescenti con elevati punteggi comportamentali di DP
4. valutare la moderazione dei fattori genetici sull’effetto delle variabili ambientali e sulla connettività morfo-funzionale;
5. valutare la possibile associazione di marcatori genetici con il tratto comportamentale DP attraverso studi di linkage in famiglie nucleari;
6. valutare l’interazione gene x ambiente sul tratto comportamentale DP in studi su fratelli (sib-pair analysis)

ATTIVITÀ PREVISTE

Metodologia

Soggetti

Verranno reclutati 100 bambini di età inclusa tra i 5 e i 16 anni presso le sedi IRCCS “E. Medea” di Pasian di Prato (UD), Bosisio Parini (LC), Conegliano Veneto (TV) e San Vito al Tagliamento (PN) che abbiano problematiche di natura emozionale e/o comportamentale e che abbiano già ricevuto una prima valutazione con scala CBCL. Saranno esclusi dalla partecipazione allo studio, senza che ciò comporti alcuna penalizzazione, gli individui che si tro-

vano in una delle condizioni di esclusione dagli studi di Risonanza Magnetica o soggetti con QI totale <70 come evidenziata alla WIPPSI o alla WISC-III, gli individui con patologie neurologiche e mediche maggiori.

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.

Per poter effettuare studi di ereditabilità e di associazione genetica verranno inoltre reclutati anche i fratelli ed i genitori dei pazienti.

70 bambini con i genitori e quando possibile i fratelli sono già stati reclutati con analogo protocollo durante la RC "I substrati morfofunzionali e genetici delle pre-psicosi: uno studio multimodale con risonanza magnetica" presso le sedi di Bosisio Parini e Pesian di Prato, per questi sono già disponibili le valutazioni genetiche e neuropsicologiche e per 30 di questi le valutazioni neuro morfologiche.

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 salivare per analisi genetiche 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:

- Development And Well-Being Assessment (DAWBA; Goodman e al., 2000), intervista diagnostica semistrutturata per la formulazione di diagnosi clinica in base ai criteri DSM-IV
- Youth Self Report for ages 11-18 (YSR; Achenbach e Rescorla, 2001) per l'autovalutazione delle difficoltà comportamentali
- Temperament and Character Inventory (TCI; Cloninger e al., 1993; 1995) o Junior Temperament and Character Inventory - Version 2 (J-TCI; Cloninger e al., 1995), test di personalità/temperamento
- Questionario uso/abuso tabacco, droghe e alcool – revised for ages 12-18 (Achenbach, 2001)

- Parental Bonding Instrument (PBI; Parker e al., 1979; Favaretto e al., 2001) per la valutazione degli stili genitoriali
- Edinburgh Inventory for Handedness, per le preferenze manuali
- Scala dello sviluppo puberale di Petersen
- Wechsler Intelligence Scale for Children – III Edition (WISC-III; Wechsler, 1991; Orsini e Picone, 2006) o Wechsler Adult Intelligence Scale – Revised (WAIS-R; Wechsler, 1981; Orsini e Laicardi, 1997) per la valutazione del quoziente intellettivo. Subtest: Vocabolario, Disegno con i cubi, Memoria di cifre

Test per il genitore che accompagna il bambino/ragazzo:

- Development And Well-Being Assessment (DAWBA; Goodman e al., 2000), intervista diagnostica semistrutturata per la formulazione di diagnosi in base ai criteri DSM-IV
- Scheda sociodemografica (composizione nucleo familiare, scolarità e professione attuale dei genitori)
- Child Behavior CheckList for ages 6-18 (CBCL; Achenbach e Rescorla, 2001), etero valutazione di difficoltà comportamentali (riferito al soggetto e ad eventuali fratelli/sorelle partecipanti)
- Adult Self Report for ages 18-59 (ASR; Achenbach, 2003), autovalutazione di difficoltà comportamentali (riferito al genitore)
- Adult Behavior CheckList for ages 18-59 (ABC; Achenbach, 2003) eterovalutazione di difficoltà comportamentali (riferito dal genitore al partner)
- Parent Problem Checklist (PPC), questionario di autovalutazione per problemi relativi al capacità parentali
- Relationship Quality Index (RQI) , questionario di autovalutazione per problemi relativi alla relazione genitore-figlio
- Dyadic Adjustment Scale (DAS) , questionario di autovalutazione per problemi relativi alla relazione genitore-figlio.

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 modulazione delle emozioni. 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 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.

Modulo 3 – Neuropsicologia

Test computerizzati attentivi/prefrontali

- Continuous Performance Task, Ax version (Ax-CPT)
- Iowa Gambling Task (IGT)
- Span of Apprehension (SoA). Valutazione neuropsicologica

Effettuata tramite: A Developmental NEuroloPSYcological Assessment, 2 edition (NEPSY; Korkman et al., 2007). Sono stati selezionati i seguenti subtest:

- Sensorimotorio: Tapping delle dita; Imitazione posture manuali; Sequenze motorie manuali; Precisione visuomotoria
- Competenze sociali: Teoria della mente, B; Riconoscimento di emozioni
- Visuospaziale: Frecce
- Memoria e apprendimento: Memoria di facce, immediata; Memoria di facce, differita
- Attenzione e funzioni esecutive: Attenzione visiva

Valutazione del linguaggio

Effettuato tramite: Batteria di Valutazione del Linguaggio in Bambini dai 4 ai 12 anni (BaValB 4-12; Marini e Fabbro). Subtest:

- Test di eloquio narrative (4 storie)
- Test di comprensione di strutture sintattiche
- Test di comprensione di modi di dire e proverbi
- Test di comprensione della prosodia linguistica
- Test di comprensione della prosodia emotiva

Analisi Statistica

L'analisi statistica verrà condotta utilizzando il software SPSS (SPSS Inc., Chicago).

Il comportamento oggetto di interesse DP tratta dalla CBCL verrà utilizzato come tratto continuo oppure come variabile discreta quando le tre scale oggetto di interesse avranno contemporaneamente un punteggio superiore al 90 percentile.

Un'analisi multivariata della covarianza (ANCOVA) sarà effettuata con il tratto comportamentale come variabile dipendente e l'età ed il sesso come covariate. I dati di imaging, neuropsicologici e genetici saranno le variabili indipendenti. Nel caso dei dati di neuroimaging le variabili verranno confrontate tra i gruppi (pazienti a rischio e controlli sani).

Verranno utilizzati modelli di path analysis per valutare la presenza di mediazione tra le variabili psicopatologiche e i fattori di rischio ambientale. Nello stesso modello verranno inserite i marcatori genetici come fattori di moderazione. Verranno inoltre utilizzati modelli di mediazione moderata sulla base dei modelli suggeriti da Preacher and Hayes 2005.

Analisi Genetica

Un prelievo di saliva sarà ottenuto per estrarre il DNA secondo procedure standard. Le analisi genetiche prenderanno in considerazione polimorfismi in geni funzionanti nel SNC e coinvolti in attività regolatorie, tra questi verranno inizialmente indagati: Disrupted in Schizophrenia 1 (DISC1), Neuregulin 1 (NRG1), Glutamate Receptor Ionotropic Kainate type 4 (GRIK4), Catechol-O-Methyl Transferase (COMT) Val158Met, Serotonine Transporter (5-HTT), and BDNF. 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.

Saranno inoltre condotte analisi di associazione genetica tramite analisi di famiglie nucleari e di coppie di fratelli. I trios saranno analizzati sia in base alla diagnosi categoriale che al tratto quantitativo utilizzando i seguenti pacchetti per le analisi statistiche genetiche TDT, FBAT, PBAT,

ETDT, TRANSMIT, HBAT, utilizzando anche una prospettiva GxE quando possibile. Il modulo SIBPAL di SAGE package sarà utilizzato per analizzare il linkage nelle coppie di fratelli used to evaluate linkage in sib pairs by means of identity by descent (IBD) sib-pair and Haseman-Elston regression analyses.

Post-processing dei dati di imaging e neuropsicologici

Verranno effettuate analisi strutturali volumetriche su Workstation usando software semi-automatici, quali Brains2 (<http://www.psychiatry.uiowa.edu/pdf/brains2>), FreeSurfer e MedX ed analisi di ricostruzione tridimensionale utilizzando il software Amira (TGS Inc., San Diego, CA, USA). Le sequenze DTI saranno gestite ed analizzate mediante il software MatLab come precedentemente descritto dal nostro gruppo (Andreone et al. 2007a; Agarwal et al. 2008; Brambilla et al. 2005a). Le sequenze CSI verranno analizzate tramite il software LC Model. I metaboliti con affidabile possibilità di quantificazione saranno analizzati (NAA=N-acetil-aspartato, PCr+Cr=fosfocreatina+creatina, TMA=trimetilamina o metabolici contenenti colina, INO=mio-inositolo, Glx=glutammato+glutammica, GABA) in modo assoluto e come rapporti con la creatina, come precedentemente mostrato dal nostro gruppo (Brambilla et al. 2002; Brambilla et al. 2005b; Brambilla et al. 2005c; Brambilla et al. 2004b). I livelli assoluti dei metaboliti cerebrali saranno stimati in base alla concentrazione dei corrispettivi metaboliti all'interno di un 'phantom' con una determinata e conosciuta a priori concentrazione metabolica. Le regioni anatomiche cerebrali di interesse verranno individuate utilizzando metodiche standardizzate e atlanti per la misurazione del cervello secondo metodi in precedenza utilizzati dal nostro gruppo, con particolare riguardo alla sostanza bianca (Andreone et al. 2007b; Baiano et al. 2008; Brambilla et al. 2004a;

Brambilla et al. 2003) e saranno tracciate da operatori in cieco rispetto all'identità del soggetto in esame e alle altre variabili in studio. Tutti gli operatori verranno allenati da un esperto e raggiungeranno un'alta affidabilità di tracciamento. L'affidabilità delle misurazioni saranno definite dal coefficiente di correlazione intraclasse (CCI), stabilito tracciando 10 soggetti per ogni singola struttura, e dovrà essere maggiore di 0.90.

I dati di neuroimmagine funzionale saranno analizzati con programmi appositi [e.g., MatLab (The Mathworks Inc., Natick, MA/USA, e SPM5 (Statistical Parametric Mapping software, SPM; Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, UK <http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>)]. Le immagini dummy images verranno scartate, eseguiremo il preprocessamento dei dati funzionali [riallineamento delle immagini al volume di riferimento della time-series, segmentazione, e utilizzo del file con i parametri di segmentazione per la normalizzazione dei dati EPI sul template standard (Montreal Neurological Institute) fornito da SPM5, re-sampling al voxel size di $2 \times 2 \times 2$ mm, smoothing spaziale con un 6-mm FWHM Gaussian kernel per raggiungere i requisiti statistici del Modello Lineare Generale (General Linear Model) e per compensare per variazioni residue macro-anatomiche tra i soggetti]. Eseguiremo inizialmente la random effects analysis su tutto il cervello. Le condizioni sperimentali saranno specificate come regressori di interesse. A livello di singolo soggetto applicheremo i contrasti lineari ai parameter estimates delle condizioni sperimentali ottenendo così t-statistics per ogni voxel. Per la random effects analyses di secondo livello (analisi di gruppo), le immagini di contrasti ottenute a livello del singolo soggetto saranno inserite in un t-test per creare una mappa statistica $SPM\{T\}$, indicativa di attivazioni significative specifiche per una condizione a livello di analisi di gruppo. Potranno essere condotte analisi basate su Regioni di Interesse. L'interpretazione anatomica dei risultati funzionali sarà condotta utilizzando l'SPM Anatomy toolbox (Eickhoff et al., 2005).

Verranno inoltre implementati analisi di trattografia e functional connectivity mediante tecniche TBSS e DCM.

Infine, i dati neuropsicologici e del linguaggio saranno analizzati in base a metodi standardizzati precedentemente utilizzati dal nostro gruppo (Brambilla et al. 2007; Sala et al. 2008; Marini et al. 2008; Tavano et al. 2008).

Riferimenti Bibliografici

- Andreone N, Tansella M, Cerini R, Rambaldelli G, Versace A, Marrella G, Perlino C, Dusi N,
- Pelizza L, Balestrieri M, Barbui C, Nose M, Gasparini A, Brambilla P. Ce-

- rebral atrophy and white matter disruption in chronic schizophrenia.. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257: 3-11, 2007b.
- Baiano M, Perlini C, G Rambaldelli, R Cerini, N Dusi, M Bellani, G Spezza-pria, A Versace, M Balestrieri, R Pozzi Mucelli, M Tansella, Paolo Brambilla. Decreased entorhinal cortex volumes in schizophrenia. *Schizophrenia Res* 102: 171-180, 2008.
 - Bentall, R.P., Baker, G.A., Havers, S., 1991. Reality monitoring and psychotic hallucinations. *Br J Clin.Psychol.* 30 (Pt 3), 213-222.
 - Brebion, G., Amador, X., David, A., Malaspina, D., Sharif, Z., Gorman, J.M., 2000. Positive symptomatology and source-monitoring failure in schizophrenia--an analysis of symptom-specific effects. *Psychiatry Res* 95, 119-131.
 - Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti MA, et al (2005b) 1H magnetic resonance spectroscopy investigation of the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder patients. *J Affect Disord* 86:61-7.
 - Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti MA, et al (2005c) 1H Magnetic resonance spectroscopy study of dorsolateral prefrontal cortex in unipolar mood disorder patients. *Psychiatry Res* 138:131-9.
 - Brambilla P, Nicoletti M, Sassi RB, et al (2004a) Corpus callosum signal intensity in patients with bipolar and unipolar disorder. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:221-5.
 - Brambilla P, Stanley JA, Sassi RB, et al (2004b) 1H MRS study of dorsolateral prefrontal cortex in healthy individuals before and after lithium administration. *Neuropsychopharmacology* 29:1918-24.
 - Brambilla P, Nicoletti MA, Sassi RB, et al (2003) Magnetic resonance imaging study of corpus callosum abnormalities in patients with bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 54:1294-7.
 - Brambilla P, Stanley JA, Nicoletti M, et al (2002) 1H MRS brain measures and acute lorazepam administration in healthy human subjects. *Neuropsychopharmacology* 26:546-51.
 - Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R. Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 2003 Jul 18;301(5631):386-9.
 - Doyle, Biederman, Ferreira, Wong, Smoller, Faraone (2010) Suggestive linkage of the CBCL juvenile bipolar disorder phenotype to 1p21, 6p21 and 8q2. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 49(4): 378–387
 - Hall J, Whalley HC, Job DE, Baig BJ, McIntosh AM, Evans KL, Thomson

- PA, Porteous DJ, Cunningham-Owens DG, Johnstone EC, Lawrie SM. A neuregulin 1 variant associated with abnormal cortical function and psychotic symptoms. *Nat Neurosci*. 2006 Dec;9(12):1477-8.
- Jeannerod, M., 1994. *The representing brain: neural correlates of motor intention and imagery*. 17 ed, pp. 187-245.
 - Marini, A. (2001) *Elementi di psicolinguistica generale*, Milano Springer Verlag
 - Marini, A. e Carlomagno, S. (2004) *Analisi del discorso e patologia del linguaggio*, Milano, Springer Verlag
 - Marini, A. (2008). *Manuale di neurolinguistica*. Roma, Carocci
 - Marini, A., I. Spoletini, I.A. Rubino, M. Ciuffa, G. Banfi, A. Siracusano, P. Bria, C. Caltagirone, and G. Spalletta (2008a). The Language of Schizophrenia: An Analysis of Micro- and Macrolinguistic Abilities and their Neuropsychological Correlates. *Schizophrenia Research*. 105, 144–155
 - Marini, A., A. Tavano, and F. Fabbro (2008b). Assessment of narrative abilities in Italian children with Specific Language Impairment. *Neuropsychologia*, 46, 2816-2823
 - McGough JJ, Loo SK, McCracken JT, et al. CBCL Pediatric Bipolar Disorder Profile and ADHD: Comorbidity and Quantitative Trait Loci Analysis. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008 Aug 21;47(10)
 - Nobile M, Giorda R, Marino C, Carlet O, Pastore V, Vanzin L, Bellina M, Molteni M, Battaglia M. Socioeconomic status mediates the genetic contribution of the dopamine receptor D4 and serotonin transporter linked promoter region repeat polymorphisms to externalization in preadolescence. *Development and Psychopathology*, 2007, 19: 1147-1160
 - Nobile M, Rusconi M, Bellina M, Marino C, Giorda R, Carlet O, Vanzin L, Molteni M, Battaglia M. The influence of family structure, the TPH2 G-703T and the 5-HTTLPR serotonergic genes upon affective problems in children aged 10-14 years. *J Child Psychol Psychiatry*. 2009 Mar;50(3):317-25
 - Nobile M, Rusconi M, Bellina M, Marino C, Giorda R, Carlet O, Vanzin L, Molteni M, Battaglia M. COMT Val158Met polymorphism and socioeconomic status interact to predict attention deficit/hyperactivity problems in children aged 10-14. *Eur Child Adolesc Psychiatry*. 2010 Jul;19(7):549-57. Epub 2009 Nov 28
 - PREACHER KJ, HAYES A F. Asymptotic and resampling strategies for assessing and comparing indirect effects in multiple mediator models. *Behav Res Methods* 2008;40:879-891
 - Rich BA, Carver FW, Holroyd T, Rosen HR, Mendoza JK, Cornwell BR, Fox

- NA, Pine DS, Coppola R, Leibenluft E (2011). Different neural pathways to negative affect in youth with pediatric bipolar disorder and severe mood dysregulation. *Journal of Psychiatric Research* 45, 1283-1294
- Sassi RB, Stanley JA, Axelson D, Brambilla P, Nicoletti MA, Keshavan MS, Ramos RT, Ryan N, Birmaher B, Soares JC. Reduced NAA levels in the dorsolateral prefrontal cortex of young bipolar patients. *Am J Psychiatry*. 2005 Nov;162(11):2109-15
 - Shellock F.G., Cruess J.V. (2004): MR Procedures: Biologic Effects, Safety, and Patient Care, *Radiology*, 232: 635-652
 - Shellock F.G. (2008): Reference Manual for Magnetic Resonance Safety, Implants, and Devices: 2008 Edition, Magmedix: Fitchburg, MA
 - Spencer J, Faraone S, Surman, Petty, Clarke, Batchelder, Wozniak, and Biederman J (2011) Toward Defining Deficient Emotional Self-Regulation in Children with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder Using the Child Behavior Checklist. *Postgraduate Medicine: Volume: 123 No.5*
 - Tavano A, Sponda S, Fabbro F, Perlini C, Rambaldelli G, Ferro A, Cerruti S, Tansella M, Brambilla P. Specific linguistic and pragmatic deficits in Italian patients with schizophrenia. *Schizophrenia Res* 102:53-62, 2008
 - Thomas KM, Drevets WC, Dahl RE, Ryan ND, Birmaher B, Eccard CH, Axelson D, Whalen PJ, Casey BJ. Amygdala response to fearful faces in anxious and depressed children. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Nov;58(11):1057-63
 - Tomasino, B., Fink, G.R., Sparing, R., Dafotakis, M., Weiss, P.H., 2008. Action verbs and the primary motor cortex: A comparative TMS study of silent reading, frequency judgments, and motor imagery. *Neuropsychologia* 46, 1915-1926
 - Tomasino, B., Werner, C.J., 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 Suppl 2, T128-T141
 - Wood SJ, Berger GE, Lambert M, Conus P, Velakoulis D, Stuart GW, Desmond P, McGorry PD, Pantelis C. Prediction of functional outcome 18 months after a first psychotic episode: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *Arch Gen Psychiatry*. 2006 Sep;63(9):969-76.

PROMUOVERE LE COMPETENZE GENITORIALI DELLE MAMME ADOLESCENTI, ATTRAVERSO L'INTERVENTO VIPP-SD (VIDEO FEEDBACK INTERVENTION TO PROMOTE POSITIVE PARENTING AND SENSITIVE DISCIPLINE), PER FAVORIRE LO SVILUPPO SOCIO-EMOTIVO DEI LORO BAMBINI

DR.SSA ALESSANDRA FRIGERIO

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

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio di biologia; Laboratorio di Bioingegneria

Salimetrics: Università della Pennsylvania e sede inglese

DESCRIZIONE

Le mamme adolescenti sono esposte, più frequentemente, a diverse situazioni di rischio. Più precisamente, diversi studi evidenziano come la gravidanza in adolescenza sia associata a situazioni di povertà, crescita in famiglie monoparentali, inadeguatezza dei modelli genitoriali, mancanza di opportunità di studio e lavorative (Coley & Chase-Lansdale, 1998; Manlove et al., 2009; Moore & Brooks-Gunn, 2002; Patterson, 1997). Queste mamme soffrono più frequentemente di depressione e hanno un rischio più elevato di abuso di sostanze (Clemmens, 2001, Panzarine et al., 1995; Reid & Meadows-Oliver, 2007; Spieker et al., 2001); inoltre, dispongono più frequentemente di minori risorse, minore supporto sociale e presentano un rischio maggiore di manifestare comportamenti maltrattanti e trascuratezza verso i figli (de Paul & Domenech, 2000; Panzarine et al., 1995; Turner et al., 1990; Whitman et al., 2001; Zuravin & Di Blasio, 1992).

Questi fattori, singolarmente e collettivamente, aumentano il rischio di comportamenti parentali inadeguati: molte mamme adolescenti sperimentano, infatti, livelli più elevati di stress genitoriale e tendono ad essere meno responsive, meno sensibili, più distanti e ad assumere comportamenti intrusivi verso i loro figli (Berlin et al., 2002; Whitman et al., 2001). Di conseguenza,

questi comportamenti aumentano il rischio di compromettere la relazione di attaccamento genitore-bambino. Difatti, i figli di mamme adolescenti hanno un rischio maggiore di formare una relazione di attaccamento insicuro e, pertanto, sperimentarne gli effetti negativi in ambiti diversi come quello cognitivo, adattivo, comportamentale e socio-emozionale.

Di recente, è stato messo a punto un modello di intervento breve, denominato Videofeedback Intervention to Promote Positive Parenting and Sensitive Discipline (VIPP-SD; Juffer et al., 2009), centrato sulla teoria dell'attaccamento, che ha lo scopo di promuovere la sensibilità materna e una disciplina sensibile. L'intervento è centrato sulla osservazione videoregistrata della mamma e del bambino, a casa, in diverse situazioni quotidiane (es. gioco libero, momento del pasto) e sulla discussione dei filmati (videofeedback) insieme alla mamma. Il videofeedback fornisce la possibilità di focalizzare l'attenzione della mamma sui segnali e le espressioni videoregistrate del bambino, stimolando le sue capacità osservative e la sua empatia verso il figlio. Consente inoltre di rinforzare positivamente i comportamenti sensibili della mamma ogniqualvolta sia in grado di percepire in modo accurato i segnali del bambino e di rispondervi prontamente. Viene data, inoltre, importanza alla discussione degli aspetti educativi legati ad una disciplina sensibile, che sappia cioè tenere conto del punto di vista e dei segnali del bambino. L'efficacia di questo intervento è stata sperimentata su diversi campioni di mamme (es. mamme con attaccamento insicuro) e bambini (es. prematuri, adottati, con problemi di condotta) a rischio, ma non è stato ancora condotto nessuno studio su mamme adolescenti.

Il presente progetto di ricerca ha l'obiettivo di verificare l'efficacia del VIPP-SD in un campione di mamme adolescenti, di età inferiore a 20 anni al momento del parto, che hanno un figlio di età compresa tra 1 e 3 anni. Nello specifico, si vuole valutare l'efficacia dell'intervento nel promuovere una maggiore sensibilità materna e favorire, nel bambino, lo sviluppo di una relazione di attaccamento sicuro e una maggiore capacità di regolazione delle emozioni in situazioni di stress. Il campione sarà costituito da 60 mamme adolescenti, in carico ai servizi sociali comunali, suddiviso in un gruppo di 30 mamme a cui verrà proposto il VIPP-SD e da un gruppo di controllo di 30 mamme a cui non verrà proposto il VIPP-SD ma a cui verranno consegnate delle brochures informative sullo sviluppo del bambino e sulla gestione di alcune situazioni problematiche. I partecipanti verranno assegnati secondo una procedura di selezione casuale alle due condizioni sperimentali. A tutte le mamme dei due gruppi verrà richiesto di partecipare 1) ad una sessione pre-intervento in cui verrà valutata la sensibilità materna, attraverso l'osservazione videoregistrata del comportamento in alcuni episodi di interazione mamma-bambino, e richiesta la compilazione di alcuni questionari sullo stress genitoriale, il

temperamento e il comportamento del bambino e 2) ad una sessione post-intervento in cui verranno nuovamente valutate la sensibilità materna e le dimensioni indagate dai questionari, nonché l'attaccamento del bambino attraverso la strange situation (SSP versione per l'infanzia e l'età prescolare) e la risposta psicofisiologica allo stress attraverso la misurazione dei livelli di cortisolo e alpha amylase salivare (prima e dopo la SSP) e di Respiratory Sinus Arrhythmia.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso di quest'anno, dopo avere ottenuto l'approvazione del Comitato Etico del nostro IRCCS e avere individuato i servizi sociali e le comunità di accoglienza madre-bambino della zona interessati a partecipare al progetto, si avvierà la fase operativa dello studio che riguarderà: a) la condivisione del progetto di ricerca e dei passaggi operativi con i referenti dei servizi sociali e delle comunità attraverso appositi incontri; b) l'inizio della raccolta dei dati. Nello specifico, la raccolta dei dati consisterà nelle seguenti tre fasi (meglio specificate nella sezione sul metodo):

1. Fase pre-intervento: a tutte le mamme che hanno fornito il consenso a partecipare allo studio, verrà richiesta la compilazione del Parenting Stress Index, della Child Behavior Checklist, dell' Early Childhood Behavior Questionnaire e di una scheda sui fattori di rischio socio-demografici e familiari; verrà, inoltre, effettuata una sessione di gioco madre-bambino videoregistrata per valutare la sensibilità materna.
2. Fase intervento: le mamme verranno assegnate, secondo una procedura randomizzata, a due condizioni: sperimentale e di controllo. Le mamme del gruppo sperimentale effettueranno l'intervento VIPP-SD presso la Comunità, mentre le mamme del gruppo di controllo saranno contattate per telefono alla stessa cadenza degli incontri previsti dal VIPP-SD per discutere alcuni aspetti legati allo sviluppo del bambino.
3. Fase post-intervento: tutte le mamme dei due gruppi saranno invitate a partecipare a una sessione di valutazione presso il nostro IRCCS. Accanto alla ri-somministrazione degli strumenti impiegati durante la fase pre-intervento, verrà valutato l'attaccamento del bambino attraverso la Strange Situation e la risposta fisiologica allo stress (misurata attraverso il cortisolo salivare, l'alpha amylase salivare e i parametri cardiaci della FC e dell'RSA) a seguito della separazione dalla madre. La valutazione verrà effettuata in un'unica sessione durante una mattinata per limitare i possibili effetti legati alle variazioni diurne del cortisolo e dell'alpha amylase.

Metodo

Campione e procedura

Il campione sarà costituito da mamme adolescenti (età inferiore a 20 anni al momento del parto) e dai loro bambini (età compresa tra 6 mesi e due anni). Nel corso di quest'anno, considerato il tempo necessario per la messa a punto del protocollo, l'approvazione del Comitato Etico, il coinvolgimento dei Servizi Sociali e delle Comunità nel progetto, si ipotizza il reclutamento di una quindicina di coppie mamma-bambino. A tutte le mamme che accetteranno di partecipare allo studio verrà richiesta la compilazione del consenso informato. Subito dopo il pre-test, le mamme verranno assegnate in maniera randomizzata al gruppo di controllo o al gruppo di intervento. Nello specifico, verrà utilizzata una procedura di randomizzazione a blocchi permutati che consente di avere gruppi numericamente bilanciati nel corso dello studio.

Intervento VIPP-SD

L'intervento VIPP-SD (Juffer et al., 2008) ha la durata di 6 incontri, di un'ora e mezza circa ciascuno; ciascun incontro si divide in due momenti: nel primo vengono effettuate delle brevi videoregistrazioni del comportamento del bambino e della madre, mentre nel secondo viene discussa la registrazione effettuata nell'incontro precedente. L'intervento si articola in tre fasi. Nella prima fase, il ricercatore che conduce l'intervento ha l'obiettivo di costruire una relazione con la mamma ponendo l'enfasi sul comportamento del bambino durante il videofeedback, con particolare attenzione all'osservazione dei comportamenti di esplorazione e attaccamento. Nella seconda fase il focus è centrato sul miglioramento delle competenze genitoriali, lavorando sulla sensibilità, la disciplina sensibile e l'empatia. La terza fase consiste in due incontri di rafforzamento delle competenze acquisite in cui vengono ripresi tutte le informazioni e i feedback dati negli incontri precedenti. Al termine dell'intervento, viene consegnata alla mamma una brochure con le tematiche chiave affrontate nei 6 incontri.

L'intervento verrà condotto nelle comunità da due ricercatrici, che hanno già effettuato il corso di formazione sul VIPP-SD, con Femmie Juffer e Estelle Struiss.

Strumenti

Scheda sui fattori di rischio sociodemografici e familiari. Per consentire una raccolta sistematica delle principali variabili di tipo socio-demografico e familiare (es. scolarità della madre, status socio-economico, presenza di un partner, supporto familiare) che possono rappresentare degli ulteriori fattori di rischio (spesso associati alla condizione legata alla giovane età della ma-

dre) verrà richiesto alle madri di compilare un'apposita scheda.

Valutazione della sensibilità materna (prima e dopo l'intervento). La sensibilità materna verrà valutata a partire da una video-registrazione di 10 minuti di gioco libero, utilizzando il Maternal Behavior Q-Set (MBQS; Pederson & Moran, 1995). Nello specifico, verrà utilizzata una versione breve, recentemente validata su un campione di mamme adolescenti (Taralbusy et al., 2009), che consiste in 25 item che il ricercatore valuta seguendo la procedura del q-sorting (Waters & Deane, 1985).

Child Behavior Checklist/ 1 ½ - 5 (prima e dopo l'intervento). La CBCL/1½-5 (Achenbach e Rescorla, 2000) è un questionario compilato dai genitori che permette di valutare un'ampia gamma di problemi comportamentali ed emotivi, di tipo internalizzante ed esternalizzante, in bambini tra 1½ e 5 anni.

The Early Childhood Behavior Questionnaire (prima e dopo l'intervento). L'Early Childhood Behavior Questionnaire (Putnam et al., 2006) è un questionario compilato dal genitore che indaga diverse dimensioni temperamentali dei bambini di età compresa tra i 18 e i 36 mesi. Lo stesso strumento è disponibile anche in una versione per bambini tra i 3 e i 12 mesi (Infant Behavior Questionnaire-Revised) (Gartstein & Rothbart, 2003).

Parenting Stress Index – Short Form (prima e dopo l'intervento). Il Parenting Stress Index (Abidin, 1995) è un questionario compilato dal genitore che si compone di tre sottoscale: Distress genitoriale, Interazione genitore-bambino disfunzionale e Bambino difficile. È inoltre possibile calcolare un punteggio di Risposta difensiva che valuta la tendenza a dare un'immagine più favorevole di sé, minimizzando problemi nella relazione genitore-bambino.

Strange Situation (post-intervento). L'attaccamento del bambino alla madre verrà valutato attraverso la Strange Situation (Ainsworth et al., 1978; Cassidy & Marvin, 1992). Similmente alla versione per l'infanzia della Strange Situation (SS), la versione prescolare consiste di 8 episodi inclusi due brevi separazioni e riunioni con la madre. L'attaccamento nell'infanzia (12-18 mesi) verrà classificato in base al sistema di codifica della Ainsworth per i patterns sicuro, evitante e resistente e in base al sistema della Main per il pattern disorganizzato. Per l'età prescolare (18 mesi-5 anni), verrà utilizzato il sistema di classificazione di Cassidy e Marvin (1992) che individua 5 patterns di attaccamento: sicuro, evitante, ambivalente, controllante/disorganizzato e insicuro-altro.

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 la suzione di un rullo di cotone subito prima, subito dopo, 20 minuti e 40 minuti dalla fine dell'evento stressante (SS). I rulli di cotone, saturati di saliva, verranno messi in una siringa senza ago e la saliva verrà spremuta in una boccetta criogenica. I campioni di saliva saranno conservati in frigorifero a -80° C fino al momento delle analisi che verranno effettuate in base a un kit specifico 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 per tutta la durata della procedura stressante. I movimenti verranno ridotti facendo sedere i bambini dietro ad un tavolo con dei giochi. Ciascun bambino indosserà alcuni (da 3 a 6) elettrodi a contatto sulla pelle. Il sistema per la rilevazione e la lettura dei parametri cardiaci che ci proponiamo di utilizzare è di tipo multimediale per il biofeedback e il monitoraggio fisiologico (ProComp Infiniti; Righetto).

Bibliografia

- Abidin, R.R. (1995). Parenting Stress Index (3rd edn). Odessa, FL: Psychological Assessment Resource.
- Achenbach, T.M., Rescorla, L.A. (2000). Manual for the ASEBA Preschool Forms and Profile. Burlington VT: University of Vermont, Department of Psychiatry
- Ainsworth, M.D.S., Blehar, M.C., Waters, E., & Wall, S. (1978). Patterns of Attachment: A Psychological Study of the Strange Situation. Hillsdale NJ: Erlbaum.
- Berlin, L.J., Brady-Smith, C., Brooks-Gunn, J. (2002). Links between childbearing age and observed maternal behaviors with 14-months-olds in the early head start research and evaluation project. *Infant Mental Health Journal*, 23: 104-129.
- Cassidy J., Marvin R.S. (1992). Attachment organization in preschool children: procedures and coding manual. Unpublished manuscript, University of Virginia.
- Clemmens, D. (2001). The relationship between social support and adolescent mothers' interactions with their infants: a meta-analysis. *Journal of Obstetric, Gynecologic, & Neonatal Nursing*, 30: 410-420.

- Coley, R.L. Chase-Lansdale, P.L. (1998). Adolescent pregnancy and parenthood: Recent evidence and future directions. *American Psychologist*, 53: 152-166.
- de Paul, J., Domenech, L. (2000). Childhood history of abuse and child abuse potential in adolescent mothers: A longitudinal study. *Child Abuse and Neglect*, 24: 701-713.
- Gartstein, M. A., & Rothbart, M. K. (2003). Studying infant temperament via the Revised Infant Behavior Questionnaire. *Infant Behavior and Development*, 26 (1), 64-86.
- Juffer, F., Bakermans-Kranenburg, M.J., van IJzendoorn, M.H. (2008). *Promoting Positive Parenting. An Attachment-Based Intervention*. Mahwah, NJ: Erlbaum.
- Manlove, J., Ikramullah, E. Mincieli L., Holcombe, E., Danish, S. (2009). Trends in sexual experiences, contraceptive use and teenage childbearing 1992-2002. *Journal of Adolescent Health*, 44: 413-423.
- Moore, M.R., Brooks-Gunn, J. (2002). Adolescent parenthood. In E. In M. Bornstein (Ed)., *Handbook of parenting* (2nd ed. Vol 4, pp173-214). Mahwah, NJ: Erlbaum.
- Panzarine, S., Slater, E., Sharps, P. (1995). Coping, Social support, and depressive symptoms in adolescent mothers. *Journal of Adolescent Health*, 17: 113-119.
- Patterson, D. (1997). Adolescent mothering: Child-grandmother attachment. *Journal of Pediatric Nursing*, 12, 228-237.
- Pederson, D. R., & Moran, G. (1995). A categorical description of attachment relationships in the home and its relation to q-sort measures of infant-mother interaction. In E.Waters, B. Vaughn, G. Posada, K. Kondo-Ikemura (Eds.), *Caregiving, cultural and cognitive perspectives on secure-base behavior and working models: New growing points of attachment theory and research* (pp. 247–254). *Monographs of the Society for Research in Child Development*, 60.
- Putnam, S. P., Gartstein, M. A., & Rothbart, M. K. (2006). Measurement of fine-grained aspects of toddler temperament: The Early Childhood Behavior Questionnaire. *Infant Behavior and Development*, 29: 386-401.
- Reid, V., Meadows-Oliver, M. (2007). Postpartum depression in adolescent mothers: An integrative literature review. *Journal of Pediatric Health Care*, 21: 289-298.
- Spieker, S.J., Gillmore, M.R., Lewis, S.M., Morrison, D.M., Lohr, M.J. (2001). Psychological distress and substance use by adolescent mothers:

- Associations with parenting attitudes and the quality of mother-child interaction. *Journal of Psychoactive Drugs*, 33: 83-93.
- Tarabulsky, G.M., Provost, M.A., Bordeleau, S., Trudel-Fitzgerald, C., Moran, G., Pederson, D.R., Trabelsi, M., Lemelin, J.P., Pierce, T. (2009). Validation of a short version of the maternal behavior Q-set applied to a brief video record of mother-infant interaction. *Infant Behavior & Development*, 32: 132-136.
 - Turner, R.J., Grindstaff, C.F., Phillips, N. (1990). Social support and outcome in teenage pregnancy. *Journal of Health and Social Behavior*, 31: 43-57.
 - Waters, E., & Deane, K. (1985). Defining and assessing individual differences in attachment relationships: Q-methodology and the organization of behavior in infancy and early childhood. In I. Bretherton, & E. Waters (Eds.), *Growing points of attachment theory and research* (pp. 41–65). *Monographs of the Society for Research in Child Development*, 50 (Serial No. 209).
 - Whitman, T.L., Borkowski, J.G., Keogh, D.A., Weed, K. (2001). *Interwoven lives: Adolescent mothers and their children*. Mahwah, N.J: Lawrence Erlbaum.
 - Zuravin, S.J., Di Blasio, F.A. (1992). Child-neglecting adolescent mothers: How do they differ from their non-maltreating counterparts? *Journal of Interpersonal Violence*, 7:471-489.

CORRELATI PSICOFISIOLOGICI, COGNITIVI E COMPORTAMENTALI DELLA DISREGOLAZIONE EMOTIVA: ASSESSMENT [FASE I] E INTERVENTO [FASE II] IN BAMBINI E ADOLESCENTI

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

2012

Polo scientifico

Ostuni

DESCRIZIONE

Premessa

La "regolazione emotiva" è da intendersi come un "tentativo, consapevole o inconsapevole, che un individuo mette in atto per influenzare quale emozione provare, come esperirla o esprimerla" (Mauss, Bunge & Gross, 2007) piuttosto che "[...] serie di processi estrinseci o intrinseci responsabili del monitoraggio, della valutazione e della modificazione delle reazioni emozionali" (Thompson, 1994). Diversi studi (McLaughlin KA, 2011, Southam-Gerow MA, 2002) attribuiscono ad una difficoltosa capacità di regolazione emotiva l'insorgere di manifestazioni comportamentali disfunzionali di natura prevalentemente esternalizzata. Stile di attaccamento, vulnerabilità biologica, variabili temperamentali ed ambientali sono poste, con enfasi diversa, all'origine delle difficoltà di regolazione emotiva (Schuengel C. et al., 2009 Beauchain P.T. et al., 2007).

Obiettivo

La presente ricerca intende investigare, utilizzando l'assessment psicofisiologico (Palomba, 1999), le componenti soggettive, fisiologiche e comportamentali della risposta emozionale in situazioni competitive e collaborative, in soggetti con diagnosi riferibile alla difficoltà di regolazione emotiva.

Si intende altresì strutturare percorsi di intervento che utilizzino, come punto di partenza, i tre livelli:

1. soggettivo: intervento metacognitivo;
2. fisiologico: utilizzo del biofeedback;
3. comportamentale: utilizzo di procedure psicoeducazionali e di verificarne

l'efficacia specifica nell'incentivo delle abilità di regolazione emotiva.

ATTIVITÀ PREVISTE

METODOLOGIA

Campione:

90 soggetti, maschi e femmine, di età compresa tra i 6 e i 13 anni (età scolare) divisi in 3 gruppi:

- a) 30 soggetti con sintomi di disregolazione [adhd, impulsività, doc, dop] [ulteriore suddivisione: con storia di adozione vs storia naturale]
- b) 30 con soli sintomi internalizzati [ansia, depressione]
- c) 30 senza sintomi di alcun genere [controllo]

Fase 1: assessment

a. livello soggettivo: autovalutazione dello stato emozionale prima durante e dopo la prova. A questo livello attraverso questionari specifici verranno valutati anche i pattern cognitivi riferiti alla capacità di coping e di autoregolazione.

b. livello fisiologico: rilevazione attività cardiaca [aritmia sinusale respiratoria], muscolare e della conduttanza cutanea in situazioni baseline - test - recupero;

c. livello comportamentale: osservazione strutturata tramite Observer dei comportamenti emessi durante le prove e a-priori classificati [tipo CBCL Test Observation];

La valutazione dei 3 livelli [soggettivo, comportamentale, fisiologico] viene effettuata in due situazioni stimolo:

- a. prova competitiva
- b. prova collaborativa

Nelle specifiche delle prove si intendono utilizzare giochi interattivi tipo Wii.

Fase 2: trattamento

strutturazione di tre percorsi di intervento:

- a. cognitivo, basato sull'utilizzo di strategie metacognitive e metaemozionali;
- b. psicofisiologico, basato sul solo utilizzo del biofeedback;
- c. psicoeducativo, basato sulla manipolazione dei fattori contingenti (antecedenti, conseguenti).

Fase 3: follow-up

Rivalutazione come nella fase 1.

RISULTATI ATTESI

1. Individuazione di pattern cognitivi, fisiologici, comportamentali specifici nella disregolazione emotiva.
2. Valutazione degli effetti dell'intervento sui singoli livelli (soggettivo, fisiologico e comportamentale).

INDIVIDUAZIONE DELLO STILE COMUNICATIVO MATERNO NELL'INTERAZIONE CON BAMBINI CON DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO

DR.SSA ANNA LERNA

E-MAIL: ANNA.LERNA@OS.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2012

Polo scientifico

Ostuni

DESCRIZIONE

I risultati di alcune ricerche riportano che i comportamenti dei genitori di bambini con DSA, rispetto a quelli dei genitori di bambini con sviluppo tipico e ritardo dello sviluppo, mostrano delle caratteristiche di maggiore direttività e controllo (Kasari, Sigman, Mundy, & Yirmiya, 1988; Watson, 1989) quando interagiscono con i propri figli autistici. Partendo da questi risultati è comprensibile, dunque, che i deficit socio-comunicativi dei bambini con DSA influenzino le modalità comportamentali di interazione. Lo scopo della nostra ricerca, dunque, è effettuare un'indagine osservazionale ad ampio spettro per delineare le modalità comunicative caratteristiche delle madri nell'interazione con bambini con Disturbo dello Spettro Autistico, in relazione alle cinque funzioni comunicative (Tutoria, Didattica, di Conversazione, di Controllo e Asincronica) (Longobardi E., 1992) ed effettuare un confronto con lo stile comunicativo delle madri di bambini con ritardo dello sviluppo linguistico.

ATTIVITÀ PREVISTE

Si ipotizza di arruolare un campione comprensivo di 50 soggetti composto da 25 coppie madre-bambino con DSA (gruppo clinico) da confrontare con 25 coppie madre-bambino con diagnosi di Ritardo Semplice del Linguaggio. Lo studio prevede la somministrazione al bambino di un protocollo valutativo che sarà costituito dai seguenti strumenti: ADOS, Vineland, Griffiths, SCQ, Mac Arthur, CBCL 1/5 – 5 anni. Alla madre, invece, verranno somministrati: il test Minnesota Multiphasic Personality Inventory -2 (MMPI 2) per valutare le caratteristiche di personalità, il Reaction to Diagnosis Interview (Pianta & Marvin, 1992) ed il Parent Stress Index (Abidin, 1995).

Inoltre verrà osservata ed analizzata l'interazione della diade madre bambino sessioni videoregistrate di gioco libero. Le variabili osservate verranno codificate attraverso l'uso dell'Observer Video Pro (versione XT.7) (Noldus, 2007). Risultati attesi. Ci aspettiamo una differenza significativa negli stili comunicativi tra i gruppi con una prevalenza della funzione di Controllo ed Asincronica nelle madri di bambini con DSA. La frequenza delle due funzioni: controllo ed asincrona potrebbe, dunque, risultare più alta nel gruppo clinico includendo comportamenti materni che compromettono in modo rilevante il corso dell'interazione. L'individuazione di eventuali carenze dell'ambiente linguistico a cui il bambino è esposto, potrebbe risultare di notevole utilità nella pianificazione di interventi riabilitativi: questi dovrebbero, infatti, tener conto anche degli aspetti relazionali dell'interazione del bambino con la madre ed, eventualmente, con entrambi i genitori, che sarebbero di sostegno alla terapia riabilitativa soprattutto attraverso una maggiore consapevolezza delle diverse funzioni comunicative che utilizzano spontaneamente nell'interazione con il proprio bambino.

IL CONTATTO OCULARE NELL'AUTISMO DURANTE LE INTERAZIONI SOCIALI

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

2012

Polo scientifico

Bosisio Parini

DESCRIZIONE

L'autismo è principalmente definito da una scarsa interazione sociale reciproca e dall'incapacità di comunicare idee e sentimenti e di entrare in relazione con l'altro (Baird et al., 2003; Berney, 2000; Szatmari, 2003). Una delle più evidenti manifestazioni di tale difficoltà di interazione sociale è rappresentata dalla mancanza di contatto oculare con l'interlocutore.

Il contatto di sguardo rappresenta infatti "la piattaforma più importante per l'interazione sociale" (cit. Csibra e Gergely, 2006), essendo la prima informazione disponibile nel processo di comprensione delle intenzioni e stati mentali altrui (Baron-Cohen et al., 1997).

Inoltre, osservando la direzione di sguardo delle altre persone è possibile condividere l'attenzione verso uno stesso stimolo. Infatti i bambini con autismo mostrano anche scarsa attenzione congiunta (Senju et al., 2008; Senju e Csibra, 2008; v. Itier e Batty, 2009 per una review).

Diverse anomalie nel contatto oculare sono state ampiamente riportate in questi pazienti, che mostrano uno specifico pattern di sguardo, in cui, a differenza delle persone a sviluppo tipico, viene prestata maggior attenzione all'area della bocca a scapito degli occhi. Anzi, l'abilità di contatto oculare è stata considerata "la variabile predittiva più importante per l'autismo" (Jones et al., 2008) soprattutto quando viene misurato attraverso eye tracking, per cui la registrazione del contatto oculare potrebbe rappresentare "una misurazione quantitativa affidabile delle difficoltà sociali" (Klin et al., 2002).

Tale effetto, che emerge già a partire dal primo anno di vita (Baranek, 99; Clifford et al., 2007; Maestro et al., 2005; Österling e Dawson, 1994; Österling et al., 2002, Jones et al., 2008), si verifica sia che il volto osservato abbia lo sguardo verso l'osservatore (Pelphrey et al., 2002; Dalton et al., 2005; Klin

et al., 2002; Borason et al., 2008), sia che esso sia rivolto altrove (Klin et al., 2002; Riby e Hancock 2008, 2009) e la durata del contatto di sguardo è in stretta relazione con il livello di ansia provata di fronte a stimoli sociali (Corden et al., 2008).

A fronte di normali capacità oculo-motorie (Minshew et al., 1999; Nowinski et al., 2005; Goldberg et al., 2000; Crippa et al., submitted), si è ipotizzato che alla base di questo pattern attenzionale possa essere o una scelta strategica di evitare lo sguardo dell'interlocutore come potenziale fonte di stress, oppure un'incapacità intrinseca di distogliere l'attenzione da uno stimolo fortemente attraente quale la bocca in movimento (es. Neumann et al., 2006; Pelphrey et al., 2002; Klin et al., 2002); secondo l'ipotesi entrambe le componenti sarebbero coinvolte (Spezio et al. 2007).

Tuttavia, tutti presenti in letteratura hanno misurato il contatto oculare nell'autismo con stimoli poco naturalistici: fotografie di volti o filmati, comunque mostrati su un monitor.

Poiché questi stimoli non sono attendibili indicatori dell'attenzione prestata al volto di un reale interlocutore (Spezio et al., 2007), emerge la reale necessità di convalidare il noto pattern attentivo anche in situazioni ecologicamente più valide, come l'interazione faccia a faccia con un interlocutore.

Essendo oggi a disposizione nuove tecnologie, sta infatti nascendo l'interesse per l'analisi del comportamento in situazioni reali, anziché realistiche (v. Suda et al., 2011 per un'analisi NIRS durante la conversazione faccia a faccia).

Ci poniamo dunque l'obiettivo di investigare se il pattern attenzionale mostrato da pazienti autistici sui volti presentati a schermo viene convalidato anche in reali situazioni sociali. Perciò proponiamo il primo studio in cui la quantificazione del contatto oculare tramite eye tracking (dunque la misurazione delle abilità sociali) viene effettuata nella reale interazione del bambino con un interlocutore, tramite un setting "faccia a faccia", reso possibile dall'utilizzo di un eye tracker in remoto TOBII X50.

L'unico studio pubblicato (a nostra conoscenza) in cui il contatto oculare sia stato misurato in una reale situazione sociale riguarda il paziente (S.M.) con lesione focale bilaterale dell'amigdala (Spezio et al., 2007). Come i bambini affetti da autismo, S.M. prestava maggior attenzione all'area circostante la bocca dell'interlocutore, ma non manifestava l'evitamento attivo dello sguardo, a differenza dei bambini con autismo. Tuttavia questo pattern attenzionale era significativamente più evidente quando il contatto oculare veniva misurato durante una reale interazione sociale, piuttosto che nella visione di fotografie.

ATTIVITÀ PREVISTE

Campione

10 Bambini con autismo infantile senza ritardo mentale
10 Bambini a sviluppo tipico di pari età e genere

Metodo

Si richiede al bambino di sedere a un tavolo a 60 cm dall'eye tracker in remoto TOBII X50, posto sotto un monitor, e di osservare passivamente gli stimoli presentati. La presentazione degli stimoli è preceduta da un periodo di "acclimatazione" in cui il bambino può guardare qualche minuto di un cartone animato, seguito dalla procedura di calibrazione a 5 punti animati.

a) Faccia a faccia: un interlocutore del tutto sconosciuto al bambino viene fatto sedere dall'altra parte del tavolo. Viene chiesto di recitare 5 brevi storie (durata 30-40 secondi l'una) con un tono e un'espressione neutrale diretta al bambino (come in Spezio et al., 2007).

b) Fotografie di volti presentate a monitor. Le fotografie provengono da un database di ragazzi tra i 20 e i 24 anni e possono rappresentare figure a colori di volti orientati in 5 differenti posizioni, passando dallo sguardo diretto all'osservatore, allo sguardo di $\frac{3}{4}$, al profilo. (Il database è stato precedentemente da me raccolto negli anni passati e validato con precedenti ricerche). Le fotografie verranno presentate per circa 3 secondi, in blocchi di 12 per coerenza con gli altri studi pubblicati.

c) Filmati di volti presentati a monitor. I filmati riprodurranno lo stesso interlocutore della situazione faccia-a-faccia mentre recita storie o simili a quelle presentate nella condizione a)

Variabili: Numero di Fissazioni, Durata delle fissazioni, Percentuale delle fissazioni sull'area della bocca e sull'area degli occhi.

Analisi dei picchi sonori dell'interlocutore su file MIDI.

N.B.: Per assicurarsi che non intervengano variabili "emotive": a) l'attore esercita un tono neutrale e sempre uguale a se stesso (possibilmente limitando in un tempo ristretto la fase di raccolta dati) mentre legge una storia su un cartello posto dietro le spalle del bambino; b) viene anche effettuata un'analisi MIDI delle frequenze sonore prodotte durante l'interazione e posta in correlazione con i movimenti oculari.

Co-indicatori di valutazione

Scale WWPSI, Test di Percezione Visiva, CBCL.

RISULTATI ATTESI

Essendo questo il primissimo studio sul contatto oculare in una situazione di

interazione reale, non abbiamo ipotesi fortemente unidirezionali.

Precedenti ricerche in cui sono stati presentati filmati e situazioni complesse hanno finora riportato pattern più evidenti di un'iper-attenzione alla bocca e a scapito dell'area degli occhi in pazienti con autismo. È possibile che l'interazione reale porti a risultati simili.

Resta comunque aperta la possibilità che in una situazione meno astratta i bambini con autismo si comportino diversamente che per stimoli astratti (vedi Ricerca Corrente 2011) e che il pattern tipico non venga registrato. Qualora ciò si verificasse potremmo pensare che, poiché il rapporto concreto-astratto dei bambini con autismo non è simile a quello della popolazione sana, la misurazione del contatto oculare su schermo rappresenta una modalità non adatta e poco attendibile per questa popolazione clinica.

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 Strumentale

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio di citogenetica; Servizio di Neurofisiopatologia

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.

Questa ricerca è in linea e completa la ricerca del Dr. Zucca dedicata allo studio di alcune epilessie criptogeniche con particolare riguardo agli aspetti neurofisiopatologici e genetici.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso della ricerca sono stati effettuati 63 esami su pazienti con epilessia. 24 esami sono negativi. Sono trovate 5 del de novo e 17 del/dup ereditate; per 17 del/dup è in corso di definizione l'ereditarietà. È in corso l'analisi genotipo/fenotipo e 2 pubblicazioni sono in preparazione per la presentazione a riviste internazionali.

ATTIVITÀ PREVISTE

Risultati finali attesi per il biennio 2012-2013:

- Individuazione di cause genetiche di Epilessie considerate criptogeniche associate o meno a compromissioni neuro-psichiche.
- Individuazione di nuovi hotspots per la scoperta di geni dell'epilessia.
- Precisazione delle caratteristiche non solo cliniche ma anche neurofisiopatologiche che possono essere indicative di questo tipo di eziologia dell'epilessia.
- Integrazione dei dati clinici, neurofisiologici, genetici, e neuroradiologici consentendo una più precisa correlazione tra genotipo e fenotipo.

Attività previste:

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

DEFINIZIONI DELLE OSCILLAZIONI AD ALTA FREQUENZA (HFO) NEI DISORDINI DELLO SVILUPPO: UNO STUDIO PRELIMINARE

DR. SERGIO ZANINI

E-MAIL: SERGIO.ZANINI@UD.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Strumentale

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

San Vito al Tagliamento e Pasiàn di Prato

Collaborazioni

Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma: Dipartimento di Neuroscienze
Azienda per i Servizi Sanitari n. 4 "Medio Friuli" di Udine: Servizio di Neuropsichiatria Infantile
Università di Udine: Dipartimento di Filosofia

DESCRIZIONE

Gli studi sperimentali evidenziano in maniera sempre più eclatante che le strutture talamiche e corticali primarie svolgono, nel processamento della informazione somatosensoriale, un ruolo non semplicemente limitato al veicolamento passivo della informazione medesima (fenomeno esplorabile con i potenziali somatosensoriali standard), ma piuttosto dedicato ad un sofisticato filtraggio e modulazione del segnale. A questo livello, la modulazione del rapporto tra segnale e rumore di fondo è affidato a specifiche modalità di trasmissione, inerenti caratteristiche elettrofisiologiche elementari del singolo neurone ("burst mode"; vedi Calvin WH, Generation of spike trains in CNS neurons. Brain Res 1975; 24; 84:1-22). Recentemente, numerosi studi sulle oscillazioni ad alta frequenza (HFO), intrinseche alla traccia del potenziale evocato somatosensoriale standard, hanno suggerito la possibilità di esplorare direttamente la modulazione effettuata dal talamo e dalla corteccia somatosensoriale primaria sul rapporto segnale-rumore, a sua volta influenzato dalla attenzione e dallo stato di veglia attiva. Particolarmente interessante risulta, inoltre, la possibilità di differenziare la sede precisa, talamica o corticale, di tale processo, in base a caratteristiche morfologiche precise della risposta evocata. Ove si consideri il gran numero di quadri clinici di

ambito neuropsichiatrico infantile all'interno dei quali è ipotizzato un disturbo percettivo inerente soprattutto la selezione e la modulazione degli stimoli, si comprende perché tale metodica appaia estremamente promettente nell'ottica di una migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici sottostanti i quadri clinici. Si segnalano a tale riguardo due quadri clinici nei quali tali metodologie sono state applicate: l'emicrania e la schizofrenia, nelle quali è stato postulato un disturbo della attivazione sottocorticale che la analisi delle HFO è in grado di quantificare. Ad ogni modo, tutti gli studi presenti in letteratura, inerenti il comportamento delle HFO in condizioni di patologia neurologica o psichiatrica, sono stati effettuati su adulti e non su bambini. Obiettivo di questo progetto di ricerca è applicare, mediante la somministrazione di potenziali evocati somatosensoriali standard, lo studio delle HFO in quadri neurologici e psichiatrici nei quali è stato ipotizzata, all'interno della loro fisiopatologia, la presenza di disordini dell'elaborazione delle informazioni sensoriali in ingresso nella corteccia cerebrale. I quadri clinici identificati come inizialmente esplorabili sono i Disturbi della Coordinazione Motoria, le Paralisi Cerebrali Infantili, i Disturbi dello Spettro Autistico, le Psicosi e Prepsicosi del bambino/adolescente.

ATTIVITÀ PREVISTE

Criteri di inclusione

Verranno inclusi nel progetto di ricerca bambini affetti da condizioni cliniche note quali il Disturbo della Coordinazione Motoria, le Paralisi Cerebrali Infantili, indicativamente nella forma diplegica, i Disturbi dello Spettro Autistico, e le Psicosi o Prepsicosi del bambino/adolescente. Per essere inclusi nel progetto di ricerca dovrà essere stato firmato il modulo di Consenso Informato.

Criteri di esclusione

Verranno esclusi dal progetto di ricerca o pazienti che, anche a fronte della diagnosi di inclusione, presentino collaborazione eccessivamente inadeguata per l'esecuzione degli esami, o comorbidità tali da inficiare l'utilizzo dello specifico paziente come modello di studio affidabile. Verranno altresì esclusi i soggetti che non firmeranno il Consenso Informato alla partecipazione al progetto di ricerca.

Reclutamento dei pazienti

I pazienti proverranno dal Servizio Unità per le Disabilità Gravi in Età Evolutiva

dell'IRCCS Medea di Udine, dalla rete regionale dei Presidi di Riabilitazione de La Nostra Famiglia - di San Vito al Tagliamento (PN) e di Pasion di Prato (UD) – e dal Servizio di Neuropsichiatria dell'Infanzia e Adolescenza dell'Azienda per i Servizi Sanitari n. 4 "Medio Friuli".

Numerosità delle campionature

Al termine dello studio, sarà necessario avere cinque gruppi di soggetti. Il primo gruppo sarà costituito da circa 30-35 soggetti sani (tale gruppo andrà ampliato rispetto al gruppo normativo già attualmente disponibile e che consta di circa 20 soggetti). I quattro gruppi clinici, ovvero di soggetti affetti dalle patologie di cui ai criteri di inclusione, dovranno essere composti anch'essi da 30-35 soggetti in modo da garantire la riproducibilità del dato neurofisiologico, che essendo estremamente sensibile, necessita di numerosità campionarie ampie.

Esami sperimentali neurofisiologici

Non si precisa nulla in questa sede circa le tipologie di esami clinici volti alla formulazione delle diagnosi per l'inclusione dei pazienti, in quanto rientrano nelle usuali procedure e pratiche cliniche. Verranno garantiti gli standard diagnostici attuali massimamente riconosciuti come autorevoli. I soggetti sperimentali, sani e affetti dalle patologie di cui sopra, verranno studiati in una unica occasione mediante registrazione dei potenziali evocati somatosensoriali, dall'arto superiore o dall'altra inferiore. La registrazione del dato neurofisiologico verrà acquisita mediante sistema VIASYS e successivamente elaborata dal sistema AUTO-SIGNAL che permette il filtraggio digitale del segnale e, quindi, l'analisi delle HFO. La durata dell'esame neurofisiologico è di circa 45 minuti complessivi.

Elaborazione statistica

I dati di registrazione acquisiti verranno elaborati con statistiche parametriche in analisi di gruppo. Verranno confrontate le aree sotto la curva (ampiezza) del segnale sia precorticale (HFO che precedono il picco della risposta corticale – N20 nel potenziale evocato somatosensoriale dall'arto superiore), immediatamente successivo all'ingresso in corteccia cerebrale (HFO che sono immediatamente successive al picco della risposta corticale).

SINDROMI EPILETTICHE GENETICAMENTE DETERMINATE ASSOCIATE A COMPROMISSIONE NEUROLOGICA: ASPETTI CLINICI, NEUROFISIOPATOLOGICI, GENETICI E NEURORADIOLOGICI

DR. CLAUDIO ZUCCA

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

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Strumentale

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: U.O. di Neurofisiopatologia; U.O. Neuroriabilitazione 1; Laboratorio di Biologia Molecolare; Laboratorio di Citogenetica; CeSNE - Centro Studi di Neuroimaging dell'Età Evolutiva Bosisio Parini

IRCCS E. Medea: Polo Scientifico di Conegliano Veneto: U.O. Neurofisiopatologia

DESCRIZIONE

La Ricerca Corrente 2011 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. Sono stati studiati casi di E ad eziologia indeterminata associati più spesso a compromissione neurologica ed insufficienza mentale (IM). Nella nostra casistica infatti, costituita per il 62% circa da pazienti di età inferiore ai 18 anni, l'IM è associata all'E nel 42% dei casi e l'eziologia del quadro resta sconosciuta nel 40% dei casi.

Fino a pochi anni fa le E ad eziologia genetica venivano considerate per definizione idiopatiche, con decorso in genere benigno; le crisi di tipo epilettico dovevano essere l'unico disturbo neurologico del quadro clinico ed il dato neuroradiologico doveva essere sempre nella norma. I dati emersi in questi ultimi anni dalla correlazione genotipo-fenotipo di pazienti "criptogenici" hanno dimostrato invece che un significativo numero di forme di E geneticamente determinate è caratterizzato da compromissioni neurologiche anche severe, con decorso progressivo e positività del dato neuroradiologico.

Nel corso del 2011, oltre all'analisi molecolare per l'individuazione di mu-

tazioni in geni che codificano per canali ionici e per altre proteine implicate nell'epilettogenesi (es. ATP1A2, CHRNA2, LGI1) sono state ricercate cause genetiche anche mediante Array-CGH (A-CGH).

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso della Ricerca Corrente 2011 sono stati effettuati prelievi per indagini genetiche su 40 pazienti, 37 dei quali con indagini neuradiologiche non significative e 3 con malformazioni dello sviluppo corticale (MSC) di sospetta natura genetica, e 8 genitori (di 4 pazienti). Nella maggior parte dei casi (30 pazienti e 8 genitori di 4 pazienti) è stata effettuata indagine mediante array-CGH.

Nei pazienti sottoposti ad analisi mediante a-CGH i risultati sono stati i seguenti:

- 2 positivi de novo (per delezione a livello di 1q44) anche se con associata una anomalia ereditata (dalla madre in entrambi i casi).
- 4 positivi per alterazioni non dimostrate de novo: in 1 caso ereditata dalla madre; in 2 casi non è disponibile l'esito dei genitori, in 1 caso è in corso l'analisi sui genitori.
- 22 negativi (inclusi i 3 pazienti con MSC)
- 2 in corso
- I test bio-molecolari per mutazione di SCN1A sono risultati positivi in 3 casi per polimorfismi silenti o per varianti rare senza sicuro significato patologico, mentre 1 caso è risultato negativo e 2 sono in corso.

Per tutti questi pazienti sono stati analizzati i dati clinici, neurofisiologici ed, in alcuni casi, neuroradiologici correlandoli con i risultati dei test genetici.

I dati ricavati sono stati oggetto di diverse pubblicazioni su riviste indicizzate e sono stati presentati a Convegni nazionali ed internazionali in ambito epilettologico e clinico-neurofisiologico.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel 2012 lo studio si propone una prosecuzione ed un approfondimento delle RC su queste forme di E aggiungendo ai dati clinici, neurofisiopatologici di cito-genetica e di genetica molecolare anche quelli neuro-radiologici forniti dalle tecniche di risonanza magnetica avanzate.

Verranno esaminati pazienti affetti da E criptogeniche in cui gli aspetti clinici ed i dati neurofisiologici suggeriranno una possibile eziologia geneticamente determinata. In questi soggetti si cercherà di precisare l'eziologia attraverso metodiche di citogenetica (A-CGH) o di genetica molecolare (studio delle

mutazioni di geni coinvolti in forme di epilessie criptogeniche) (1). Si cercherà poi, in collaborazione con il C.S.N.E.E. di analizzare gli aspetti neuropatologici in vivo mediante le tecniche di neuro-imaging più idonee (2).

RISULTATI ATTESI

1. Individuazione di cause genetiche di E considerate criptogeniche associate o meno a compromissioni neuro-psichiche.
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. Integrare i dati clinici, neurofisiologici, genetici, e neuroradiologici consentendo una più precisa correlazione tra genotipo e fenotipo.
5. Dati di anatomia patologica di queste forme di E studiati tramite neuro-radiologia.

STUDIO CLINICO-NEUROFISIOLOGICO DEI FENOMENI EPILETTICI NEL SONNO IN SOGGETTI CON DISABILITÀ DELLO SVILUPPO

DR. ANTONIO TRABACCA

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

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Strumentale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2012

Polo scientifico

Ostuni

DESCRIZIONE

Epilessia e sonno sono correlati, da molti considerati “compagni di letto”. Il sonno influenza le crisi e le scariche epilettiformi, così come l’epilessia e suoi trattamenti incidono sul sonno e la sua strutturazione. Comprendere le relazioni tra epilessia e sonno è importante per ottimizzare la gestione dell’epilessia nei diversi aspetti della vita di un soggetto in età evolutiva soprattutto se affetto da una disabilità dello sviluppo. Studi che hanno valutato la relazione tra sonno ed epilessia in pazienti in età evolutiva sono scarsi, sebbene durante l’infanzia, sia l’incidenza di epilessia che quella di disturbi del sonno è elevata e in questa fascia d’età è frequente che si abbia un’alta incidenza di associazione tra le due comorbidità. I disturbi del sonno in particolare i disturbi dell’arousal (parasonnie non REM), sono comuni nell’infanzia e appaiono più frequentemente in soggetti con malattie neurologiche croniche quali epilessia. Diversi fenomeni del sonno si possono verificare durante la notte con varie modalità a volte simulando crisi epilettiche. La classica caratterizzazione clinica degli episodi parossistici in sonno, basata sulla loro complessità, non sempre permette una sicura possibilità di distinguere le crisi di origine epilettica da quelle di origine non-epilettica. Sebbene la maggior parte delle crisi abbia il potenziale per verificarsi durante il sonno o la veglia, il sonno ha una ben documentata e forte associazione con sindromi epilettiche specifiche. L’epilessia di per sé e/o le convulsioni sostengono i disturbi del sonno e incidono significativamente sulla qualità, la quantità, e l’architettura del sonno. Ci sono molte cause di disturbi del sonno nei pazienti con epilessia, inclusa un’igiene del sonno inadeguata, la coesistenza di disturbi del sonno e disturbi del ritmo circadiano. Sappiamo che le convulsioni possono disturbare il sonno anche quando si verificano durante la veglia; i farmaci

antiepilettici possono alterare il sonno, in modo positivo e negativo, e questi effetti sono indipendenti dall'azione anticonvulsivante. Inoltre il risultato finale di disturbi del sonno è un'eccessiva sonnolenza diurna, il peggioramento delle crisi epilettiche, un inadeguato funzionamento diurno e la cattiva qualità della vita. È noto che sin dalla nascita i complessi processi di maturazione corticale sono strettamente connessi alla regolamentazione dei cicli sonno-veglia. La strutturazione del sonno nel contesto della crisi epilettiche neonatali è spesso anormale, e queste alterazioni possono essere il risultato del maladattamento plastico delle reti neuronali. Inoltre, in questa situazione una alterazione della connettività neuronale potrebbe anche essere associata ad altre espressioni di disfunzione neurologica, come disturbi cognitivi e comportamentali. Anomalie dell'attività di fondo all'EEG e una maggiore frequenza di anomalie parossistiche sono spesso associate con un'alterazione dell'organizzazione del sonno. L'outcome a distanza in neonati con crisi in cui l'organizzazione del sonno è indifferenziata appare più sfavorevole. Recenti ricerche sulla relazione tra sonno ed epilessia e l'effetto sul funzionamento cognitivo nei bambini ha dimostrato che diversi fattori potrebbero spiegare la riduzione del livello di apprendimento nei bambini con epilessia (eziologia, scariche parossistiche all'EEG, e persistenza e distribuzione circadiana delle crisi epilettiche). Le scariche sull'EEG possono influenzare l'apprendimento ed il sonno, anche in assenza di crisi cliniche o subcliniche. La privazione del sonno e/o disturbi del sonno influenzano i meccanismi neurochimici e neurofisiologici importanti per il processo di apprendimento-memoria, ma influenzano anche l'espressione delle scariche parossistiche sull'EEG e delle crisi epilettiche. Apprendimento e consolidamento della memoria possono avvenire durante lunghi periodi, e il sonno ha dimostrato di svolgere un ruolo fondamentale in questi processi attraverso rimodellamento neuroplastico delle reti neurali. Epilessia e parossismi EEG possono influenzare la struttura del sonno ed interferisce con tali funzioni fisiologiche. Il miglioramento della prognosi a lungo termine cognitivo-comportamentale dei bambini con epilessia richiede sia la buona qualità del sonno che il buon controllo delle crisi, tanto più in soggetti con disabilità. L'antiepilettico di scelta dovrebbe essere quello che interferisce meno con la struttura del sonno e ha il miglior effetto sulla architettura del sonno - quindi normalizzare l'instabilità del sonno, soprattutto durante il sonno NREM. Il nostro studio si propone di valutare a livello clinico e neurofisiologico una popolazione di soggetti affetti da disabilità dello sviluppo allo scopo di caratterizzare fenomeni epilettici ed eventuali altri fenomeni clinici anche di natura non epilettica che si verificano durante il sonno e di valutare l'organizzazione del sonno notturno attraverso un monitoraggio polisonnografico.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Sono stati arruolati nello studio ad oggi un totale di 9 bambini affetti da disabilità dello sviluppo, con associata o meno epilessia e disturbi del sonno (6 maschi di età compresa tra 4 e 12 anni, età media 7anni, DS: 3 anni ; e 3 femmine di età compresa tra 3anni e 15 anni, età media 9anni, DS: 5 anni). Al momento dell'esecuzione del monitoraggio EEG prolungato (comprensivo di polisonnografia), tutti i pazienti tranne due avevano già effettuato almeno un'indagine neuroradiologica dell'encefalo. L'etiologia della disabilità in due pazienti è risultata secondaria a paralisi cerebrale infantile, in una lesionale post encefalite virale, due pazienti presentano sindrome dismorfofenetica, e nei restanti quattro casi secondaria all'epilessia. Sette pazienti presentano epilessia, in due è generalizzata nei restanti parziale con o senza generalizzazione secondaria. Per quanto riguarda il livello cognitivo tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione con test standardizzati (WISC III, Leither, Griffiths) e la scelta del test è stata dettata dall'età dei soggetti e dal loro grado di compromissione a livello motorio o di linguaggio. Dei bambini analizzati cinque sono risultati gravemente deficitari, uno con deficit lieve, uno borderline, e tre con quoziente nella norma. I pazienti sono stati sottoposti a monitoraggio video-elettroencefalografico in veglia e in sonno, al fine di caratterizzare i fenomeni epilettici ed eventuali altri fenomeni clinici anche di natura non epilettica.

Criteri di inclusione:

- soggetti in età evolutiva con disabilità, epilettici e non, ricoverati c/o l'UOC di neuroriabilitazione 1 del IRCCS "E. Medea" di Ostuni, per ciclo di riabilitazione intensiva
- soggetti in età evolutiva con inquadramento diagnostico neuroradiologico, neurogenetico /neurometabolico e neuropsicologico già effettuato

Criteri di esclusione:

- soggetti disabili ancora privi di diagnosi certa
- soggetti con disturbi pervasivi dello sviluppo o disabilità di tipo psicopatologico
- bambini con obesità

Tutti i soggetti arruolati sono stati sottoposti a monitoraggio video-elettroencefalografico in veglia e in sonno nella stanza di video monitoraggio EEG dell'UO, dopo almeno una notte di adattamento allo scopo di evitare l'effetto prima notte.

La polisonnografia ha previsto i seguenti canali di registrazione:

- 18 canali EEG (Fp2, F4, C4, P4, O2, F8, T4, T6, Fp1, F3, C3, O1, F7, T3, T5, Fz, Cz, Pz), derivazioni bipolari, calibrazione di 70 mV/mm con costanti di tempo di 0.1 s e HFF: 20 Hz
- 2 canali per elettroculogramma – EOG - (dx e sn)
- 1 canale elettromiografico sotto-mentoniero
- 2 canali EMG (tibiale anteriore dx e sn)
- 1 canale per i movimenti toraco-addominali
- 1 canale ECG
- Monitoraggio video

Tutte le registrazioni sono state avviate all'ora abituale dell'andata a letto del paziente fino al risveglio spontaneo al mattino e effettuate in presenza del genitore/accompagnatore, sotto costante supervisione videotelemetrica di personale sanitario dell'unità operativa.

Dei 9 bambini arruolati tutti presentano all'EEG anomalie parossistiche ma solo 7 presentano epilessia in atto o pregressa, in 2 generalizzata, nei restanti parziale con o senza generalizzazione secondaria. Al momento dell'esecuzione della polisonnografia, tutti i pazienti tranne due avevano già effettuato almeno un'indagine neuroradiologica dell'encefalo, in tre soggetti l'esame è risultato privo di alterazioni patologiche, nei restanti 4 vengono descritti quadri esitali da sofferenza più o meno estesa del parenchima cerebrale. Dal punto di vista causale la disabilità predominante risulta essere in 2 bambini conseguente alla paralisi cerebrale infantile, in 1 da esiti di encefalite virale, in 2 da sindrome dismorfogenetica, e nei restanti 4 dall'epilessia. Per quanto riguarda il livello cognitivo-neuropsicologico tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione con test psicometrici/neuropsicologici standardizzati in base all'età dei soggetti e al loro grado di compromissione a livello motorio o di linguaggio (WISC III, Leither, Griffiths). Dei bambini arruolati, 5 presentavano una disabilità intellettiva grave, 1 disabilità intellettiva lieve, 1 livello borderline, e 3 quoziente nella norma.

Dall'analisi polisonnografica e dall'analisi dei tracciati è risultato che, a fronte della presenza o meno di anomalie parossistiche più o meno frequenti, la macrostruttura che accomuna tutti i sonni dei bambini arruolati attualmente nello studio, è abbastanza stabile con prevalenza di sonno ad onde lente e relativamente pochi risvegli. Sebbene l'analisi macrostrutturale indica un sonno ristoratore, la microstruttura del sonno smentisce questo dato, in quanto sono presenti numerosi arousals, anomalie puntute/lente ed eccessiva presenza di Cyclic Alternating Pattern - CAP3 (anomalo data l'età dei pazienti) che ne fa un sonno frammentato e instabile. Infine durante i monito-

raggio abbiamo registrato sia fenomeni parossistici epilettici che non epilettici con non univoca correlazione con le caratteristiche qualitative della micro e macrostruttura del sonno.

ATTIVITÀ PREVISTE

I dati raccolti ad oggi sono preliminari, a causa del numero dei pazienti arruolati, abbiamo effettuato solo una analisi descrittiva del campione, per tale motivo l'obiettivo della continuazione dello studio è certamente quello di ampliare la casistica, cercando di giungere a sottocampioni significativi di casistica differenziati per tipologia di disabilità dello sviluppo, tali da permettere di identificare pattern polisonnografici peculiari, valutare i rapporti tra sonno e epilessia e valutare come pattern polisonnografici alterati possono influenzare lo sviluppo di un bambino con disabilità.

CARATTERIZZAZIONE CLINICA E NEUROFISIOLOGICA DEI DISTURBI DEL SONNO NELLE CONDIZIONI PSICOPATOLOGICHE E NEUROLOGICHE: MODELLO ADHD E ESES

DR.SSA ANNA VOLZONE

E-MAIL: ANNA.VOLZONE@CN.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 4

Neurofisiopatologia Clinica e Strumentale

Tipo di ricerca

Corrente

Periodo di svolgimento

2012

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

DESCRIZIONE

Razionale: L'incidenza dei disturbi del sonno in età pediatrica varia dal 25 al 40%. L'ampia variabilità è dovuta al tipo di popolazione in cui è valutato il disturbo e la difficoltà di una classificazione nosografica che tenga conto non solo della clinica ma anche delle manifestazioni neurofisiologiche. Il sonno rappresenta un nodo cruciale tra lo sviluppo e la patologia con una relazione che può essere di causa o di effetto rispetto al disturbo stesso. Quando si parla di disturbo del sonno si possono ritrovare tre condizioni:

- Disturbi del sonno di “per sé” come indicato nella classificazione DSM-IV (difficoltà ad iniziare e mantenere il sonno in b.ni con normale sviluppo)
- Disturbi del sonno in comorbidità con i quadri psicopatologici (esempio ADHD, disturbi pervasivi dello sviluppo)
- Disturbi del sonno in comorbidità con i quadri neurologici (esempi sono i quadri di encefalopatia epilettica sostenute da alterazioni elettriche continuative durante il sonno dove si può ravvedere un legame tra funzionamento/regressione neuropsicologica ed alterazione della struttura del sonno oppure le condizioni epilettiche a specifica estrinsecazione in sonno)

Le condizioni di comorbidità pongono spesso dubbi rispetto al trattamento e soprattutto anche nelle condizioni di comorbidità il disturbo del sonno viene spesso solo descritto in termini clinici senza nessun riferimento alle caratteristiche di macro e/o di microstruttura del sonno. La mancanza dei dati polisonnografici spesso non permette di spiegare se i sintomi diurni possono in qualche modo risentire dell'andamento notturno.

Tra i quadri di più recente interesse vi sono le condizioni di comorbidità tra

disturbo del sonno/ADHD, disturbo del sonno/autismo oltre ai quadri di encefalopatia epilettica con anomalie elettriche continue in sonno in pazienti senza chiari fenomeni critici diurni che possono avere ripercussioni specifiche neuropsicologiche o vere e proprie regressioni.

Obiettivi del progetto

1. Quantificare e caratterizzare sul piano neurofisiologico e clinico i disturbi del sonno in comorbidità con condizioni psicopatologiche (modello ADHD) e neurologiche (condizioni di stati elettrici continui in sonno con e senza deficit neuropsicologici specifici).
2. Descrizione neurofisiologica delle due possibili condizioni che possono realizzarsi: manifestazioni cliniche di alterazione del sonno (arousal, difficoltà a mantenere il sonno, difficoltà ad addormentarsi, stanchezza ed instabilità diurna) con o senza alterazione della macrostruttura del sonno, alterazione della macrostruttura del sonno con o senza manifestazioni cliniche entrambi con un potenziale effetto sul funzionamento neuro-cognitivo.

MATERIALI E METODI

Prima fase: individuare nella casistica di bambini con diagnosi di ADHD già seguiti presso il nostro centro e tra quelli di nuova diagnosi la presenza di disturbi del sonno che clinicamente hanno un impatto sull'attenzione diurna. Somministrazione di questionari specifici per qualità del sonno e per la stanchezza diurna.

Individuazione di pazienti che durante video-EEG di veglia e sonno presentano condizioni di stati elettrici continui in sonno.

Seconda fase: avvio allo studio specifico del sonno mediante monitoraggio video-EEG polisonnografico di almeno due notti e approfondimento del profilo neuropsicologico. Questa fase prevede l'arruolamento di circa 24 b.ni distribuiti in modo da effettuare uno studio polisonnografico al mese.

Terza fase: analisi e confronto dei dati nelle due casistiche.

RISULTATI ATTESI

I risultati permetteranno di descrivere effettivamente quanto l'alterazione della struttura del sonno abbia una concreta incidenza sulle capacità neuropsicologiche di attenzione e concentrazione durante il giorno. Si definiranno i criteri di intervento farmacologico se necessario individuando

condizioni di alterazione del sonno che hanno un maggior impatto sulla qualità di vita del bambino.

ATTIVITÀ PREVISTE

- analisi dei dati polisonnografici
- discussione dei risultati
- individuazione di un protocollo finalizzato all'individuazione, allo studio e al trattamento dei disturbi del sonno nei pazienti pediatrici con malattia neurologica
- pubblicazione di lavori su riviste indicizzate e non.
- presentazione dei dati a congressi di neurologia pediatrica.

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

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio di biologia molecolare; U.O. di Neurofisiopatologia

Università di Milano: Dipartimento di Scienze Precliniche e Dipartimento di Biologia

Università di Milano-Bicocca: Dipartimento di Medicina Sperimentale

Consiglio Nazionale delle Ricerche: Istituto di Neuroscienze

University of Geneva: Medical School

University College London: The Wolfson Institute for Biomedical Research

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. Nel corso del primo anno di lavoro abbiamo dimostrato che i processi di fissione e fusione mitocondriale controllano il differenziamento delle cellule miogeniche. Abbiamo inoltre dimostrato che i mitocondri quando sono in stato fissionato hanno una disfunzione metabolica latente; disfunzione che attiva i processi di mitofagia. Infine abbiamo dimostrato che un mediatore chiave sia nel tessuto muscolare che nervoso, il nitrossido (NO), interagendo con la proteina fissogena DRP-1, di cui NO controlla sia localizzazione che attività GTPasica, regola il differenziamento e riparo muscolare. In assenza di NO i mitocondri rimangono fissi, ed il differenziamento miogenico è rallentato. 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 mitocondriali. 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. Attenzione particolare verrà posta al ruolo dell'NO sia come attore protettivo che pro-rigenerativo con lo scopo di identificare quali delle sue azioni siano mediate da un controllo dei processi di fissione e fusione mitocondriale. Uno dei processi che verrà analizzato in modo particolare sarà il processo di mitofagia.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Abbiamo studiato in dettaglio il ruolo della proteina fissogena drp1 nell' differenziamento di cellule miogeniche in cultura primaria e gli effetti di tale proteina sulla bioenergetica cellulare. Abbiamo infine caratterizzato il rapporto tra Drp-1 ed il mediatore gassoso NO che svolge un ruolo importante nella fisiologia della miogenesi.

I dati ottenuti hanno dimostrato che NO controlla il differenziamento miogenico; la inibizione della sintesi endogena di NO in cellule miogeniche si accompagnava infatti a rallentamento significativo del processo differenziale con espressione inibita o ritardata di markers sia precoci (Mef2A) che intermedi (miogenina) che tardivi (miosina muscolo specifica) del differenziamento. Abbiamo dimostrato che questa inibizione del differenziamento si accompagnava a mantenimento della struttura fissionata dei mitocondri, che normalmente assumono una forma allungata nelle cellule differenzianti. Abbiamo dimostrato utilizzando un dominante negativo di drp-1, K38A, che NO facilitava il differenziamento proprio attraverso la inibizione della attività e della traslocazione di drp-1 dal citosol al mitocondrio. Abbiamo dimostrato che questa azione dipendeva da fosforilazione di DRp-1 mediata dalla attivazione NO-dipendente della protein kinasi cGMP dipendente. In parallelo abbiamo dimostrato che anche in vivo NO ha funzione miogenica; in particolare NO è senza dubbio coadiuvante nella azione di riparo muscolare in

corso di danno quale quello che si osserva in corso di distrofia muscolare. In parte questo può essere dovuto al fatto che i livelli di ATP, ADP, NAD, NADH, piruvato citrato e ossalacetato, misurati attraverso metodiche immuno-enzimatiche e di neuroimaging funzionale in animali distrofici (topi deficienti in alfa sarcoglicano sono normalizzati dal trattamento con NO.

I dati ottenuti sono stati pubblicati (Sciorati et al., 2010 e 2011) e suggeriscono che il sistema NO/Drp1 possa avere un ruolo cruciale nel controllo della miogenesi inclusa la miogenesi che avviene in seguito a danno muscolare come nelle distrofie muscolari.

Abbiamo anche dimostrato che NO mantiene e rigenera il pool di riserva delle cellule staminali miogeniche dette cellule satelliti (SC). In primo luogo, abbiamo analizzato le cellule SC positive per Pax7 e Myf5 nella singola miofibre isolate dal muscolo estensore lungo delle dita (EDL) e mantenute in sospensione in presenza o assenza del donatore di NO SIN-1, l'inibitore della NOS, L-NAME, o di un veicolo. Abbiamo evidenziato che in seguito a somministrazione di NO il numero di cellule SC Pax7-/Myf5 + è fortemente aumentato. NO stimola la proliferazione delle SC e mantiene il pool di Pax7 + / Myf5-SC anche in seguito a lesioni muscolari acute o a danno cronico-ripetitivo.

Per studiare come NO aumenta il numero di SC abbiamo analizzato il suo effetto nella proliferazione delle SC in seguito a incorporazione di BrdU in fibre mantenute in sospensione in presenza o assenza di donatori di NO o l'inibitore della sua sintesi L-NAME, o in fibre isolate da animali trattati con molsidomina, un donatore di NO o L-NAME. Abbiamo dimostrato che NO stimola la proliferazione delle SC via GMP ciclico (cGMP); inoltre abbiamo chiarito che meccanismi indipendenti dal cGMP, ma dipendenti da NO, giocano un ruolo ancillare ma chiave. In particolare abbiamo dimostrato che il mantenimento del pool di cellule SC Pax7 + Myf5- dipende da Vangl2 molecola appartenente al pathway non canonico di Wnt. Si è potuto rilevare come il NO incrementi l'espressione di Vangl2 mentre con il silenziamento di Vangl2 si ottiene una completa abolizione dell'azione del NO. Così, mentre noi non possiamo escludere che altri effettori a valle del NO partecipino a quest'azione d'incremento di Pax7 + / Myf5-, possiamo altresì affermare che i nostri risultati, pubblicati recentemente (Buono et al., 2011) identificano Vangl2 come target necessario per questa azione di NO.

Prodotti della ricerca

- C. Sciorati, R. Buono, E. Azzoni, S. Casati, P. Ciuffreda, G. D'Angelo, D. Cattaneo, S. Brunelli, and Clementi E. Co-administration of ibuprofen and

nitric oxide is an effective experimental therapy for muscular dystrophy, with immediate applicability to humans. *Br. J. Pharmacol.* 160: 1550-1560, 2010

- C. Sciorati, D. Miglietta, R. Buono, V. Pisa, D. Cattaneo, E. Azzoni, S. Brunelli, and E. Clementi. A dual acting compound releasing nitric oxide (NO) and ibuprofen, NCX 320, shows significant therapeutic effects in a mouse model of muscular dystrophy. *Pharmacol. Res.* 64: 2010-2017, 2011
- R. Buono, C. Vantaggiato, V. Pisa, E. Azzoni, M.T. Bassi, S. Brunelli, C. Sciorati, and E. Clementi. Nitric Oxide Sustains Long Term Skeletal Muscle Regeneration by Regulating Satellite Cells Fate via Signalling Pathways Requiring Vangl2 and Cyclic GMP. *Stem Cells.* 2011 Nov 14. doi: 10.1002/stem.783.

MECCANISMI MOLECOLARI DI DEGENERAZIONE DI MOTONEURONI IN FORME COMPLICATE DI PARAPARESI SPASTICA AD ESORDIO IN ETÀ PEDIATRICA

DR.SSA MARIA TERESA BASSI

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

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

DESCRIZIONE

La variabilità nei meccanismi molecolari implicati nei processi degenerativi motoneuronali è dovuta all'ampia eterogeneità dei fattori genetici coinvolti anche nell'ambito dello stesso gruppo di patologie. Questa situazione è particolarmente evidente nell'ambito delle paraparesi spastiche, patologie dovute a degenerazione del primo moto neurone, con 48 loci al momento noti e solamente 19 i geni identificati coinvolti. Le proteine codificate da questi geni sono prive di omologia sia funzionale che strutturale. Di conseguenza sono molteplici i meccanismi implicati proposti, ad esempio anomalie nella funzionalità mitocondriale, difetti nel trasporto assonale, difetti nel traffico vescicolare e fusione di endosomi, stress del reticolo endoplasmatico e accumulo di proteine misfolded, difetti nel metabolismo del colesterolo. Data la numerosità dei geni ipoteticamente ancora da scoprire (più del doppio sulla base dei loci attualmente noti) si prevede che molti altri processi possano aggiungersi a questa lista.

Questo progetto si focalizza in particolare su forme complicate di paraparesi ad esordio in età pediatrica, ed in particolare sulla forma SPG15 con trasmissione recessiva ed esordio tra la prima e la seconda decade di vita. Tale forma è dovuta a mutazioni nel gene ZFYVE26 codificante una proteina chiamata spastizina (Hanein 2008). I dati presenti in letteratura indicano un ruolo della proteina nella citochinesi. La Spastizina trasloca dal centrosoma al midbody durante la citochinesi ed in sua assenza la citochinesi si blocca. Inoltre interagisce con TTC19 e KIF13A; entrambe le proteine si localizzano al midbody e in assenza di una o dell'altra la citochinesi si blocca. L'ipotesi è che la Spastizina leghi TTC19 e che poi KIF13A leghi entrambe e le trasporti dal centrosoma al midbody. La Spastizina lega anche Beclin (altra proteina

che localizza al midbody ed è fondamentale per l'autofagocitosi) e la forma mutata R1945Q impedisce il legame con Beclin e ne altera la localizzazione al midbody inducendo blocco in citochinesi (Sagona 2011).

Inoltre, nella proteina è presente il dominio FYVE, uno zing finger binding domain altamente conservato costituito da 8 residui di cisteina che permette il legame alle forme di membrana del PI3P regolatore della via endocitotica. Tale via risulta essere quella maggiormente colpita nel caso di blocco del processo di autofagocitosi. Questi dati permettono di ipotizzare un ruolo della proteina nella via endocitotica e nell'autofagocitosi. Questo è un processo di auto-degradazione delle cellule eucariotiche essenziale per il mantenimento dell'omeostasi cellulare. Questo processo, in condizioni basali, permette alla cellula di degradare i suoi organuli danneggiati e le proteine più longeve, inoltre viene attivato in caso di privazione di sostanze nutritive o in risposta alla carenza dei fattori di crescita.

Nell'ambito della ricerca corrente 2011 si è studiata la localizzazione della proteina in cellulari neuronali di topo e l'effetto del suo silenziamento sul processo di differenziamento neuronale. In particolare si è osservato che in questi neuroni il silenziamento di spastizina determina una diminuzione nella lunghezza del neurite e un incremento degli autofagosomi (già in assenza di induzione di autofagocitosi) a cui fa seguito un maggiore accumulo di autofagosomi nel citosol rispetto al controllo quando l'autofagocitosi viene indotta. L'aumento degli autofagosomi nel citosol dei neuroni potrebbe essere la causa dei difetti osservati nella formazione del neurite o della sua degenerazione. Non è infatti escluso che il neurite possa formarsi e poi degenerare per l'accumulo degli autofagosomi lungo l'assone. Questi dati seppur molto preliminari indicano che nelle cellule con la spastizina mutata il processo di autofagocitosi è alterato.

Il presente progetto è mirato alla conferma di questi dati utilizzando a) un modello di topo di differenziamento specificamente motoneuronale (P19 trattate con acid retinoico e un agonista di Shh) per studiare specificamente sul motoneurone l'effetto di alterazione dell'autofagocitosi osservata sui neuroni primari; b) caratterizzare più dettagliatamente il processo di autofagocitosi con marcatori per le fasi precoci e tardive e definire se si tratta di un problema di accumulo o maggiore induzione; c) verificare questi dati in vitro in modelli cellulari umani portanti mutazioni patologiche di questa proteina. Nel caso dell'uomo le cellule più facilmente accessibili sono rappresentate da linfoblasti e/o fibroblasti di soggetti con mutazioni in SPG15. La possibilità di validare in tali modelli i dati ottenuti su cellule di topo permetterà di identificare marcatori biologici associati alla patologia ed eventualmente target per pianificare un futuro intervento farmacologico.

ATTIVITÀ PREVISTE

1. Analisi del ruolo della spastizina nel differenziamento neuronale e motoneuronale in cellule di topo P19

I cloni di P19 ottenuti dalla transfezione stabile con il vettore esprime la forma wild-type della spastizina o codificante per l'shRNA verranno utilizzati per analizzare il ruolo della spastizina nel differenziamento neuronale. Per analizzare il differenziamento neuronale i cloni verranno incubati con acido retinoico (RA) in piastre batteriche per indurre la crescita in sospensione e la formazione di aggregati (Bain, 1994). Dopo 4 giorni gli aggregati verranno dissociati e piastrati in un terreno neuronale e tenute in colture per un totale di 14 giorni. Il differenziamento verrà studiato nelle sue diverse fasi, induzione, neuritogenesi e sinaptogenesi, analizzando i livelli di espressione di marker specifici tramite Real Time PCR o WB. L'effetto di overespressione e silenziamento sull'induzione del differenziamento verrà determinato analizzando il livelli di espressione di FGF8, FGFR1, Oct3/4 e dei geni indotti da RA: Mash1, Wnt1 e N-caderina. L'effetto di overespressione e silenziamento sull'apoptosi indotta dall'acido retinoico verrà determinato quantificando l'attività della caspasi 3 dopo induzione e colorando le cellule con PI e DAPI per determinare la percentuale di cellule morte (Vantaggiato, 2011). Il trattamento delle P19 con acido retinoico oltre ad attivare il differenziamento neuronale e l'apoptosi, induce anche autofagocitosi attraverso la riduzione dell'espressione di Bcl2 e la conseguente attivazione di Beclin1, e l'inattivazione di mTor ad opera della Akt. Durante il differenziamento dei cloni verranno analizzati i livelli dei marker dell'autofagocitosi Beclin1, LC3II, p62, ubiquitina, lamp2, lamp1 e i livelli di fosforilazione di mTor tramite immunofluorescenza e WB. Le cellule P19 possono differenziare anche in altre popolazioni neuronali se trattate con acido retinoico (RA) ad esempio in motoneuroni e interneuroni se trattate con acido retinoico e Sonic hedgehog (Shh) (Wichterle, 2002; Li, 2011). I cloni di P19 ottenuti dalla transfezione stabile con il vettore esprime la forma wild-type della spastizina o codificante per l'shRNA verranno incubati con RA e Shh per 4 giorni e successivamente gli aggregati verranno dissociati e piastrati su piastre trattate con matrigel (Wichterle, 2002). P19 transfettate stabilmente con il vettore vuoto verranno usate come controllo. La formazione dei motoneuroni nei diversi cloni verrà analizzata nei 5-6 giorni successivi utilizzando marker morfologici e funzionali (Subramanian, 2008). In particolare analizzeremo la formazione delle cellule precursori dei motoneuroni durante la fase di aggregazione determinando l'espressione dei geni Pax6, Nkx6.1 e Olig2 tramite Real Time PCR (Wichterle, 2002). La generazione di motoneuroni postmitotici verrà determinata dopo la dissociazione degli

aggregati analizzando l'espressione dei marker dei motoneuroni HB9, Isl1 e Lhx3. Le successive analisi morfologiche verranno condotte su cellule HB9 positive. L'effetto di overespressione e silenziamento della spastizina verrà analizzato sia sulla formazione dei motoneuroni che sulla degenerazione. Quest'ultima verrà determinata analizzando l'atrofia del soma, la diminuzione della lunghezza dei neuriti, la riduzione del numero di cellule HB9 positive in coltura (Haidet-Phillips, 2011) e determinando l'attività della caspasi 3 e l'apoptosi.

2. Analisi del ruolo della spastizina nell'autofagocitosi

Dall'analisi del silenziamento della spastizina in cellule ippocampali è stata evidenziata una correlazione tra la proteina e l'autofagocitosi, si propone quindi di analizzare nel dettaglio il ruolo della spastizina nell'autofagocitosi determinando l'effetto della forma wt e delle mutazioni associate a SPG15 su questo processo. Nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata appena conclusa (RF 2007, resp Prof Bresolin) sono state raccolte linee cellulari di soggetti con 3 mutazioni in questo gene: L243P, I508N e S1312X. Queste linee cellulari verranno utilizzare per validare e confermare i dati relativi all'autofagocitosi osservati nelle cellule neuronali di topo. In particolare l'autofagocitosi verrà indotta in entrambi i modelli cellulari incubando le cellule con EBSS per tempi variabili da 30 minuti a 6 ore. Per ogni tempo di induzione verranno preparati estratti proteici per determinare l'autofagocitosi indotta analizzando tramite SDS-PAGE e WB i livelli di p62 e LC3-II. Verranno analizzati anche i livelli di Beclin e di fosforilazione di mTor, responsabili rispettivamente dell'attivazione e dell'inibizione dell'autofagocitosi, e i livelli di lamp1 e lamp2 per definire la presenza di difetti lisosomali. Verranno inoltre analizzati i livelli di Atg7 per evidenziare eventuali anomalie nella produzione della forma LC3-II, coniugata con la fosfatidiletanolammina (PE). Questi marker verranno analizzati anche in assenza di induzione dell'autofagocitosi per determinare se mutazioni della proteina o l'assenza di funzione possono determinare alterazioni dell'autofagocitosi anche in condizioni basali.

In cellule adese l'autofagocitosi verrà analizzata anche tramite immunofluorescenza. Le cellule wt e mutate verranno piastrate in multiwell da 6 su vetrini trattati con poli-L-lisina e dopo 24 ore verranno transfettate con il vettore esprimente LC3-RFP per marcare gli autofagosomi. Dopo 24 ore verranno incubate con EBSS per tempi variabili per indurre l'autofagocitosi e al termine di ogni periodo di incubazione le cellule verranno fissate con paraformaldeide e processate per immunofluorescenza utilizzando anticorpi specifici per p62, ubiquitina, lamp1 e lamp2. La localizzazione delle proteine Atg, Atg18 ed il complesso Atg12-Atg5-Atg16, che legano il PI3P sulle isolation membranes da cui si originano gli autofagosomi, verrà inoltre analizzata per determinare

eventuali alterazioni dovute alle mutazioni della spastizina.

Queste cellule verranno utilizzate per studiare la localizzazione della spastizina in presenza/assenza di autofagocitosi per determinare un eventuale coinvolgimento diretto della proteina in questo processo. In particolare verrà analizzata l'eventuale colocalizzazione della proteina con i marker degli autofagosomi p62 e LC3 e con le proteine Atg sulle isolation membranes. In caso di colocalizzazione con uno dei marker, la traslocazione della spastizina sugli autofagosomi verrà analizzata tramite live imaging per determinarne le modalità e i tempi. A questo proposito le cellule verranno transfettate con un vettore esprimente la spastizina wild-type o mutata con un tag GFP e con il vettore codificante per LC3-RFP. La localizzazione nel citosol della spastizina (GFP, verde) e degli autofagosomi (LC3, rosso) verrà seguita in vivo in presenza e in assenza di EBSS per indurre l'autofagocitosi. Le immagini verranno acquisite ogni 3 minuti per un totale di 45 minuti dall'induzione.

3. Immunoprecipitazione

Le cellule di controllo e mutate verranno utilizzate per immunoprecipitare la spastizina ed individuare eventuali interattori. Per l'immunoprecipitazione verrà utilizzato l'estratto totale e la proteina verrà immunoprecipitata utilizzando un anticorpo specifico per la spastizina precedentemente legato alla proteina A sepharose. L'immunoprecipitato verrà analizzato tramite WB inizialmente usando anticorpi diretti contro le 3 proteine la cui interazione con la spastizina è già stata dimostrata: Beclin1, TTC19 e KIF13 (Sagona 2010 e 2011). Come possibili nuovi interattori verranno prese in considerazione proteine coinvolte nell'autofagocitosi come le proteine Atg. In particolare le proteine Atg18 ed il complesso Atg12-Atg5-Atg16 che interagiscono con il PI3P a livello delle membrane dell'autofagosoma. L'uso di cellule mutate permetterà di individuare eventuali alterazioni nelle interazioni proteina-proteina che potrebbero giustificare il fenotipo associato.

4. Analisi di eventuali altre mutazioni in spastizina che si renderanno disponibili in letteratura e/o in laboratorio.

Parallelamente al lavoro di caratterizzazione molecolare del processo di degenerazione indotto da spastizina, si utilizzeranno le informazioni di sequenza eventualmente prodotte nell'ambito di un progetto (Prog 5XMille-2012, resp Ing U Pozzoli) che partirà all'interno di questo Ente focalizzato sul sequenziamento massivo di pazienti con varie patologie motoneuronali. Nel caso vengano identificate mutazioni in spastizina, verranno generate linee cellulari per la caratterizzazione della proteina mutata nell'ambito del presente progetto previo ottenimento di specifico consenso informato. Data l'estrema rarità delle mutazioni in SPG15 si prevede di identificare 1-2 altre mutazioni.

Referenze

- Bain G., W.J. Ray, M. Yao, and D.I. Gottlieb. 1994. From embryonal carcinoma cells to neurons: the P19 pathway. *Bioessays*. 16(5):343-8. Review.
- Barth S, Glick D, Macleod KF. 2010. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol*. Jun; 221(2):117-24. Review.
- Dotti C.G., C.A. Sullivan, and G.A. Banker. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci*. 8(4):1454-68.
- Haidet-Phillips AM, Hester ME, Miranda CJ, Meyer K, Braun L, Frakes A, Song S, Likhite S, Murtha MJ, Foust KD, Rao M, Eagle A, Kammesheidt A, Christensen A, Mendell JR, Burghes AH, Kaspar BK. 2011. Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons. *Nat Biotechnol*. Aug 10;29(9):824-8.
- Hanein S, Martin E, Boukhris A, Byrne P, Goizet C, Hamri A, Benomar A, Lossos A, Denora P, Fernandez J, Elleuch N, Forlani S, Durr A, Feki I, Hutchinson M, Santorelli FM, Mhiri C, Brice A, Stevanin G. 2008. Identification of the SPG15 gene, encoding spastizin, as a frequent cause of complicated autosomal-recessive spastic paraplegia, including Kjellin syndrome. *Am J Hum Genet*. Apr;82(4):992-1002.
- Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, Zhang SC. 2005. Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. Feb;23(2):215-21.
- Murmu RP, Martin E, Rastetter A, Esteves T, Muriel MP, El Hachimi KH, Denora PS, Dauphin A, Fernandez JC, Duyckaerts C, Brice A, Darios F, Stevanin G. 2011. Cellular distribution and subcellular localization of spatacsin and spastizin, two proteins involved in hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Neurosci*. Jul;47(3):191-202.
- Sagona AP, Nezis IP, Pedersen NM, Liestøl K, Poulton J, Rusten TE, Skotheim RI, Raiborg C, Stenmark H. 2010. PtdIns(3)P controls cytokinesis through KIF13A-mediated recruitment of FYVE-CENT to the midbody. *Nat Cell Biol*. Apr;12(4):362-71.
- Sagona AP, Nezis IP, Bache KG, Haglund K, Bakken AC, Skotheim RI, Stenmark H. 2011. A tumor-associated mutation of FYVE-CENT prevents its interaction with Beclin 1 and interferes with cytokinesis. *PLoS One*. Mar 24;6(3):e17086.
- Subramanian V, Crabtree B, Acharya KR. 2008. Human angiogenin is a neuroprotective factor and amyotrophic lateral sclerosis associated angiogenin variants affect neurite extension/pathfinding and survival of mo-

- tor neurons. *Hum Mol Genet.* Jan 1;17(1):130-49.
- Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. 2002. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* Aug 9;110(3):385-97.
 - Vantaggiato C, Bondioni S, Airoidi G, Bozzato A, Borsani G, Rugarli EI, Bresolin N, Clementi E, Bassi MT. 2011. Senataxin modulates neurite growth through fibroblast growth factor 8 signalling. *Brain.* Jun;134(Pt 6):1808-28.

VARIABILITÀ FENOTIPICA E APOLOINSUFFICIENZA NELLA SINDROME DI PHELAN/MCDERMID: IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENI MEDIANTE SEQUENZIAMENTO DELL'ESOMA

DR.SSA MARIA CLARA BONAGLIA

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

Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Università di Pavia: Genetica Medica

DESCRIZIONE

Soggetti con la sindrome Phelan/McDermid (PMS, MIM 606232), causata dalla perdita della porzione terminale di un cromosoma 22 alla regione q13, mostrano un ritardo dello sviluppo, assenza o grave compromissione del linguaggio, lievi dismorfismi facciali e spesso problemi comportamentali. L'aploinsufficienza del gene SHANK3, un gene fondamentale per il corretto sviluppo e organizzazione delle sinapsi cerebrali, è verosimilmente responsabile dei principali sintomi neurologici della sindrome, poiché deleta o interrotta in tutti i pazienti affetti dalla PMS. Inoltre, mutazioni puntiformi nel gene SHANK3 risultano in disturbi del linguaggio e/o comportamentali.

Un nostro recentissimo studio condotto su 44 pazienti con PMS e monosomia 22q13 (72% con delezione terminale 22q13 pura, 14% con ring 22,7% con traslocazione sbilanciata e 9% con delezioni interstiziali criptiche 22q13), ha permesso di stabilire che pazienti non correlati, portatori di delezioni 22q13 con la stessa taglia, possono presentare un fenotipo estremamente diverso in termini di severità e complessità (Bonaglia et al, 2011). In particolare i soggetti adulti, con età oltre i 40 anni, mostrano un progressivo deterioramento clinico, a supporto del fatto che l'aploinsufficienza di SHANK3 contribuisce al deterioramento neurologico oltre che al suo coinvolgimento nel fenotipo comportamentale della sindrome.

Anomalie importanti come difetti cardiaci (6%), epilessia (30%), anomalie cerebrali (69%) si possono riscontrare in pazienti indipendentemente dalla taglia della delezione 22q13.

Questi dati oltre a confermare l'estrema variabilità del fenotipo clinico (Bognaglia et al, 2011; Sarasua et al. 2011) sebbene l'aploinsufficienza del gene SHANK3 sia stata dimostrata in tutti i soggetti analizzati, suggeriscono che, oltre al gene SHANK3, possibili mutazioni recessive in un gene(i) che mappa(no) nella porzione 22q deleta o mutazioni di un gene(i) localizzato(i) in un altro punto del genoma possono contribuire alla complessità e/o severità del fenotipo.

Recenti scoperte dimostrano che il sequenziamento massivo dell'intero genoma (noto come next-generation sequencing, NGS), in un contesto di geni coinvolti nei pathways critici per lo sviluppo e la funzione neuronale, è verosimilmente l'approccio più produttivo per identificare eventi che, in combinazione con cause note, possono determinare la gravità o aumentare il rischio per alcuni disturbi comportamentali (ASD) e/o ritardo mentale. Inoltre, tra le varie applicazioni di NGS, il sequenziamento massivo dell'intero esoma è stato utilizzato per identificare le cause di disordini Mendeliani rari in un piccolo gruppo di pazienti (Ku et al. 2011).

Perciò, l'obiettivo di questo studio è l'identificazione di mutazioni in geni noti e non- mediante arricchimento della regione genomica codificante e non-codificante 22q13 coinvolta nella PMS e sequenziamento massivo parallelo. Questo approccio consentirà di identificare mutazioni recessive nuove o note che, in associazione con l'aploinsufficienza del gene SHANK3, risultano in un fenotipo complesso in alcuni pazienti con PMS; consentirà, inoltre l'analisi delle regioni genomiche non codificanti (introni o ampie regioni che non contengono geni fiancheggianti porzioni genomiche codificanti) e l'individuazione di alterazioni in elementi regolatori (enhancer) che possono modificare l'attività trascrizionale alterando l'espressione dei geni vicini, come dimostrato per alcuni geni importanti per sviluppo che risultano in fenotipo malattia (Kleinjan and vanHeyningen, AJHG 2005).

ATTIVITÀ PREVISTE

Categorizzazione della casistica presente di pazienti con PMS

Una prima analisi riguarderà la categorizzazione della casistica in nostro possesso di cui abbiamo una dettagliata analisi del fenotipo associata ad una precisa caratterizzazione molecolare svolta nel precedente studio (Bognaglia et al, 2011).

I pazienti verranno raggruppati sulla base:

- dati molecolari: taglia della delezione 22q13, presenza o meno di mosaicismi, punto di rottura della delezione all'interno o meno del gene SHANK3, monosomia pura o associata a duplicazioni

- dati clinici: per età, presenza o meno di familiarità per specifici sintomi, presenza di epilessia, malformazioni cardiache, malformazioni cerebrali.
- Identificazione di nuovi geni: disegno sperimentale analisi DNA e analisi dei dati prodotti da NGS

In questo studio intendiamo analizzare la porzione genomica che copre le 9 Mb terminali della regione cromosomica 22q13 associata alla PMS mediante esperimenti di arricchimento targettato (target-enrichment) e sequenziamento massivo parallelo.

La piattaforma verrà disegnata mediante il software <https://earray.chem.agilent.com/earray/> (Agilent) e verranno incluse sia porzioni codificanti che non codificanti, ad esclusione delle regioni altamente ripetute.

I risultati prodotti dai sequenziatori NGS saranno analizzati utilizzando software specifici (Bowtie, SeqMap etc) che consentono di allineare le sequenze genomiche prodotte da una grandissima quantità di frammenti (reads) in modo da ottenere la loro precisa localizzazione cromosomica.

Presteremo particolare attenzione all'identificazione delle tecniche che garantiscano tempi di elaborazione accettabili unitamente ad un'elevata precisione.

Una volta ottenuto l'allineamento di tutte le reads si procederà all'identificazione delle varianti sia comuni che rare. Queste varianti verranno poi raccolte, debitamente anonimizzate, in un database e analizzate attraverso un'apposita interfaccia da noi sviluppata.

Le mutazioni potenzialmente causative verranno verificate mediante re-sequenziamento tradizionale su una popolazione di soggetti sani di controllo.

I dati del genotipo verranno successivamente discussi con i clinici referenti del paziente per la correlazione genotipo/fenotipo.

RISULTATI ATTESI

Questo approccio consentirà di:

1. chiarire le basi genetiche che, in associazione all'aploinsufficienza del gene SHANK3, concorrono alla variabilità dei sintomi riscontrata nei pazienti con PMS mediante il rilevamento di possibili mutazioni alleliche di geni che mappano nella porzione deleta 22q13 (mutazioni recessive) oppure individuando alterazioni di elementi regolatori nelle porzioni non codificanti che possono interferire nella trascrizione dei geni vicini alterandone l'espressione.
2. capire il meccanismo di variabilità della gravità della malattia, estendendo l'analisi ai genitori per valutare la presenza di fattori modificatori che pos-

sano influenzare tale variabilità.

3. ottenere nuovi dati sui meccanismi molecolari che determinano la formazione delle delezioni distali.

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

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Laboratorio di biologia molecolare

DESCRIZIONE

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.

Senataxin è codificata dal gene *SETX* ed è principalmente coinvolta in due diverse malattie neurodegenerative: una forma dominante giovanile di Sclerosi Amiotrofica Laterale tipo 4 e una forma recessiva di Atassia con Aprassia Oculomotoria di tipo 2. La proteina *senataxin* contiene un dominio DNA/RNA elicastico 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 *senataxina* sia coinvolta nella riparazione del DNA e in varie fasi nella regolazione della trascrizione dell'RNA, in particolare nella rimozione degli R-loops che si formano tra templati di ssDNA ed RNA nelle regioni ricche di CG da parte della polimerasi2 ed infine è stato dimostrato che *senataxin* abbia un ruolo chiave nella differenziazione neuronale attraverso il la modulazione del pathway del fibroblast growth factor 8 (Fgf8).

Il database di *Drosophila* "Homofila", 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 RNA.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Negli anni precedenti sono state generate linee transgeniche per poter down regolare ed esprimere in modo temporale e spaziale la proteina di *Drosophila* D-setx. Inoltre sono state selezionate e analizzate molecularmente delle linee contenenti elementi p nella regione genomica di D-setx.

Anticorpi specifici contro la proteina di interesse sono stati generati e testati in alcuni stadi di sviluppo di *Drosophila* mostrando un'espressione prevalentemente neuronale. I dati preliminari ottenuti analizzando le linee loss of function (LOF) hanno mostrato difetti nella crescita e morfologia neuronale e nell'espressione di proteine coinvolte nel differenziamento e mantenimento del sistema nervoso. I fenotipi causati dall'assenza della proteina di *Drosophila* d-setx nell'ala sono poi stati utilizzati per la ricerca di nuove interazioni genetiche, in particolare con proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina. Di seguito sono riassunti i risultati ottenuti per lo studio di funzione di D-setx.

Localizzazione cellulare e sub-cellulare:

Nel primo anno di studio sono stati generati due anticorpi contro i seguenti epitopi della proteina di *Drosophila* D-setx: il primo è caratterizzato dalla sequenza aminoacidica DDARKRKVYFNLDRDDVND presente nella parte N-terminale della proteina e il secondo KQKGRRSKSKSPNDH riconosce invece la parte C-terminale di D-senataxina.

I peptidi sintetici e gli anticorpi sono stati generati dalla ditta Davids Biotechnology. I primi esperimenti di immunistochemica per analizzare l'espres-

sione endogena della proteina e testare gli anticorpi generati hanno dato esito negativo. Da un'analisi dell'espressione dei trascritti utilizzando le informazioni contenute nel database di Drosophila (flybase) è emerso D-setx è altamente espressa durante le prime fasi dello stadio embrionale, in particolare durante le fasi iniziali di divisione mitotica. Il livello di espressione diminuisce durante le successive fasi di sviluppo. Durante lo stadio larvale l'espressione risulta essere molto bassa e sembra aumentare durante la fase adulta, in particolar modo nelle femmine. Per quanto riguarda l'espressione tissutale, i livelli dei trascritti di D-setx sembrano aumentare nel sistema nervoso, nell'occhio e nelle ovaie delle femmine sia negli stadi embrionali che negli adulti. Durante la fase embrionale la proteina sembra essere espressa sia a livello nucleare che citoplasmatico a partire dalle primissime fasi di divisione nucleare suggerendo un ruolo importante durante questi processi. Per quanto riguarda l'analisi dell'espressione della proteina tronca inerente all'elemento-p $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$, non essendo presente una buona espressione nei tessuti larvali sono stati allestiti gli esperimenti per l'analisi dell'espressione proteica negli stadi embrionali iniziali e quelli specifici per la formazione del sistema nervoso, mentre per gli adulti l'attenzione sarà rivolta alle ovaie delle femmine.

Generazione di alleli nulli (escissione imprecisa di elementi-p):

Per generare mutanti nulli di D-setx è stata utilizzata la tecnica dell'escissione imprecisa dell'elemento-p $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$. Sono stati generati oltre due mila incroci da cui sono state selezionate 10 linee diverse sulla base di fenotipi di letalità o difetti esterni dei tessuti. Esperimenti di RT-PCR da estratti di RNA da animali adulti di queste linee hanno mostrato che alcune linee contenevano un trascritto parziale di D-setx. Queste linee saranno utilizzate per esperimenti di immuno-istochimica per verificare se questi trascritti producono forme proteiche tronche o invece siano trascritti instabile con assenza di espressione proteica.

Analisi e risultati preliminari dei fenotipi associati a mutazioni loss of function:

Le linee transgeniche UAS-RNAi per il knockdown di D-setx sono state incrociate con diverse linee drivers Gal4 per guidare l'espressione di RNA a doppio filamento e abbassare i livelli di D-setx nell'animale. L'espressione di linee UAS-RNAi (8 linee testate) utilizzando la linea Tubulina-gal4 ha permesso di selezionare due linee da utilizzare per i successivi esperimenti. Queste linee quando espresse nell'intero organismo causano la morte dell'individuo allo stadio di pupa e i pochi escapers che riescono a raggiungere lo stadio

adulto presentano degenerazione della struttura dell'occhio e delle ali, non riescono a volare o saltare e muoiono dopo poche ore. Questo fenotipo è simile a quello riscontrato per le linee selezionate dopo escissione dell'elemento-p per generare mutanti nulli.

Analisi preliminari effettuate su larve al terzo stadio di individui loss of function (UAS-RNAi/tubulin-gal4, $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$, e linee derivate dall'escissione dell'elemento-p $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$, mostrano una riduzione della ramificazione nella giunzione neuromuscolare e una fusione di bottoni sinaptici tra di loro e con l'assone nervoso centrale causando un fenotipo molto difficile da quantificare. Oltre ad un'alterata morfologia, questi animali presentano una mis-localizzazione di proteine neuronali. L'anticorpo HRP utilizzato usualmente in *Drosophila* per marcare le membrane neuronali e quindi poter quantificare forma, area e lunghezza dei motoneuroni sembra avere un'espressione anomala e diffusa anche nel sistema muscolare. Altre proteine importanti nello sviluppo neuronale quali le β -integrina e fasciclinIII hanno lo stesso tipo di espressione riscontrata per l'anticorpo HRP.

Analisi dell'espressione di D-setx nei mutanti loss of function:

Nella prima fase delle analisi dell'espressione di D-setx durante le fasi di sviluppo abbiamo osservato che D-setx è altamente espressa nella varie fasi di sviluppo embrionale e buoni livelli di espressione sono presenti negli adulti a livello del sistema nervoso e degli ovari delle femmine adulte. Da questi dati preliminari intendiamo analizzare gli stessi stadi di sviluppo anche nei mutanti loss of function a nostra disposizione: nel mutante $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$, nelle linee 3, 7, 5 e 41 generate da escissione imprecisa dell'elemento P $W^{1118};Mi \{ ET1 \}CG7504^{MB04533}$.

Inoltre, verranno allestite delle linee di *drosophila* ricombinanti: linee UAS-Mcd8GFP verranno incrociate con drivers specifici per diversi sottotipi neuronali per produrre ricombinanti stabili. Questo permetterà di capire dove sia espressa la proteina D-setx a livello neuronale.

Generazione di Drosophile ricombinanti per lo studio dei sottotipi neuronali:

Il fenotipo dovuto a una mancanza di D-senataxina risulta di difficile quantificazione perciò sono state create delle linee di *drosophila* contenenti drivers neuronali, linee UAS-mc8GFP e l'allele mutante loss of function. Questo ha permesso di esprimere nell'animale mutante una proteina di membrana fusa con la GFP (mcd8GFP) sotto il controllo di promotori neuronali diversi. Tale esperimento renderà più facile l'analisi dei fenotipi associati alla mancanza della proteina perché non serviranno anticorpi per la caratterizzazione del

tessuto neuronale. Le linee mutanti e le linee RNAi per D-setx verranno analizzate per evidenziare fenotipi a carico del tessuto nervoso e non: motoneurone, glia, tessuto muscolare e vari sottotipi di cellule nervose come neuroni dopaminergici, colinergici e dendriti complessi quali quelli di tipo IV. Inoltre la possibilità di regolare negativamente l'espressione di D-setx in modo tessuto specifica ci permetterà di capire la funzione di D-setx a carico di vari organi.

Interattori genetici:

Le linee transgeniche generate per regolare negativamente i trascritti di D-setx sono state testate con diversi drivers e i fenotipi scelti per l'interazione genetica sono quelli a carico dell'ala dell'adulto.

L'espressione di linee UAS-RNAi per D-setx con il drivers MS-Gal4 e PTC-gal4, due linee che esprimono in compartimenti diversi dell'ala, mostrano fenotipi di degenerazione tissutale simili a quelli riscontrati in modulatori trascrizionali (notch, Su(H), espl) e proteine che regolano la cromatina come ASF1. Le linee ricombinanti così ottenute sono state utilizzate per individuare interattori genetici nel metabolismo dell'RNA e della riparazione del DNA e infine nel rimodellamento della cromatina. Le linee ricombinanti UAS-RNAi-D-setx; PTC-gal4 sono linee che permettono di regolare negativamente i trascritti di D-setx nell'ala in modo continuo. Incrociando questi individui a temperatura costante di 28°C (per mantenere un'espressione alta del transgene UAS-RNAi) con individui mutanti coinvolti in diversi pathway biologici sono stati osservati interazioni con i seguenti alleli mutanti: Lid¹⁰⁴²⁴; Lidk⁰⁶⁸⁰¹; Vtdl⁴, ASF1; Rpd3; Sin3A; OSA².

ATTIVITÀ PREVISTE

Il proseguimento di questo progetto si propone di generare e analizzare drosophile transgeniche per l'espressione della proteina umana SETX wild type e per la proteina umana contenente mutazioni patologiche. Questo permetterà analizzare in vivo le conseguenze dell'espressione delle mutazioni patologiche in presenza o assenza della proteina endogena e quindi di capire quale siano i meccanismi tramite i quali si sviluppa la degenerativa assonale associata alla Sclerosi Amiotrofica Laterale tipo 4. Analisi sui fenotipi generati dalle linee LOF e GOF verranno approfonditi e rielaborati in relazione ai dati ottenuti dall'espressione delle mutazioni patologiche.

Generazione di linee transgeniche di H-setx:

Grazie alla collaborazione con la Dr.ssa Mariateresa Bassi utilizzeremo i plasmidi generati nel suo laboratorio contenenti il gene umano setx wild type

nonché i plasmidi contenenti mutazioni puntiformi patologiche (T3I, L389S, R2136H) per generare linee transgeniche di *Drosophila*. I cDNA di setx umana wild type e le sue forme mutate saranno clonati in vettori appositi e il DNA plasmidico così ottenuto sarà microiniettato in embrioni di *Drosophila*. Una volta ottenute le linee transgeniche queste saranno selezionate in base al livello di espressione che riusciremo a ottenere negli individui. I fenotipi delle mutazioni saranno analizzate sia in animali controllo in cui è presente la proteina endogena di *Drosophila* sia in animali in cui è assente. In questo modo potremo analizzare selettivamente i difetti prodotti dalle mutazioni patologiche senza l'interferenza della proteina endogena. Questo tipo di approccio permetterà di ottenere informazioni indispensabili sia sulla localizzazione delle forme difettose di setx sia sul meccanismo patogenetico legato alla malattia.

Analisi dei fenotipi:

Le linee transgeniche sopra menzionate verranno espresse sia con drivers ubiquitari sia con drivers specifici per il tessuto neuronale, con particolare attenzione ai tessuti gliali e alle strutture dendritiche. I fenotipi dovuti ad un abbassamento dell'espressione della proteina mediante RNAi o dovuti alla linea mutante $W^{1118}; Mi \{ET1\}CG7504^{MB04533}$ che presenta una forma tronca della proteina D-setx saranno comparati con i fenotipi ottenuti dall'espressione delle mutazioni patologiche. Questo permetterà di capire se le mutazione agiscono con un meccanismo loss of function, gain of function o se invece creino un'interferenza negativa con la proteina endogena tale da bloccarne la normale funzione. L'analisi dei fenotipi ottenuti dalla modulazione dell'espressione proteica riguarderanno la valutazione di letalità, fenotipi morfologici grossolani a carico di diversi organi e tessuti, problemi di locomozione, caratterizzazione di fenotipi a carico dei motoneuroni e del sistema dendritico, caratterizzazione cellulare di disfunzioni a carico di altre proteine, identificazione di altri geni coinvolti nel processo di degenerazione legato a senataxin. Le tecniche per questo tipo di analisi e che il laboratorio metterà a disposizione sono le seguenti: immuno-istochimica e immuno-citochimica, microscopia elettronica e confocale, interazione genetica, tecniche biochimiche e genetico-molecolari e tecniche di biologia cellulare.

Inoltre visti i dati genetici ottenuti nel precedente anno saranno analizzati i pathway che coinvolgono i complessi di rimodellamento della cromatina ed importanti nelle prime fasi della trascrizione genica: Lid, Vtdl⁴, ASF, Rpd3, Sin3A; OSA. Queste proteine saranno analizzate in dettaglio sia in alleli loss of function di D-setx sia in animali che esprimono forme patologiche della proteina umana.

MATERIALI E METODI

- Sistema binario UAS-GA4 per l'espressione in vivo: per esprimere i costrutti UAS in vivo sono state utilizzate linee "driver" GAL4 che permettono l'espressione tessuto-specifica: linee UAS sono state incrociate a linee drivers per l'espressione ubiquitaria (tubulina-gal4) sistema nervoso (elav-gal4), motoneurone (D42-gal4), glia (Repo-gal4), tessuto muscolare (Mef-gal4), e vari sottotipi di cellule nervose come neuroni dopaminergici (TH-gal4), colinergici Cha-gal4) e dendriti complessi quali quelli di tipo IV (ppk-gal4). Linee UAS utilizzate: UAS-mcd8 GFP, UAS-H2AV22 GFP, UAS-GALT GFP.
- Immunoistochimica su larve: larve al terzo stadio larvale sono state dissezionate in soluzione salina e fissate al 4% di paraformaldeide. Gli anticorpi primari sono stati incubati overnight a 4° mentre gli anticorpi secondari a temperatura ambiente per 2h.
- Immunoistochimica su embrioni: ceppi di drosophile adulte (wild type o mutanti) saranno fatti deporre overnight in apposite piastre da deposizione, raccolti, decorionati e fissati utilizzando metanolo e formaldeide al 4%. Gli embrioni così processati sono stati lavati e posti in soluzioni contenenti PBS, albumina al 0,02% e TritonX-100 0,3% e gli anticorpi primari. Gli anticorpi utilizzati in questi esperimenti sono i seguenti: HRP, DLG, CSP, Sinaptotagmin, H3P, H2Av, H3k, neutotactin, neuroglian, propidio ioduro.
- Tecniche di microscopia confocale sono state utilizzate per analisi della proteina endogena e per identificare fenotipi neuronali legati alla manipolazione dei livelli di proteina. I dati sono stati analizzati e quantificati con diversi programmi informatici di imaging: NIH imagej software; amira (ricostruzione 3D); Volocity quantificazione e analisi di immagini confocali.
- Linee di Drosophila selezionate dallo stock center Bloomington da utilizzare per le interazioni genetiche: muazioni legate al rimodellamento della cromatina: Lid¹⁰⁴²⁴; Lid^{k06801}; Vtdl⁴, ASF1; Rpd3; Sin3A; OSA².

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

2012

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 asso-

ciazione 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 dovrebbero permettere di determinare quale sia il meccanismo patogenetico alla base di CMT2A.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso del primo anno della ricerca abbiamo realizzato alcuni degli obiettivi previsti dal progetto di ricerca. La proteina di fusione GST-Marf è stata prodotta ed un anticorpo generato e purificato per affinità. L'anticorpo è stato utilizzato per verificare il riconoscimento della proteina in vivo in *Drosophila* gli esperimenti di immunofluorescenza condotti a questo scopo hanno indicato che pur riconoscendo i mitocondri, l'anticorpo da luogo anche ad un forte segnale di background che lo rende inadatto ai nostri scopi. Abbiamo inoltre caratterizzato con successo il fenotipo dovuto al knockdown di Marf e verificato che la sua perdita di funzione da origine a frammentazione mitocondriale. Infine sono state generate linee transgeniche di *drosophila* che consentono la sovra espressione sia di Marf che delle mitofusine umane 1 e 2.

Questi reagenti importanti sono stati indispensabili alla prosecuzione del progetto ed hanno consentito di stabilire che la mitofusina umana 2, ma non la mitofusina umana 1, è in grado di sopprimere il fenotipo dovuto all'assenza di Marf, dimostrando quindi che la mitofusina umana 2 e l'unica mitofusina di *Drosophila* sono intercambiabili. Questo suggerisce che la mitofusina 2 umana rappresenta la proteina ancestrale di questa famiglia nell'uomo. Inoltre abbiamo comprovato che l'espressione di Marf in cellule che non possiedono l'una o l'altra mitofusina umana produce una rescue completa della frammentazione mitocondriale in queste cellule. Anche questa osservazione è in linea con la conclusione che Marf costituisca una proteina ancestrale e che sostanzialmente combini in sé le funzioni che nell'uomo sono svolte dalla sinergia tra le due mitofusine. Inoltre abbiamo osservato che la deplezione di Marf in *Drosophila* con la metodologia del RNA interference risulta nella quasi totale assenza di mitocondri dalla sinapsi neuromuscolare. Questa osservazione potrebbe indicare che l'assenza di mitocondri a livello della sinapsi neuromuscolare potrebbe essere un fattore importante nell'insorgenza della patologia di Charcot-Marie-Tooth.

Abbiamo anche intrapreso il lungo percorso che ci porterà il mutante gene-

tico nullo di Marf che ci consentirà di ottenere successivamente un modello di patologia umana. L'ottenimento del mutante genetico per il gene Marf è previsto per il 2012.

Il lavoro è proseguito con l'analisi della motilità mitocondriale e la densità mitocondriale lungo l'assone motore in vivo in *Drosophila*. Il numero dei mitocondri stazionari nell'assone degli individui in cui l'espressione di Marf è stata ridotta grazie alla tecnica dell'RNA interference, risulta significativamente maggiore che negli individui di controllo. Negli stessi individui le velocità di movimento dei mitocondri risultano essere notevolmente inferiori rispetto ai controlli. Inoltre la densità mitocondriale lungo l'assone mostra un gradiente prossimo-distale che non è riscontrabile nei controlli. Questa rarefazione distale dei mitocondri è in accordo con l'osservazione che i mitocondri sono pressoché assenti nella terminazione neuromuscolare. Questi risultati nel loro insieme suggeriscono che il meccanismo patogenetico alla base di CMT2A potrebbe essere legato a difetti di distribuzione mitocondriale negli assoni.

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso di quest'anno la continuazione del progetto prevede essenzialmente due obiettivi principali:

1. La comprensione del meccanismo che determina i difetti di distribuzione mitocondriale prima descritti.
2. La dimostrazione in vitro che Marf è capace di fondere le membrane liposomiali in cui è stato incorporato

1. La comprensione del meccanismo che determina i difetti di distribuzione mitocondriale prima descritti.

È noto che l'assenza di mitofusina causa frammentazione mitocondriale perché la normale funzione della proteina è quella di fondere le membrane mitocondriali tra loro. Per capire come un difetto di fusione di membrane possa riflettersi in un difetto di distribuzione dei mitocondri all'interno dell'assone verificheremo le seguenti ipotesi. La prima ipotesi è che difetti di fusione possano produrre una deficienza respiratoria che a sua volta è la causa del mancato arrivo dei mitocondri alla sinapsi neuromuscolare o, in alternativa, di un più efficiente ritorno dei mitocondri con difetti respiratori al corpo cellulare per essere distrutti da processi autofagici. Per analizzare questa ipotesi abbiamo tutti reagenti genetici e biochimici necessari. Paragoneremo il comportamento dei mitocondri assonali in mutanti per un componente del complesso I che quindi sono sicuramente portatori di difetti respiratori e mutanti della protei-

na mitocondriale fusogenica OPA1 per stabilire se e quale di questi mutanti si comporti come la deplezione di Marf. Inoltre, sfrutteremo mutazioni nelle proteine kinesina, responsabile del movimento anterogrado dei mitocondri, e dineina, coinvolta nel movimento retrogrado per determinare dove avvenga il blocco mitocondriale in assenza di mitofusina. Infine, utilizzando marcatori per l'autofagia in vivo stabiliremo se nei mutanti Marf vi sia un'accresciuta distruzione mitocondriale che possa rendere conto del diminuito numero di mitocondri assonali e giunzionali.

2. La dimostrazione in vitro che Marf è capace di fondere le membrane liposomiali in cui è stato incorporato

Nonostante sia generalmente accettato che la funzione della mitofusina sia quella di fondere le membrane del network mitocondriale, nessuno ha mai dimostrato questa funzione utilizzando saggi in vitro. Non è quindi chiaro se la mitofusina sia autonomamente capace di eseguire questa funzione. Avvantaggiandoci della grande esperienza acquisita con il lavoro sull'atlastina, produrremo Marf in vitro e proveremo a verificarne l'abilità di fondere le membrane in vitro sfruttando lo stesso saggio di fusione di liposomi che abbiamo sviluppato per l'atlastina. Se questo tentativo dovesse avere successo potremmo così studiare da un punto di vista meccanicistico l'effetto delle mutazioni patologiche sulla precisa funzione in vitro della mitofusina per approfondire le conoscenze del meccanismo patologico di CMT2A.

RUOLO DEL GENE BRIP1 (FANCJ) 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

2012

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 Bloom, caratterizzata da aumentata predisposizione al cancro.

Il gene BRIP1 è un membro della famiglia DEAH di DNA elicasi. Mutazioni di BRIP1, altresì denominato FANCJ, sono associate a una forma recessiva 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 studiare il coinvolgimento di BRIP1 nella destabilizzazione di specifiche sequenze G-quadruplex nel genoma umano.

A livello cellulare le caratteristiche distintive e diagnostiche della anemia di Fanconi sono l'instabilità cromosomica e la sensibilità cellulare ad agenti che causano un legame covalente delle due eliche del DNA (detto DNA inter-strand crosslink, ICL) quali la mitomicina C, il diepossibutano ed il cisplatino (ampiamente usati in chemioterapia). In seguito ad esposizione a questi agenti genotossici, cellule derivanti da pazienti FA mostrano un aumento di aberrazioni cromosomiche, quali rotture e fusioni di cromosomi. Ci sono almeno 13 distinti gruppi di complementazione FA, i cui geni corrispondenti sono stati identificati.

Le cellule FA esposte ad agenti alchilanti bifunzionali, come la mitomicina-c, mostrano, già dopo una concentrazione tale da indurre danni minimi alle cellule normali, numerose aberrazioni cromosomiche dello stesso tipo di quelle che si osservano spontaneamente; se tali lesioni non vengono riparate si può avere un blocco della trascrizione e della replicazione con conseguente morte cellulare. Sia i procarioti che gli eucarioti hanno la capacità di riparare i danni causati da mitomicina-c.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Sono state utilizzate linee linfoblastoidi e colture di fibroblasti di pazienti con sindrome di Bloom, anemia di Fanconi e sindrome di Werner al fine di individuare rotture cromosomiche in particolari sequenze con conformazione G-quadruplex associate a riarrangiamenti costituzionali del genoma umano. Il metodo permette di analizzare la frequenza di una singola delezione o traslocazione nelle diverse linee e in condizioni di coltura modificate. Sono state testate due traslocazioni ricorrenti t(11;22) e t(8,22) e una delezione terminale ricorrente 22q13. Tali traslocazioni ricorrenti sarebbero mediate da sequenze palindrome invertite che rappresentano porzioni di genoma instabili in cui i filamenti di DNA sono più propensi ad assumere conformazioni tali da causare rotture a doppio filamento. Nel caso di delezione è possibile che la rottura sia successivamente riparata attraverso 'telomere healing' o 'telomere capture' quindi con l'aggiunta di un nuovo cap telomerico.

Il primo pathway è conosciuto come "telomere healing" e consiste nella stabilizzazione del cromosoma delecto attraverso l'addizione diretta, all'estremità generata dalla rottura, di ripetizioni telomeriche (TTAGGG)_n da parte della Telomerasi, una DNA polimerasi RNA-dipendente.

Il secondo pathway è stato definito "telomere capture" ed è un processo attraverso il quale un cromosoma con delezione terminale acquisisce una nuova sequenza telomerica, copiata da un altro cromosoma. Delezioni ricorrenti terminali de novo 22q13, riparate mediante "telomere healing", sarebbero mediate da una sequenza ripetuta diretta con un elevato potenziale di formare una struttura G-quadruplex.

Linee cellulari

Le seguenti linee cellulari sono state donate o comperate dal Coriell Institute for Medical Research. Vengono riportati i dati contenuti nelle schede allegate alle linee.

GM03498 Fibroblasti

Sindrome di Bloom. Il donatore è un eterozigote composto: un allele ha una delezione di 6 basi / inserzione di 7 basi [2281_2286delins7] al nucleotide 2281 della cornice di lettura del gene RECQL3 che risulta in un cambio di fase e un codone di stop, mentre il secondo allele ha una delezione di 1 base al nucleotide 3233 [3233delT] del gene RECQL3 che risulta in un cambio di fase e terminazione prematura.

GM04408 B- Linfociti

Stesso soggetto dei fibroblasti GM03498

GM16633 Fibroblasti

Anemia di Fanconi, gruppo di complementazione D2. Il soggetto donatore

è un eterozigote composto: un allele ha una transizione A>G al nucleotide 376 del gene FANCD2 [376A>G] che risulta in una sostituzione di glicina con serina al codone 126 e in uno splicing anomalo e nell'inserzione di 13 basi dall'introne 5 nel mRNA mediante l'utilizzo di un sito di splicing criptico [Ser-126Gly (S126G) and 13-bp INS], e un secondo allele ha una transizione G>A al nucleotide 3707 del gene FANCD2 [3707G>A] che risulta nella sostituzione di una istidina per un'arginina al codone 1236 [Arg1236His (R1236H)].

GM16756 B-Linfociti

Stesso soggetto dei fibroblasti GM16633

AG03141 Fibroblasti

Sindrome di Werner. Omozigote per una transizione C>T al nucleotide 2476 nel gene WRN [2476C>T], risultante in un codone di stop a 748 [Gln748Ter (Q748X)].

AG0656 B- Linfociti

EUFA 0030 F Fibroblasti

Fibroblasti da un paziente con anemia di Fanconi, gruppo di complementazione J (FANCI) e mutazione nel gene *BRIP1*.

Condizioni di coltura

Le cellule delle linee linfoblastoidi sono state coltivate in terreno RPMI (con L-glutammina) addizionato di siero fetale di bovino (FBS) al 20%, con aggiunta di penicillina 100U/ml e streptomina 100mg/ml, mantenute in incubatore a 37°C, 95% di umidità. e con il 5% di CO₂; i fibroblasti sono stati tenuti in coltura con terreno DMEM (Dulbecco's minimal essential medium) addizionato di FBS al 10%, glutammina 200mM, penicillina 100U/ml e streptomina 100mg/ml e mantenute in incubatore a 37°C e con il 5% di CO₂. Una volta raggiunta confluenza di crescita è stato estratto il DNA genomico con metodiche standard e quantificato su Nanodrop N1000.

Amplificazione e rilevamento (PCR)

100 ng di DNA sono stati utilizzati per l'amplificazione dei punti di rottura delle traslocazioni ricorrenti t(11;22) e t(8,22). Il metodo è basato sull'utilizzo di due brevi DNA primers complementari alle sequenze che si trovano agli estremi della traslocazione in esame, la regione fra i primers è duplicata usando una DNA polimerasi batterica termostabile Jump Start Red Accutag DNA Polymerase (Sigma, St Louis, MO) utilizzando un termociclatore Perkin Elmer 9700. Dopo una prima fase di denaturazione del campione a 94°C, segue appaiamento dei primers a 58°C per 30 secondi e quindi l'allungamento per 1 minuto a 60°C, ripetuto per 5 cicli; seguono poi altri 35 cicli con appaiamento a 56°C.

Il prodotto della prima amplificazione viene a sua volta riamplicato con primers che ibridano a una regione compresa all'interno del precedente amplificato (nested PCR) al fine di aumentare la sensibilità del metodo; dopo 30 cicli di amplificazione, un campione della sequenza viene sottoposto a elettroforesi su gel di agaroso 1,5% e visualizzato su un transilluminatore a UV. La stessa metodica di nested PCR è stata utilizzata per amplificare la regione contenente il punto di rottura della delezione ricorrente 22q13; in seguito a delezione di un cromosoma si attivano meccanismi di riparazione, in modo che l'estremità generata dalla rottura non sia esposta all'azione di nucleasi o a fusioni coda-coda e, con elevata frequenza, al cromosoma delemo viene legata una sequenza telomerica, riconoscibile dalla tipica ripetizione (TTAGGG)_n. Sono stati amplificati 100 ng di ogni campione, utilizzando due primer consecutivi complementari alla sequenza che si trova all'estremità della delezione e altri due primer complementari alla sequenza ripetuta telomerica.

La stessa analisi mediante PCR è stata condotta su DNA estratto dalle linee linfoblastoidi e dai fibroblasti dopo il trattamento con mitomicina-c. Il possibile arresto della replicazione e/o trascrizione del DNA potrebbe rappresentare un elemento di riconoscimento per eventuali sistemi di riparazione; il riconoscimento del blocco della replicazione o trascrizione potrebbe portare all'arresto del ciclo cellulare e permettere alla cellula di riparare o, nel caso di riparazione inefficiente, si potrebbe innescare un meccanismo di morte cellulare.

Trattamento con mitomicina-c

Le colture cellulari vengono portate ad una confluenza di crescita dell'80-90%, incubate per 2,5-3 ore con mitomicina-c ad una concentrazione di 10 µg/ml. Dopo il trattamento seguono due lavaggi in PBS e quindi nuovamente l'aggiunta di terreno di coltura fresco e le cellule vengono lasciate crescere per 6-7 giorni in incubatore a 37°C. Le cellule vengono poi pellettate e il DNA genomico estratto con metodiche standard.

L'analisi è stata condotta su aliquote di 100 ng di DNA per ogni linea cellulare non trattata. Sono inoltre stati analizzati DNA di un gruppo di linee linfoblastoidi di soggetti normali, da fibroblasti di soggetti controllo, e DNA estratti da spermatozoi di soggetti donatori anonimi. Per ognuno dei riarrangiamenti esaminati, abbiamo utilizzato DNA da un soggetto portatore costitutivamente del riarrangiamento come controllo positivo.

Le metodiche di amplificazione sono state ottimizzate per permettere un'amplificazione selettiva ottimale del prodotto specifico, evitando amplificazioni aspecifiche che potrebbero complicare l'analisi degli esperimenti.

In seguito, si è proceduto all'analisi della diluizione più elevata a cui DNA

contenente il riarrangiamento poteva essere rilevato mischiato con DNA di controllo, effettuando l'amplificazione di campioni contenenti diluizioni seriali di DNA del controllo positivo (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000, niente DNA) aggiunte a 100 ng di DNA di un controllo negativo. Per la traslocazione t(11;22) questa diluizione è risultata essere 1:100, mentre per la t(8;22) e la delezione terminale 22q13 era ancora possibile rilevare un prodotto di amplificazione mediante visualizzazione su gel di agaroso a diluizioni 1:1000.

Non è stata riscontrata alcuna specifica variazione della frequenza di alcuno dei riarrangiamenti analizzati nelle linee linfoblastoidi o nei fibroblasti di pazienti con sindrome di Bloom, Werner o Fanconi rispetto alle linee linfoblastoidi e ai fibroblasti di controllo.

La frequenza delle traslocazioni t(8;22) e t(11;22) risulta essere significativamente più elevata della frequenza della delezione 22q13 in tutti i campioni analizzati.

Rimangono da effettuare analisi mediante Southern blot sui campioni finora analizzati soltanto mediante visualizzazione su gel di agaroso. Rimangono inoltre da analizzare i DNA da linee trattate con mitomicina-c, in cui sono attese frequenze molto più elevate di riarrangiamento.

ATTIVITÀ PREVISTE

I metodi fino ad ora utilizzabili per il mappaggio delle rotture del DNA non permettevano l'analisi globale del genoma. Solo in questo ultimo anno sono state sviluppate tecniche che si avvalgono delle metodiche di sequenziamento di seconda generazione (next-generation sequencing, NGS) per visualizzare siti sensibili alla rottura su scala genomica.

Ci proponiamo di utilizzare queste metodiche per esaminare la varietà strutturale e la posizione genomica dei punti di rottura generati da agenti mutageni e non riparati in linee cellulari mutate nei geni del pathway di riparazione dei danni da rotture cromosomiche.

Brevemente, ci proponiamo di trattare le linee in coltura con un mutageno, come la mitomicina, e fissare le cellule trattate con un fissativo che non causa danni al DNA. Tratteremo poi i nuclei fissati permeabilizzati con Terminal deoxynucleotide Transferasi (TdT) e biotina-11-dUTP per marcare i punti di rottura. Il DNA marcato verrà ridotto a dimensioni compatibili con il sequenziamento NGS tramite nebulizzazione, selezionato mediante immunoprecipitazione e analizzato su un sequenziatore NGS in grado di esaminare 4-12 milioni di frammenti in una singola corsa.

L'analisi bioinformatica dei risultati permetterà di determinare la posizione

di ogni frammento, di verificare la presenza di cluster di breakpoint in determinate regioni cromosomiche, indice della presenza di regioni sensibili (hotspot), di valutare l'esistenza di motivi conservati a livello della sequenza del DNA a livello dei breakpoint.

e-RAR: ROBOTIC AIDED REHABILITATION**ING. GIANLUIGI RENI**

E-MAIL: GIANLUIGI.RENI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 6

Bioingegneria

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Linea di ricerca 2 "Riabilitazione Neuromotoria"
 Scuola Superiore "S. Anna" di Pontedera
 Politecnico di Milano

DESCRIZIONE*Abstract*

La robotica, una nuova frontiera tecnologica per la riabilitazione, aumenta le possibilità di trattamento del paziente e contestualmente rende sempre più fattibile una deospedalizzazione, a vantaggio di terapie domiciliari eseguite anche senza la presenza fisica di uno specialista.

Lo stato dell'arte della robotica (branca dell'ingegneria che coniuga svariate discipline) mette a disposizione strumenti tecnici impensabili solo pochi anni orsono: per esempio piccoli robot antropomorfi potrebbero costituire utili guide nell'esercizio a domicilio, specie quando si operi con soggetti in età pediatrica; per quanto concerne la sensoristica dispositivi commercialmente disponibili quali il Kinect permettono di percepire il movimento di articolazioni umane all'interno di uno spazio tridimensionale, con buona precisione e senza costringere il paziente ad indossare dei marker e ad utilizzare un sistema optoelettronico; device ludici comunemente utilizzati per videogiochi come il Nintendo WiiMotionPlus e la pedana stabilometrica WiiFit possono fornire informazioni circa movimenti veloci, la distribuzione del carico del paziente, e così via. I dati forniti da questi dispositivi possono poi essere integrati da ulteriori informazioni provenienti da oggetti progettati ad hoc, al fine di guidare o monitorare specifici esercizi.

La robotica costituisce un supporto ideale anche per interagire attivamente

con il paziente grazie a numerose tecnologie di movimentazione: motori elettrici tradizionali o pneumatici, leghe metalliche a memoria di forma, dispositivi piezoelettrici.

Nel presente progetto di ricerca si esaminerà lo stato dell'arte nel campo delle tecnologie riabilitative robotizzate, si individueranno le tecnologie più promettenti per un loro successivo impiego clinico, si svilupperanno sistemi innovativi basati su tecnologia robotica che facilitino l'esecuzione di protocolli riabilitativi eseguiti da pazienti e ne monitorino i risultati.

Descrizione del progetto

Negli ultimi anni è cresciuto l'impiego di dispositivi tecnologicamente avanzati in ambito riabilitativo: questi strumenti, oltre al più immediato utilizzo in fase di recupero funzionale durante il percorso riabilitativo, trovano applicabilità anche come ausili da utilizzare durante le attività di vita quotidiana.

Tra le tecnologie innovative, il settore della robotica e quello della realtà virtuale hanno prodotto strumenti, già commercializzati, che possono trovare applicazione nel trattamento di importanti disabilità motorie o cognitive, quali ad esempio le cerebrolesioni congenite o acquisite. L'utilizzo di dispositivi robotizzati consente in molte situazioni di poter anticipare l'intervento riabilitativo iniziando il trattamento quando la severità del deficit coincide con scarse quote motorie residue, permette di aumentare l'intensità del trattamento in termini di ripetizioni dell'esercizio e di durata di ogni singola sessione, permette di somministrare esercizi sempre uguali e finalizzati al recupero di atti motori specifici, riduce il carico di lavoro del fisioterapista che ha in carico il paziente e consente di registrare parametri e dati durante l'esecuzione dell'esercizio. In aggiunta, l'integrazione di devices robotizzati con tecnologie in grado di creare ambienti interattivi che coinvolgono il paziente in attività che simulano quelle del mondo reale offre innanzitutto la possibilità di proporre l'attività riabilitativa sotto una veste ludica in grado di aumentare la motivazione e il coinvolgimento della persona in trattamento, aspetto particolarmente interessante per l'ambito pediatrico, e consente inoltre di proporre esercizi diversificati altamente motivanti e coinvolgenti a seconda delle capacità e potenzialità di ciascun utilizzatore, rendendo possibile la misura e il costante monitoraggio delle prestazioni.

Rispetto alle terapie riabilitative convenzionali, le sopracitate caratteristiche dei devices robotizzati integrati con realtà virtuale sembrano tradursi in una potenziale maggiore efficacia e maggiore precisione nella guida del processo di recupero della funzionalità motoria e in una risposta muscolare migliore. Fra gli innovativi approcci riabilitativi per il recupero delle funzioni motorie sono stati sviluppati e sono ora disponibili in commercio numerosi disposi-

tivi robotizzati specificatamente dedicati alla rieducazione del cammino e al recupero della funzionalità motoria dell'arto superiore. Questi dispositivi si differenziano tra di loro principalmente per le soluzioni tecnologiche di costruzione, offrendo quindi una vasta gamma di strumenti riabilitativi che, a seconda della loro complessità specifica, possono essere applicati esclusivamente all'interno di una struttura sanitaria riabilitativa necessitando della presenza di operatori specializzati, oppure possono essere destinati ad una riabilitazione domiciliare.

In aggiunta ai dispositivi robotizzati, oggetti commerciali abitualmente noti per il loro aspetto ludico e di intrattenimento, quali ad esempio il Kinect, il Nintendo WiiMotionPlus e la pedana stabilometrica WiiFit presentano interessanti caratteristiche che ben si presterebbero all'utilizzo in ambito riabilitativo domiciliarizzato.

Partendo dai sopracitati presupposti, lo scopo del presente progetto è quello di individuare tra le tecnologie presenti sul mercato quei dispositivi che offrono peculiarità sfruttabili e utili per un impiego in ambito clinico/riabilitativo e, da questi, realizzare dei nuovi devices modificando parti hardware e/o software e sviluppando applicazioni specifiche. In particolare si cercherà di realizzare dei dispositivi innovativi che siano tecnicamente affidabili e che presentino prestazioni elevate mantenendo semplicità ed immediatezza di utilizzo da parte dell'utente finale. I dispositivi sviluppati dovranno consentire contemporaneamente la somministrazione del trattamento riabilitativo e la misurazione di indici clinici utili per la verifica della bontà del trattamento nel tempo. Inoltre, per aumentare il coinvolgimento da parte dell'utente durante l'esecuzione dell'esercizio, sarà necessario provvedere ad un sistema di feedback (visivo, acustico, percettivo,..) che fornisca in tempo reale indicazioni sulla bontà dell'esecuzione e che consenta all'utente di effettuare delle correzioni immediate nel proprio agire. Sarà inoltre necessario predisporre dei componenti per lo storage di dati e/o delle modalità wi-fi per inviare i dati a unità di analisi e di salvataggio.

ATTIVITÀ PREVISTE

Inizialmente verrà effettuata un'attenta disamina della letteratura al fine di individuare lo stato di avanzamento dell'utilizzo di dispositivi robotizzati in ambito riabilitativo, prefigurandosi gli scenari riabilitativi in cui meglio sembrano potersi inserire i suddetti dispositivi. Verranno presi in considerazione dispositivi che possano in futuro essere inseriti in percorsi riabilitativi finalizzati ad esempio al miglioramento/mantenimento della postura e dell'equilibrio, al recupero/miglioramento/mantenimento della deambulazione o della

funzionalità motoria di un singolo arto o di una specifica articolazione corporea. A questo proposito potrebbero essere utilizzati come punto di partenza strumenti commerciali quali la Wii-Balance e il Kinect, che, opportunamente potenziati e modificati nella parte hardware e in quella software, potrebbero essere inseriti in un percorso riabilitativo personalizzato sia dal punto di vista della proposta di nuovi esercizi riabilitativi più motivanti e stimolanti rispetto a quelli tradizionali, sia dal punto di vista della valutazione strumentale domiciliare dei progressi del paziente durante il trattamento. In particolare potranno ad esempio essere ulteriormente sviluppate delle solette sensorizzate per la misura del carico esercitato in punti specifici della superficie plantare, in modo da poter valutare se durante la deambulazione il pattern di cammino è fisiologico e simmetrico. Per l'arto superiore, invece, potrebbero essere utilizzati dei wearable device che, opportunamente posizionati, potrebbero misurare il range articolare e la velocità di esecuzione di uno specifico movimento. Una volta realizzati i prototipi, sono previste delle serie di test di laboratorio per valutarne alcune prestazioni quali affidabilità, robustezza, precisione e ripetibilità delle misure effettuabili dai dispositivi.

APPROCCIO INTEGRATO (GENETICA DI POPOLAZIONE E NEXT GENERATION SEQUENCING) PER L'IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI FUNZIONALI CON EFFETTO PATOLOGICO

DR.SSA MANUELA SIRONI

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

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: U.O. Neuroriabilitazione 3

IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano

IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don C. Gnocchi di Milano

Università di Milano: Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche LITA

Segrate

Ospedale "Luigi Sacco" di Milano

DESCRIZIONE

Allo stato attuale sono stati individuati milioni di varianti polimorfiche che segregano nelle popolazioni umane. La grande maggioranza di tali varianti non ha effetto funzionale e non è sottoposta a processi di selezione naturale. Tuttavia, alcune varianti rare (con frequenza $<1\%$) o comuni (con frequenza $>1\%$) hanno un effetto sul prodotto proteico o sulla regolazione di uno o più geni. Tra queste, alcune varianti rappresentano alleli di suscettibilità per malattie comuni o per tratti fenotipici complessi.

Gli studi di associazione genome-wide hanno identificato numerose varianti di suscettibilità per diversi fenotipi complessi, ma, nella grande maggioranza dei casi, i polimorfismi identificati spiegano solo una piccola parte della ereditabilità di tali tratti. Inoltre, questi studi sono adatti solo all'identificazione di varianti comuni. Ne consegue che numerose varianti che influenzano tratti complessi rimangono, ad oggi, ignote.

Durante gli ultimi 4 anni, il laboratorio di Bioinformatica ha applicato un approccio innovativo che prevede l'utilizzo di strumenti di genetica di popolazione per identificare varianti che sono state sottoposte 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 risposta infiammatoria, nella regolazione metabolica. Abbiamo inoltre studiato i geni coinvolti nella risposta immune e nell’autoimmunità, in quanto si ritiene che le malattie infettive abbiano rappresentato la principale pressione selettiva per le popolazioni umane. Il progetto che proponiamo rappresenta, quindi, la naturale prosecuzione del progetto di RC iniziato nel 2009 e conclusosi con l’anno in corso. In particolare, ci proponiamo di ampliare le analisi di genetica di popolazione ad un vasto numero di geni coinvolti nei pathways sopraccitati. Questo sarà reso possibile dalla imminente acquisizione di un sequenziatore di nuova generazione (NGS). Le varianti candidate identificate attraverso questa analisi verranno analizzate attraverso approcci caso/controllo o TDT e ne verrà valutato l’effetto patologico su fenotipi quali: ictus giovanile (geni coinvolti nella regolazione della pressione arteriosa, nel pathway della coagulazione e fibrinolisi, geni coinvolti nella risposta infiammatoria) e malattie autoimmuni (geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria). Inoltre, metteremo a punto analisi pilota che utilizzino NGS per risequenziare interamente geni candidati in un assetto caso-controllo al fine di identificare varianti RARE di predisposizione a malattia (es intero complemento dei geni per gli interferoni in uno studio caso/controllo per sclerosi multipla). Infine, dati recenti indicano come fenotipi un tempo ritenuti complessi si trasmettano in realtà come tratti mendeliani, determinati, cioè, dalla presenza di mutazioni altamente penetranti in uno o pochi geni che interagiscono con fattori ambientali. Un esempio è rappresentato dalle encefaliti erpetiche, causate da mutazioni dominanti o recessive in geni del pathway di TLR3 (recettore toll-like 3). Mutazioni in TLR3 sono anche state associate a encefaliti insorte in seguito a influenza. Non è noto se mutazioni in tali geni possano rappresentare fattori di rischio per encefaliti causate da altri agenti virali (o in cui la patogenesi sia verosimilmente di origine virale, sebbene non sia stato identificato l’agente causativo). Ci proponiamo quindi di studiare il pattern di variabilità genetica di tali geni (includendo anche i pathway di TLR7, 8 e 9) in soggetti colpiti da encefalite di supposta origine virale reclutati presso il nostro Istituto (NR3) o presso altri presidi (Policlinico di Milano, Ospedale Sacco, Fondazione Don C. Gnocchi) al fine di identificare putative varianti patologiche che rendano i soggetti suscettibili ad agenti normalmente associati a patologie lievi.

L'analisi genetica sarà affiancata da un'analisi immunologica dell'induzione dei pathways di TLR3, 7, 8 e 9 effettuata su linfociti derivati di pazienti colpiti da encefalite.

ATTIVITÀ PREVISTE

Genetica di popolazione e sequenziamento Sanger

L'analisi di genetica di popolazione sarà svolta in due fasi successive:

1. Uso di dati a bassa copertura derivanti dal Progetto 1000 Genomi (<http://browser.1000genomes.org/>).
2. Le regioni candidate identificate al punto 1 verranno risequenziate (metodo Sanger) in 60 individui HapMap (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) appartenenti ai 3 principali gruppi etnici. Le tracce selettive verranno verificate attraverso l'applicazione di ulteriori test di genetica di popolazione.

Le due fasi sono sotto descritte.

1) Il Laboratorio di Bioinformatica dell'IRCCS E. Medea ha costruito un database che consente di analizzare i dati genetici ottenuti dal progetto 1000 Genomi. È stato messo a punto un database MySQL che contiene i dati relativi al sequenziamento a bassa copertura dell'intero genoma di 178 individui. Il database consente di mantenere i dati su server localizzati nel laboratorio di Bioinformatica e di aggiornare tali dati con le release successive del Progetto 1000 Genomi. Inoltre sono stati sviluppati pacchetti specifici di programmi in C++ usando le librerie GeCo++ (Cereda et al. Bioinformatics, 2011) e LibSequence. Questi consentono di interrogare il database con queries dedicate e di svolgere analisi di genetica di popolazione in regioni genomiche definite o in finestre a scorrimento lungo le regioni genomiche di interesse.

I seguenti indici di diversità e statistiche di genetica di popolazione verranno calcolati:

- stimatori di diversità nucleotidica di Watterson (θ_W) e Nei (π) (valutano la frequenza di posizioni polimorfiche in una regione genomica; bassi valori degli stimatori suggeriscono selezione purificatrice o sweep selettivo; alti valori indicano selezione bilanciante);
- D di Tajima (valuta lo spettro delle frequenze alleliche; bassi valori di D indicano un eccesso di varianti rare; alti valori sono indice di eccesso di varianti a frequenza allelica intermedia);
- H di Fay and Wu (valuta la presenza di varianti derivate ad alta frequenza; valori di H molto negativi suggeriscono uno sweep selettivo)
- FST di Hudson (indice di diversità genetica tra le popolazioni; valori estre-

mamente alti o bassi di FST indicano che le frequenze alleliche tra due popolazioni si sono differenziate di più o di meno di quanto ci si aspetta sulla base di un pattern di evoluzione neutrale).

Per tutti questi stimatori e statistiche la deviazione dall'attesa in condizioni di neutralità verrà valutata attraverso un approccio empirico. In particolare, tutti gli stimatori e le statistiche verranno calcolate per finestre a scorrimento ottenute da un set di 2000 geni umani selezionati casualmente. Il 95esimo e il quinto percentile nella distribuzione dei valori ottenuti dalle finestre dei 2000 geni verranno utilizzati come cut-off per identificare le regioni candidate; queste saranno definite come finestre singole o contigue appartenenti ai geni in studio che mostrano valori insolitamente alti ($>$ del novantacinquesimo percentile) o insolitamente bassi ($<$ del quinto percentile) per almeno due stimatori/statistiche.

2) Come detto, le tracce selettive identificate al punto 1) verranno verificate attraverso sequenziamento diretto Sanger e analisi aggiuntive. In questa fase risequenzieremo le regioni di interesse in 60 soggetti appartenenti ai principali gruppi etnici; il DNA genomico di tali individui (inclusi nel progetto HapMap, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>) è già disponibile presso il laboratorio di Biologia Molecolare/ Bioinformatica del nostro Istituto ed è stato ottenuto dal Coriell Institute for Medical Genetics (<http://ccr.coriell.org/>). Le regioni candidate saranno amplificate tramite PCR, i prodotti di PCR verificati su gel di agarosio saranno trattati con ExoSAP-IT (USB Corporation Cleveland Ohio, USA) e sequenziati direttamente su entrambi gli strands con oligonucleotidi specifici utilizzando un kit commerciale dell'Applied Biosystems (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit). I dati grezzi saranno analizzati mediante Sequencing Analysis Software v5.4 e le sequenze saranno assemblate con AutoAssembler version 1.4.0 (Applied Biosystems) e SeqScape Software v2.7 (Applied Biosystems).

Come sopra descritto, gli aplotipi verranno inferiti con PHASE 2.1 e le seguenti statistiche stimatori verranno calcolati per ciascuna regione:

θ_W e π , D di Tajima, H di Fay and Wu, FST. Inoltre calcoleremo le statistiche F e D (e F* e D*) di Fu e Li (che si basano sullo spettro di frequenze alleliche e sulla presenza di SNP che compaiono in un solo individuo).

Lo scostamento dalla neutralità sarà testato attraverso simulazioni coalescenti utilizzando il software così. La significatività della statistica FST sarà valutata permutando 10000 volte la distribuzione degli aplotipi tra le popolazioni. Saranno inoltre applicati ulteriori test:

- MLHKA (Maximum-likelihood-ratio HKA test): è stato ideato per confrontare la diversità nucleotidica intra-specifica con la divergenza inter-specie e il locus di interesse deve essere confrontato con un sufficiente numero di loci

neutri di riferimento. Il test sarà eseguito attraverso il software MLHKA.

- DIND test, CLR test, test basati sull'aplotipo esteso (es. IHS, XP-EHH), S^* di Plagnol and Wall. Per una descrizione di tali test si rimanda alle precedenti pubblicazioni del nostro gruppo (es. Cagliani et al. Am J Hum Genet, 2009; Sironi et al. Mol Biol Evol, 2011).

Inoltre, per tutte le regioni sequenziate ricostruiremo la filogenia degli aplotipi applicando due metodi: un network median-joining (grazie all'uso di NETWORK 4.2); il programma GENETREE che si basa su simulazioni coalescenti. Tali metodi consentono anche di stimare il tempo di coalescenza delle filogenie aplotipiche, dato che può essere sfruttato per l'inferenza del pattern selettivo (per dettagli si vedano (es. Cagliani et al. Am J Hum Genet, 2009; Sironi et al. Mol Biol Evol, 2011).

Next generation sequencing (NGS)

L'analisi dei geni candidati (es geni degli interferoni per soggetti affetti da MS, geni del pathway di autophagy per pazienti con CD) verrà effettuata tramite sequenziamento di nuova generazione (NGS) utilizzando la tecnica del targeted resequencing.

Per questi geni sarà generata una libreria oligonucleotidica così da ottenere sonde di cattura ad RNA, definite baits (esche), complementari alle regioni di DNA che intendiamo analizzare (Sure Select kit, Agilent). I campioni di DNA genomico verranno frammentati in modo da ottenere frammenti di circa 300-400 bp, legati ad adattatori e amplificati. Il DNA-legato agli adattatori verrà ibridato ai baits di oligonucleotidi RNA biotinilati per la cattura dei targets in soluzione. Questi baits verranno attaccati a microsferre magnetiche marcate con streptavidina, che verranno in seguito catturate attraverso un magnete. Il DNA, arricchito per le regioni target selezionate, sarà sequenziato con l'apparecchiatura NGS. Questo approccio, mediante kit di selezione delle librerie, consentirà di identificare ogni libreria selezionando i risultati, mediante un codice identificativo, per ogni soggetto analizzato. Grazie a questo sistema di barcoding del paziente possono essere analizzati in un'unica corsa fino a 48 pazienti contemporaneamente. Infine, tutte le sequenze del DNA ottenute dai pazienti selezionati saranno allineate alle sequenze di riferimento e verranno ricercati SNP, ins/del e variazioni strutturali (queste ultime si presume meno frequenti in questo gruppo di patologie). I dati ottenuti verranno validati tramite sequenziamento tradizionale con metodo di Sanger.

Analisi di mutazione in soggetti colpiti da encefalite a possibile origine infettiva

Dati recenti hanno indicato che soggetti con mutazioni in geni del pathway di TLR3 (recettore toll-like 3) sono più suscettibili a encefalite erpetica. Mu-

tazioni in TLR3 sono anche state associate a encefaliti insorte in seguito a influenza.

Inoltre lo sviluppo di ascessi cerebrali in seguito a infezione con stafilococco sono stati riscontrati in pazienti portatori di mutazioni nei geni MYD88 e IRAK4.

Non è noto se mutazioni in tali geni possano rappresentare fattori di rischio per encefaliti causate da altri agenti virali o batterici (o in cui la patogenesi sia verosimilmente di origine virale, sebbene non sia stato identificato l'agente causativo). Ci proponiamo quindi di studiare il pattern di variabilità genetica di tali geni (includendo anche i pathway di TLR7, 8 e 9) in soggetti colpiti da encefalite di supposta origine infettiva reclutati presso il nostro Istituto (NR3) o presso altri presidi (Policlinico di Milano, Ospedale Sacco) al fine di identificare putative varianti patologiche che rendano i soggetti suscettibili ad agenti normalmente associati a patologie lievi. L'analisi genetica sarà affiancata da un'analisi immunologica dell'induzione dei pathways di TLR3, 7, 8, 9 e MYD88 effettuata su linfociti derivati di pazienti colpiti da encefalite. L'analisi di mutazione verrà eseguita con metodica Sanger.

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

2012

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 e Regina Elena di Milano

Università di Torino: Dipartimento di Fisica Teorica

University of Cambridge: MRC Laboratory of Molecular Biology

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 ma-

trici 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 primo anno di attività ha portato i seguenti risultati:

- Sviluppo di una libreria software in grado di facilitare enormemente il compito di scrivere software adatto all'analisi delle varianti genetiche in relazione al loro effetto sull'RNA. Tale libreria, denominata GeCo++ è stata descritta in un lavoro sottomesso alla rivista "Bioinformatics" e attualmente in fase di seconda revisione.
- È stato messo a punto un grosso database contenente tutte le varianti genetiche unitamente ai loro genotipi identificate nel pilot study del progetto 1000 Genomes (si tratta di più di 15.000.000 di varianti genotipizzate in 179 soggetti di diversa origine etnica)
- In collaborazione con il MRC-LMB di Cambridge è stato messo a punto un algoritmo che consente di identificare siti di binding per proteine che regolano lo splicing in modo tessuto specifico. In particolare ci si è concentrati su proteine che intervengono nei tessuti cerebrali. Anche i risultati di questo studio sono descritti in un paper attualmente sottomesso a Nature Genetics.
- La libreria GeCo++ è stata arricchita con oggetti e funzionalità per la ge-

stione di dati di genotipizzazione e risequenziamento. Questo consente di interagire con i database sviluppati rendendo direttamente disponibili le informazioni di variabilità genetica agli algoritmi per l'identificazione di varianti funzionali.

- La struttura del per la memorizzazione di dati di variabilità genetica è stata generalizzata in modo da poter rappresentare dati provenienti da esperimenti di varia natura. È possibile inserire dati provenienti da sequenziamento sia Sanger che NGS in modo indipendente dalla piattaforma usata. Sono state introdotte routines per leggere le informazioni dai principali formati utilizzati.

Prodotti:

- Cereda M, Sironi M, Cavalleri M, Pozzoli U. GeCo++: a C++ library for genomic features computation and annotation in the presence of variants. *Bioinformatics*. 2011 May 1;27(9):1313-5.
- Tollervey JR, Curk T, Rogelj B, Briese M, Cereda M, Kayikci M, König J, Hortobágyi T, Nishimura AL, Zupunski V, Patani R, Chandran S, Rot G, Zupan B, Shaw CE, Ule J. Characterizing the RNA targets and position-dependent splicing regulation by TDP-43. *Nat Neurosci*. 2011 Apr;14(4):452-8.
- Matteo Cereda, Gregor Rot, Uberto Pozzoli & Jernej Ule The position of RNA motif clusters determines the splicing effects of RNA-binding proteins. Submitted to NAR.

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 dei 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 ver-

rà 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 disponibili 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 missense 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 silenti rare, varianti localizzate nelle giunzioni esone-introne o localizzate delle 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 minigeni 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 una 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.

STUDIO DEL PATTERN SELETTIVO DI GENI DI RISPOSTA ANTIVIRALE FINALIZZATO ALL'IDENTIFICAZIONE DI VARIANTI DI SUSCETTIBILITÀ ALLA SCLEROSI MULTIPLA

DR.SSA RACHELE CAGLIANI

E-MAIL: RACHELE.CAGLIANI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

Periodo di svolgimento

2012

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 di Milano

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, LITA, Segrate – Università degli Studi di Milano;

IRCCS Santa Maria Nascente, Fondazione Don C. Gnocchi di Milano: Laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie

DESCRIZIONE

Negli scorsi anni di attività abbiamo applicato approcci che prevedono 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. Tra questi, un ruolo importante è certamente stato rivestito da loci coinvolti nella risposta antivirale. D'altro canto, numerose sono oggi le evidenze che suggeriscono il ruolo delle infezioni virali nello sviluppo di malattie autoimmuni (in particolare sclerosi multipla e diabete di tipo 1).

Durante uno studio genome-wide volto all'identificazione di varianti geniche sottoposte a pressione selettiva esercitata da virus (Fumagalli et al. PLoS Gen 2010), abbiamo notato che esiste un overlap tra geni di suscettibilità a sclerosi multipla (SM) e geni che portano varianti selezionate da virus. Questi risultati sono in accordo con osservazioni relative all'epidemiologia di alcune

infezioni virali (ad es. EBV) in soggetti affetti da SM. Inoltre, lavori pubblicati da altri gruppi indicano come varianti in geni di riposta antivirale conferiscano suscettibilità a SM. Un esempio recentemente pubblicato riguarda il gene OAS1 (O'Brien et al. 2010; Wood 2010).

Durante questi anni abbiamo dimostrato (e pubblicato in numerosi lavori) come la genetica di popolazione (o simili metodiche volte ad descrivere i pattern evolutivi) rappresenti un approccio innovativo per l'identificazione di varianti di suscettibilità a malattie con ereditarietà poligenica (come SM).

In questo progetto ci proponiamo di applicare analisi di genetica di popolazione a un sotto-gruppo di geni di riposta antivirale identificati in PLoS Gen. (2010) al fine di individuare le varianti sottoposte a selezione naturale (e quindi funzionali). L'associazione di tali varianti con SM verrà poi analizzata attraverso studi caso/controllo avvalendosi della collaborazione con la Dr.ssa Guerini/Prof. Clerici.

Referenze

- 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. 2010 Feb 19;6(2):e1000849.
- O'Brien M, Lonergan R, Costelloe L, O'Rourke K, Fletcher JM, Kinsella K, Sweeney C, Antonelli G, Mills KH, O'Farrelly C, Hutchinson M, Tubridy N. OAS1: a multiple sclerosis susceptibility gene that influences disease severity. Neurology. 2010 Aug 3;75(5):411-8.
- Wood H. Multiple sclerosis: OAS1 genotype linked to multiple sclerosis severity. Nat Rev Neurol. 2010 Oct;6(10):526.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Durante questo primo anno di attività abbiamo applicato un approccio di genetica di popolazione per lo studio di geni e famiglie geniche che presentano varianti selezionate dai virus e che potrebbero essere di predisposizione o protezione a SM. I geni o le regioni geniche sono state selezionate anche in base alla loro funzione e alla struttura stessa del gene. I loci selezionati sono stati analizzati mediante risequenziamento diretto con metodo Sanger al fine di studiarne la storia evolutiva. Le varianti potenzialmente funzionali identificate o che potrebbero essere in linkage con la variante funzionale sulla base dell'analisi dell'aplotipo sono state analizzate in un'ampia popolazione di soggetti SM e nei rispettivi controlli.

In particolare di seguito riportiamo i risultati ottenuti adottando la strategia sopra citata per lo studio del gene OAS1, un gene di risposta antivirale che conferisce suscettibilità a SM, RAC2 il cui prodotto proteico regola diversi processi fondamentali nella risposta immune e infiammatoria e di ZC3HAV1 che codifica per una proteina antivirale.

OAS1

Dati presenti in letteratura riportano risultati contrastanti riguardo l'associazione della variante polimorfica di splicing (rs10774671) nel gene OAS1 con Sclerosi Multipla (SM).

Durante lo scorso anno abbiamo analizzato mediante risequenziamento diretto due regioni geniche di OAS1 che comprendono gli esoni soggetti a splicing alternativo (esoni 6 e 7). Mentre la regione genica che porta la variante di splicing (rs10774671) evolve in modo neutro, abbiamo riscontrato la presenza di un segnale di selezione bilanciante nella regione comprendente l'esone alternativo 7. L'analisi delle varianti presenti in questa seconda regione ha permesso l'identificazione di un polimorfismo di delezione/inserzione (Del/Ins; rs11352835, A/-) che determina la formazione di prodotti proteici che differiscono per la porzione carbossi-terminale. Nella genealogia degli aplotipi, tale variante si localizza lungo il ramo principale suggerendo che proprio il polimorfismo di Del/Ins potrebbe essere il target di selezione.

Grazie alla collaborazione con il laboratorio di Medicina Molecolare e Biotecnologie IRCCS Don C. Gnocchi, è stato possibile effettuare uno studio caso/controllo su un'ampia casistica di pazienti SM; i risultati ottenuti indicano che nella popolazione da noi analizzata la variante Del/Ins (rs11352835) è associata a suscettibilità alla malattia per il modello allelico con l'allele deleto predisponente a SM (OR 1.27, 95% CI 1.072-1.513, $p = 0.010$), mentre non abbiamo riscontrato associazione con SM per lo SNP rs10774671. Poiché le due varianti negli europei sono in linkage disequilibrium, i dati contrastanti riguardo all'associazione della variante rs10774671 con SM precedentemente riportati in letteratura potrebbero essere spiegati dal fatto che l'associazione riscontrata in alcuni lavori potrebbe essere comunque determinata dalla variante di Del/Ins rs11352835. I risultati ottenuti sono stati raccolti in un lavoro in cui abbiamo descritto questo nuovo allele di suscettibilità a SM in OAS1 e in cui abbiamo dimostrato come l'approccio da noi proposto che prevede l'utilizzo di metodiche di genetica di popolazione sia strumentale all'identificazione di regioni geniche target di selezione e di conseguenza di polimorfismi funzionali con effetto sul tratto fenotipico.

- Cagliani R, Fumagalli M, Guerini FR, Riva S, Galimberti D, Comi GP, Agliardi C, Scarpini E, Pozzoli U, Forni D, Caputo D, Asselta R, Biasin M, Pa-

raboschi EM, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. Identification of a new susceptibility variant for multiple sclerosis in OAS1 by population genetics analysis. *Hum Genet.* 2012 Jan;131(1):87-97.

RAC2

Il gene umano RAC2 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 2) codifica per un componente della superfamiglia RAS di proteine che legano GTP e che sono principalmente espresse nelle cellule di origine emopoietica.

Il prodotto proteico di RAC2 regola diversi processi fondamentali nella risposta immune e infiammatoria, per cui RAC2 può essere considerato un gene centrale nell'induzione della tolleranza immune periferica.

Diversi patogeni umani hanno come target il prodotto proteico di RAC2, ciò suggerisce che il gene RAC2 potrebbe essere stato soggetto a eventi di selezione naturale e che varianti in RAC2 potrebbero interessare fenotipi immunologici nell'uomo.

Al fine di identificare putativi elementi regolatori noncoding conservati nei mammiferi, abbiamo analizzato l'intera regione genica di RAC2 per la presenza di tali elementi selezionando due regioni su cui abbiamo effettuato risequenziamento diretto in 3 popolazioni di differente etnia.

I risultati suggeriscono che la regione genica di RAC2 comprendente il 3' UTR è stata sottoposta a selezione bilanciante multiallelica e che nelle popolazioni umane sono presenti 3 aplogruppi principali.

Gli aplotipi derivanti da una di queste cladi sono state associate con un' aumentata suscettibilità a SM ($P = 0.022$) e a un'insorgenza precoce della malattia ($P = 0.025$). Lo stesso aplogruppo è significativamente più comune nei pazienti con morbo di Crohn rispetto ai controlli ($P = 0.048$).

Questi dati rafforzano le evidenze recenti secondo cui gli alleli/aplotipi di suscettibilità sono condivisi tra diverse malattie autoimmuni e supportano il ruolo delle varianti di RAC2 nell'opatogenesi delle medesime malattie. Dunque RAC2 potrebbe rappresentare un target terapeutico nelle malattie autoimmuni.

- Sironi M, Guerini FR, Agliardi C, Biasin M, Cagliani R, Fumagalli M, Caputo D, Cassinotti A, Ardizzone S, Zanzottera M, Bolognesi E, Riva S, Kanari Y, Miyazawa M, Clerici M. An evolutionary analysis of RAC2 identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol Biol Evol.* 2011 Dec;28(12):3319-29.

ZC3HAV1

Il gene umano ZC3HAV1 codifica per una proteina antivirale e l'isoforma lunga contiene un dominio PARP-like nella regione carbossi terminale che è stata

soggetta a selezione positiva nei primati. In questo anno abbiamo analizzato la storia evolutiva di questo stesso dominio nelle popolazioni umane e in *Pan troglodytes*. In particolare abbiamo identificato due varianti che segregano sia nell'uomo che nello scimpanzè, di cui una (rs3735007) non localizza in una regione ipermutabile ed è una sostituzione non sinonima (Thr851Ile). La probabilità che due polimorfismi trans-specifici si verificano indipendentemente in due linee è molto bassa ($p = 0.0054$), suggerendo che almeno una delle due sia avvenuta prima della speciazione e che sia stata mantenuta mediante selezione. Nell'uomo, le analisi di genetica di popolazione indicano che la regione genica che condivide le due varianti mostra forti evidenze di selezione bilanciante, inoltre segnali di selezione sono presenti anche nella popolazione di scimpanzè da noi analizzata.

Lo studio caso-controllo di circa 1000 individui italiani indica che la variante Thr851Ile è significativamente associata a suscettibilità a Sclerosi multipla (OR= 1.47, 95% IC: 1.08-1.99, $p=0.011$); il dato è stato confermato su un'ampia casistica di 4416 soggetti sardi (OR= 1.18, 95% IC: 1.037-1.344, $p=0.011$), ma non in una coorte belga. Con questo lavoro abbiamo descritto uno dei casi di variante trans-specifica codificante tra uomo e scimpanzè localizzata al di fuori della regione MHC. La pressione selettiva è probabilmente virus-mediata; nella popolazione moderna tale variante si associa a suscettibilità a SM probabilmente attraverso l'interazione con fattori ambientali.

- Cagliani R, Guerini FR, Fumagalli M, Riva S, Agliardi C, Galimberti D, Pozzoli U, Goris A, Dubois B, Fenoglio C, Forni D, Sanna S, Zara I, Pitzalis M, Zoledziewska M, Cucca F, Marini F, Comi GP, Scarpini E, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis. *Mol Biol Evol.*; in press

ATTIVITÀ PREVISTE

In questo anno ci proponiamo di continuare lo studio, mediante un approccio di genetica di popolazione, di geni e famiglie geniche che presentano varianti selezionate dai virus e che potrebbero essere di predisposizione o protezione a SM.

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 rifiuti 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 atipiche 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 repository dedicati (Coriell Institute for Medical Research e ECACC) e appartenente ai soggetti che rappresentano i principali gruppi etnici umani (Africani, Caucasici, Asiatici).

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++.

I geni o le regioni geniche verranno selezionate anche in base alla loro funzione e alla struttura stessa del gene. Nel caso in cui venga identificata una regione sottoposta a selezione e la potenziale variante funzionale, tale variante verrà poi analizzata in un'ampia popolazione di soggetti SM.

Un approccio alternativo, che applicheremo per l'identificazione e lo studio di varianti predisponenti/protettive per SM, è quello di selezionare le varianti utilizzando i dati pubblici di risequenziamento forniti dal progetto 1000Genomes. Tale approccio prevede che per ciascun gene che porta una variante selezionata da virus vengano analizzati i dati di risequenziamento al fine di

identificare altre varianti rare non sinonime o di splicing presenti nel gene stesso che siano polimorfiche nella popolazione caucasica. L'analisi di associazione caso/controllo mediante genotipizzazione con sonde TaqMan verrà quindi effettuata sulla popolazione di soggetti SM e sui relativi soggetti di controllo.

DETERMINAZIONE DEL COSTO STANDARD PER PERCORSI RIABILITATIVI**ING. DAMIANO RIVOLTA**

E-MAIL: DAMIANO.RIVOLTA@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 8

Organizzazione dei Servizi Sanitari

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Centri di riabilitazione Associazione “La Nostra Famiglia” di Bosisio Parini e Ponte Lambro; Settore Organizzazione - Ufficio Pianificazione e Controllo Associazione “La Nostra Famiglia”

DESCRIZIONE

Il percorso riabilitativo della persona con disabilità in età evolutiva richiede una complessità di gestione del caso dovuta alla compresenza di una serie di soggetti interessati afferenti alla sfera di sviluppo del bambino.

In questo caso specifico, il progetto riabilitativo sul bambino non può essere limitato ad alcuni aspetti ma deve tener conto ed integrarsi anche con altri attori quali, ad esempio, la famiglia, i servizi sociali territoriali, la scuola.

Alcune Regioni italiane hanno definito una modalità di trattamento riabilitativo, definito Ciclo Diurno Continuo che integra in un progetto riabilitativo sul minore aspetti riabilitativi, educativi, di integrazione con la scuola e con la famiglia.

L'Associazione “La Nostra Famiglia” rappresenta, in Regione Lombardia, oltre il 50% dei posti accreditati in regime di Ciclo Diurno Continuo per utenti in età evolutiva, divenendo quindi un utile caso di studio.

Obiettivo del presente lavoro, pertanto diviene la definizione di un costo standard, utilizzando la metodologia ABC (Activity Based Costing) di un percorso riabilitativo che tenga in considerazione anche le attività volte ad una maggior integrazione tra il Centro di Riabilitazione e gli altri attori/portatori di interesse attinenti al caso.

L'analisi verrà effettuata attraverso una raccolta dati su un campione significativo di utenti dei Centri di Riabilitazione della Regione Lombardia negli

anni /2009/2010/2011 per individuare di quali prestazioni ed attività hanno usufruito.

Saranno, inoltre, analizzate, quelle attività a carattere indiretto volte a garantire la continuità di presa in carico con altri Enti, anche a carattere non sanitario.

L'analisi cercherà di evidenziare eventuali correlazioni che si possano rilevare tra costi/età e costi/patologia o altri fattori che saranno evidenziabili nel corso della ricerca.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Nel corso dell'anno 2011 sono state svolte le seguenti attività:

- Messa a punto della metodologia di classificazione ed attribuzione dei costi (ABC Activity Based Costing)
- Applicazione della metodologia su un Centro di Riabilitazione preso a campione (Centro di Riabilitazione di Ponte Lambro)
- Determinazione del costo standard della prestazione erogata suddiviso per:
 - Raggruppamento patologico
 - Classe di età

ATTIVITÀ PREVISTE

1. Raccolta dati PRI dal 2009 al 2011
2. Elaborazione dati identificando voci di costo dirette
3. Identificazione di altre voci di costo indirette
4. Definizione di un costo standard suddiviso per fasce d'età e per intensità e complessità assistenziale

VERIFICA EFFICACIA PERCORSI RIABILITATIVI IN USO PRESSO I CENTRI DI RIABILITAZIONE DELL'ASSOCIAZIONE LA NOSTRA FAMIGLIA

DR.SSA ALDA PELLEGRÌ

E-MAIL: ALDA.PELLEGRÌ@PL.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 8

Organizzazione dei Servizi Sanitari

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea: Poli di Conegliano, San Vito e Ostuni
Centri di Riabilitazione Associazione "La Nostra Famiglia"

DESCRIZIONE

Premessa:

Le équipe de la Nostra Famiglia hanno iniziato a stendere percorsi riabilitativi negli anni 95-96, raccogliendo l'urgenza di rispondere in modo univoco in tutti i Servizi dell'Associazione a vari quesiti aperti, nell'ambito della Riabilitazione con soggetti in età evolutiva.

Permangono quesiti aperti, il cui significato è la necessità di dare risposte mirate in modo che ogni intervento riabilitativo sia attuale, appropriato, essenziale ed efficace.

Il primo quesito è relativo allo studio della casistica per:

1. sapere sempre in tempo reale quanti casi rientranti nei diversi quadri clinici sono seguiti in tutti i CdR dell'Associazione
2. quanti ne sono stati seguiti a partire da una data indicata
3. quanti casi per ogni raggruppamento diagnostico sono in trattamento al momento dell'indagine
4. quanti casi per ogni raggruppamento diagnostico sono stati seguiti nell'arco degli anni in cui si vuole fare l'analisi
5. quanti casi sono stati seguiti in ogni settore riabilitativo negli anni oggetto della ricerca.

Il secondo quesito è relativo alle prassi valutative per:

1. conoscere l'esito dei trattamenti effettuati, quali indicatori d'esito sono stati individuati e proposti a tutte le équipes
2. quali profili valutativi specifici e condivisi, consentono di dare un giudizio d'esito e quali classificazioni validate sono state utilizzate
3. quali modalità valutative e test validati abitualmente in uso sono i più attendibili
4. conoscere quali prassi si utilizzano per condurre le osservazioni dei casi rientranti nei diversi quadri clinici
5. quali sottogruppi sono stati individuati per ogni tipologia di quadri clinici che consentano di giudicare criticamente i risultati evidenziati.

Il terzo quesito è relativo alle tecniche di intervento:

1. quali protocolli sono in uso per gli interventi specifici nei diversi quadri clinici in cui appaiono tempi e modalità di verifica dei risultati
2. quali percorsi riabilitativi si adottano per ogni quadro clinico suddiviso per età e per gravità
3. quali tecniche sono in uso per le singole patologie e qual è la loro efficacia
4. quali sono le variabili abituali da tenere in considerazione per dare un giudizio d'esito certo
5. quali eventi occasionali possono intervenire nel corso del trattamento capaci di modificare sia la storia naturale del quadro clinico che l'efficacia degli interventi riabilitativi
6. quali tempi sono necessari per l'analisi a distanza dei risultati ottenuti in ogni quadro clinico, questo permetterebbe di definire i tempi utili per la verifica.

Il quarto quesito è relativo alla gestione dei singoli casi clinici:

1. quali interventi possono essere ritenuti efficaci al minor costo possibile
2. come si articola il trattamento effettuato nel CdR e a domicilio
3. come si articolano i trattamenti intensivi (ricoveri diagnostici e impostazioni terapeutiche in IRCCS) con i trattamenti estensivi e domiciliari
4. quali sono i compiti specifici del personale tecnico, della famiglia o caregiver, della scuola
5. quali interventi possono essere ritenuti di supporto alla Riabilitazione (sport, palestre, attrezzature da fornire a domicilio, software accessibili alle famiglie...).

ATTIVITÀ PREVISTE

Per ogni patologia si evidenziano 12 sottogruppi che raccolgono tutti i casi seguiti presso i CdR:

3 livelli di gravità: lieve – medio – grave

4 classi di età 0-3; 4-6; 7-12; 13-18.

Per ogni patologia:

- a) studiare i trattamenti realmente effettuati in un anno
- b) valutare le differenze fra l'atteso e il realizzato
- c) confrontare i risultati rilevati nei centri catalogati per tipologia
- d) identificare gli indicatori d'esito
- e) individuare in un campione significativo l'esito del trattamento
- f) studiare le variabili più frequenti
- g) reimpostare i protocolli e i percorsi in base ai dati rilevati.

LE BIOBANCHE E LA RICERCA NEL CAMPO DELLE MALATTIE NEUROLOGICHE PEDIATRICHE: COSA PENSANO LE FAMIGLIE DEI PAZIENTI

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Associazioni dei genitori dei pazienti pediatrici che già collaborano con l'IRCCS E. Medea e l'Associazione "La Nostra Famiglia"

DESCRIZIONE

Il presente progetto si propone di esaminare la conoscenza, le opinioni e le attitudini dei genitori di figli minorenni – secondo l'accezione giuridica italiana, i soggetti che non hanno ancora raggiunto la maggiore età prevista dalla legge – con riguardo alla "donazione" di materiale biologico dei figli stessi per ricerca.

Mentre la conoscenza della possibilità di donare materiale biologico, da un lato, e la disponibilità a donare (o meno) campioni biologici per finalità di cura e ricerca, dall'altro lato, sono state ampiamente esaminate con riguardo a soggetti adulti, non vi sono ancora studi approfonditi di tali aspetti nei pazienti pediatrici.

La poca conoscenza rispetto a tali temi apre questioni etiche e regolatorie di rilievo, quali, la definizione della natura del consenso alla raccolta, allo stoccaggio e all'uso per ricerca dei materiali biologici e dei dati acquisiti da pazienti in età pediatrica; la tutela della privacy dei "donatori" pediatrici; il riconoscimento (o meno) ai "donatori" pediatrici della libertà di prendere decisioni in modo autonomo riguardo alla gestione dei propri campioni e dati, una volta acquisita la capacità di intendere e di volere in relazione al proprio sviluppo psico-fisico o all'età stabilita dalla legge.

Per poter affrontare le questioni sopra menzionate è necessario vedere che tipo di conoscenza hanno, i diretti interessati di tale processo e delle sue finalità, e come gli stessi si pongono nei confronti della donazione di mate-

riale biologico finalizzata alla ricerca. Per completare il quadro conoscitivo, è, inoltre utile esplorare le motivazioni sottese ai punti di vista espressi e alle attitudini.

Il progetto intende esaminare la conoscenza, le opinioni e le attitudini dei genitori di figli minorenni, rinviando a un'eventuale fase successiva l'esplorazione di tali processi nei "donatori" pediatrici stessi.

Tale scelta è motivata dalla circostanza che, in numerosi casi, i "donatori" pediatrici (si pensi, ad esempio, ai neonati oppure ai bambini nei primi anni di vita o agli adolescenti con grave ritardo mentale) non sono in grado di esprimere le proprie opinioni in modo pienamente consapevole e autonomo. Il progetto si propone di esplorare la conoscenza, i punti di vista e le attitudini dei genitori di figli minorenni e di fare emergere le motivazioni sottese a tali processi. Per il perseguimento di tali finalità il progetto prevede lo sviluppo di un'analisi qualitativa mediante focus group.

L'analisi si focalizzerà sulla conoscenza, sui punti di vista e sulle attitudini dei genitori di figli minorenni affetti da malattie neurologiche considerate, nella letteratura scientifica internazionale, comuni nell'età pediatrica. In considerazione dei dati riportati in letteratura e delle malattie studiate presso l'Istituto IRCCS "Medea"-Associazione La Nostra Famiglia verranno in particolare considerate patologie neurologiche pediatriche di natura genetica, congenita, acquisita.

L'analisi verrà condotta attraverso focus group omogenei: un focus group per ogni malattia neurologica pediatrica selezionata.

I potenziali partecipanti ai focus group verranno individuati, in misura prevalente, sulla base dei contatti forniti dalle Associazioni delle famiglie dei pazienti che collaborano con l'Istituto Scientifico IRCCS "Medea"- Associazione La Nostra Famiglia.

In conformità alla letteratura internazionale, che prevede la partecipazione da 6 a 12 individui per ogni focus group, si condurranno focus group con almeno 3, e non oltre, 5 coppie di genitori.

Ogni focus group verrà condotto da un moderatore, assistito da un rapporteur, che parteciperà al focus group per scrivere opinioni e punti di vista degli intervistati e osservare lo scenario circostante. E' prevista la possibilità di utilizzare in aggiunta l'audioregistrazione al fine di non tralasciare informazioni utili per l'analisi. Il focus group avrà durata di un'ora/un'ora e trenta minuti, secondo le indicazioni riportate nella letteratura. Per ogni focus group verrà distribuito un breve questionario anonimo per la raccolta di dati socio-demografici (ad esempio, a quale fascia d'età appartieni?, quale è la tua nazionalità?, quale è il tuo titolo di studio?, etc..). I dati raccolti verranno trascritti a mano e analizzati attraverso il metodo dell'analisi del contenuto ("content analysis methodology") che prevede la rielaborazione dei dati raccolti ed

esaminati in categorie concettuali rilevanti per il tipo di ricerca condotto. A completamento della analisi verrà scritto un report riassuntivo della discussione svoltasi nei focus group, che verrà dato ai genitori interessati a ricevere informazioni riguardo lo sviluppo della ricerca.

Inoltre, i dati raccolti verranno utilizzati per pubblicazioni di carattere scientifico, a integrazione di pubblicazioni compiute negli anni precedenti in tema di biobanking pediatrico.

ATTIVITÀ PREVISTE

Per il perseguimento delle finalità dello studio verranno condotti focus group omogenei, intesi a esplorare la conoscenza (cosa sanno), i punti di vista (cosa pensano) e le attitudini (come si pongono) dei genitori di figli minorenni con riguardo alla donazione di materiale biologico dei figli affetti da una malattia neurologica per finalità di ricerca.

In relazione ai focus group, e prima della loro conduzione, verranno organizzati incontri per la descrizione del progetto e l'invito alle famiglie di partecipare ai focus group.

Al termine dei focus group, una volta compiuta l'analisi dei dati raccolti, verranno restituiti in un incontro apposito i dati raccolti ai partecipanti che siano interessati a riceverne comunicazione.

Lo studio verrà descritto in articoli destinati alla pubblicazione su riviste del settore.

SCENARI SOCIO-CULTURALI DELLA RIABILITAZIONE INFANTILE. RICOGNIZIONE DELLE PRATICHE DI CURA NEI PAESI IN VIA DI SVILUPPO. IDENTIFICAZIONE DELLE QUESTIONI ETICHE, DEONTOLOGICHE, SOCIALI ED ELABORAZIONE DI UN PERCORSO DI FORMAZIONE PER OPERATORI

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: Settore Formazione Continua

OVCI (Organismo di Volontariato per la Cooperazione Internazionale) – La Nostra Famiglia

DESCRIZIONE

Il presente progetto è la prosecuzione di quello di Ricerca Corrente condotto nel 2011 (già preventivato di durata biennale).

Nell'ottica di un'analisi comparativa dei principi della bioetica e del sapere della cura, la ricerca proposta dalla Linea 9 su impulso specifico della Presidente dell'Associazione "La Nostra Famiglia" (Dr.ssa Alda Pellegrini) e in collaborazione con l'Organizzazione Non Governativa "OVCI-La Nostra Famiglia" si è proposta la ricognizione di pratiche e teorie riabilitative, specificatamente nei confronti del bambino, prima rispetto alle alterità culturali in senso generale, e successivamente in contesti selezionati e considerabili "campioni" di contesti culturali molto differenziati (Brasile, Ecuador, Sudan, Marocco, Cina: Paesi nei quali OVCI svolge o ha svolto progetti di Cooperazione Internazionale allo Sviluppo in ambito socio-sanitario-riabilitativo), allo scopo di riconoscervi punti di forza e criticità. L'indagine non si è concentrata esclusivamente su tale ricognizione di tecniche e di metodologie riabilitative, ma ha affrontato la riabilitazione come un percorso globale che coinvolge i piccoli pazienti, le famiglie e il personale socio-sanitario che li assiste sin dalla comunicazione della diagnosi, delle decisioni medico-sanitarie, delle pratiche riabilitative, dell'inserimento sociale, fino allo sviluppo condiviso di un progetto di vita. Il target di analisi si è rivolto ai bambini affetti da Paralisi

Cerebrale Infantile (PCI) poiché tale diagnosi è ben identificata anche nei Paesi in Via di Sviluppo, l'affezione è cronica, il danno cerebrale non evolve e generalmente presenta un quadro clinico complesso che coinvolge molteplici funzioni corporee (motorie, linguistiche, cognitive).

La parte del progetto relativa all'anno 2011 è stata completata. Il Paper destinato alla pubblicazione è in fase di stesura e verrà sottoposto a riviste di letteratura internazionale di settore.

La prospettiva di conoscenza reciproca utilizzata nella prima fase del progetto sarà la base di gestione di una quotidianità sempre crescente: l'assistenza e la cura da parte del personale sanitario italiano, e specificatamente di quello operante nell'IRCCS "E. Medea- Ass. La Nostra Famiglia" e dell'Associazione "La Nostra Famiglia" rispetto a piccoli pazienti provenienti da contesti socio-culturali "altri".

Il fenomeno dell'immigrazione non va infatti inteso come un flusso di individui in movimento, ma come uno spostamento della "persona" nella sua interezza, portatrice di valori e culture differenti la cui conoscenza e comprensione è inscindibile al fine di realizzare un adeguato approccio all'altro, poiché il suo bisogno e la sua soddisfazione non sono univocamente definibili.

A tale scopo sono stati elaborati dei questionari a risposta chiusa rivolti alle famiglie straniere di bambini disabili in carico presso il Servizio Sociale di alcuni Poli dell'Associazione "La Nostra Famiglia" della Lombardia (Bosisio Parini) e del Triveneto (Conegliano Veneto, Padova, Pieve di Soligo, Oderzo, San Vito al Tagliamento, Pasian di Prato, Treviso) che verranno utilizzati come strumento di indagine. Tali questionari sono disponibili in varie lingue: italiano, inglese, francese, spagnolo, rumeno, arabo e cinese. La somministrazione degli stessi è affidata ad alcuni colleghi Assistenti Sociali dei vari Poli, che hanno ricevuto specifica formazione a riguardo. La somministrazione è iniziata il 1 Luglio 2011 e terminerà il 31 Gennaio 2012. I risultati di tali questionari verranno utilizzati per la produzione di un Paper da sottoporre a riviste di letteratura internazionale di settore.

Oltre che da una prospettiva familiare, le problematiche esposte verranno analizzate anche dalla prospettiva del Servizio, attraverso il coinvolgimento degli operatori del Polo di Bosisio Parini in alcuni Focus Group sulle tematiche citate.

In ultimo verranno realizzate delle video-interviste a persone straniere con disabilità sia minori (qualora l'età sia congrua con i temi dell'intervista) che adulti e alle loro famiglie riguardo il tema della disabilità nei rispettivi Paesi d'origine. Il racconto della loro esperienza completerà il quadro di indagine dando anche un volto e una prospettiva umana ai temi trattati.

Tutto il materiale ottenuto verrà utilizzato, in collaborazione con il Settore Formazione dell'Istituto, per l'elaborazione di un percorso di formazione per

operatori sanitari e volontari che collaborano con l'Associazione "La Nostra Famiglia".

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Sono state realizzate 12 interviste agli esperti OVCI-la Nostra Famiglia sia espatriati che rientrati.

Alcuni esperti hanno richiesto la consulenza del personale locale durante l'intervista. Varie figure professionali sono state intervistate tra cui fisioterapisti, neuropsichiatri infantili, esperti di pedagogia speciale, insegnanti. Dall'analisi dei risultati sono emerse le condizioni di difficoltà in cui vivono i bambini con disabilità non solo nei Paesi in analisi, ma nei Paesi in Via di Sviluppo in generale. Le problematiche sono molteplici: inattendibilità dei dati di prevalenza e incidenza riguardanti la disabilità infantile, dovuta sia a fattori logistici che culturali; mancanza di una diagnosi precoce e dettagliata, dovuta sia alla mancanza di strutture adeguate che alla scarsa competenza del personale sanitario, soprattutto nelle aree rurali; buona accettazione del bambino disabile all'interno della famiglia ad eccezione della Cina, dove sembra che la disabilità rappresenti una delle cause primarie dell'abbandono minorile; scarsa conoscenza delle possibili cause di disabilità infantile, sia in termini di igiene comportamentale (ad esempio è riportato il fenomeno frequente del matrimonio endogamico) che di disabilità come possibile esito di incidenti o affezioni ante, peri o post-natali; tendenza all'attribuzione delle cause della disabilità in generale a fenomeni di credenza popolare o spirituale (punizione divina, possessione demoniaca); tali concezioni sembrano evocare nelle famiglie sentimenti di vergogna e disonore davanti agli occhi della comunità di appartenenza, con conseguente tendenza ad isolare il bambino con disabilità dai momenti comunitari.

Riguardo le pratiche di cura, è emersa la tendenza ad utilizzare sia la medicina tradizionale (generalmente estratti di erbe o animali) che quella allopatrica, ove possibile (è stata descritta infatti una mancanza di strutture adatte alla riabilitazione infantile, soprattutto nelle aree rurali, poiché spesso non considerata un servizio sanitario di base). Da un punto di vista clinico, l'iter riabilitativo sembra essere spesso basato sulla diagnosi e non sul quadro funzionale del bambino; è emersa la mancanza di pianificazione e di lavoro in equipe del personale socio-sanitario; è stato affermato come spesso la conclusione del percorso riabilitativo sia dovuta a mancanza di risorse economiche della famiglia.

Da un punto di vista familiare i genitori sembrano avere scarsa conoscenza delle potenzialità del bambino e della riabilitazione; gli obiettivi della riabi-

litazione spesso vengono individuati nella guarigione o nell'apprendimento del cammino. In situazioni di scarsità di risorse disponibili (come descritte dagli intervistati per il Sudan e l'Ecuador) sembra esserci all'interno della famiglia una "preferenza" verso i figli non disabili. Tale scelta è spesso motivata da una percezione ridotta dell'aspettativa di vita dei figli con disabilità e dalle scarse opportunità e ruoli sociali disponibili per una persona disabile adulta nel contesto di riferimento. Nonostante i contesti analizzati differiscano consistentemente, molti tratti comuni sono emersi riguardo le condizioni di vita, le pratiche riabilitative e l'inclusione sociale nei confronti dei bambini affetti da PCI. Il substrato comune che avvicina delle aree così culturalmente e geograficamente differenti può essere evidenziato dalla diffusa mancanza di risorse. Le risorse vanno intese sia come possesso di conoscenze e competenze (sia delle famiglie che del personale sanitario) sia come presenza fisica sul territorio di strutture e servizi in grado di soddisfare i bisogni del bambino con disabilità.

ATTIVITÀ PREVISTE

1. Raccolta ed elaborazione dei dati dei questionari per famiglie
2. Stesura del Paper riguardante i dati raccolti con i questionari da sottoporre a riviste di letteratura internazionale di settore.
3. Organizzazione di Focus Groups per il personale sanitario del polo di Bosisio Parini sul tema del lavoro quotidiano con bambini e famiglie provenienti da contesti culturali differenti
4. Realizzazione di videointerviste a persone straniere con disabilità o alle loro famiglie in carico presso il polo di Bosisio Parini.
5. Elaborazione di un percorso formativo per operatori in collaborazione con il settore Formazione Continua dell'IRCCS "E.Medea – Associazione La Nostra Famiglia" del polo di Bosisio Parini.

ANALISI ESPLORATIVA MEDIANTE RMF PER IMMAGINI DELLE AREE E FUNZIONI CEREBRALI CORRELATE AL GIUDIZIO MORALE IN SOGGETTI SANI IN ETÀ EVOLUTIVA

PROF. LEONARDO LENZI

E-MAIL: LEONARDO.LENZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 9

Bioetica

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: CeSNE – Centro Studi di Neuroimaging dell'Età Evolutiva; U.O. di Neuroriabilitazione 2

Università Cattolica di Milano, Dipartimento di Psicologia

DESCRIZIONE

Sempre più numerosi studi riportano, principalmente alla luce dei dati ottenuti mediante l'utilizzo di risonanza magnetica funzionale per immagini, che determinate aree del cervello umano sono correlate alla conoscenza e all'apprendimento "morale", allo sviluppo di un proprio "senso morale", alla valutazione o compimento di giudizi morali, alla assunzione di decisioni morali e al compimento di azioni morali.

Secondo i più, esiste un "neuromoral network" principalmente (ma non esaurivamente) riconducibile alla VMPFC (ventromedial/prefrontalcortex), specialmente dell'emisfero dx – anche detta area di Brodmann – alla OFC/VL (orbitofrontalcortex/ventrolateral), alla amigdala e alla DLPFC (dorsolateral/PFC).

Secondo le descrizioni riportate in questi studi, ognuna delle aree cerebrali menzionate ha una correlazione rispetto al comportamento morale. La VMPFC sembra essere il cuore del network neuromorale. Nello specifico, la VMPFC è correlata, secondo gli studi riportati in letteratura, alle seguenti funzioni mentali di carattere morale a) attribuzione di significato morale ed emozionale agli eventi sociali, b) anticipazione delle future conseguenze di tali eventi, c) Teoria della Mente (ToM) – intesa quale abilità di apprezzare pensieri, credi, sentimenti, comportamenti altrui – d) empatia e ad altri compiti correlati.

Diversi studi hanno mostrato come lesioni o malattie cerebrali coinvolgenti la VMPFC e la OFC/ML abbiano implicazioni sul giudizio morale. Alcuni studi in pazienti bambini hanno mostrato in particolare che lesioni di queste aree, intervenute in primissima età - prima dei 16 mesi - possono influire, alterandolo, sullo sviluppo della conoscenza e del giudizio morale.

Se la VMPFC è il cuore del network neuromorale, anche le altre aree corticali sembrano giocare un ruolo importante.

Ad esempio, alcune ricerche hanno notato che la VMPFC si attiva in risposta al compito di scegliere fra opzioni morali personali che implicano che un'azione diretta del partecipante all'esperimento possa causare danno ad altri (si pensi al tradizionale dilemma del trolley: un trolley sfuggito al controllo del proprietario può avere due percorsi: se segue una strada, uccide 5 persone; se segue l'altra strada, uccide una sola persona, obesa. Il partecipante può manovrare una leva, affinché il trolley segua una direzione piuttosto che l'altra, e così sacrificare la vita di una sola persona, obesa, alla vita di cinque persone). In questa direzione, diversi studi con fMRI hanno mostrato che la VMPFC è correlata a emozioni prosociali, includendo il senso di colpa, l'imbarazzo, la compassione.

Al contrario, l'attivazione della DLPFC è stata correlata a dilemmi morali impersonali.

Altri studi hanno mostrato che la VMPFC corrisponde al senso morale di giustizia e al desiderio morale di punire chi viola la norma.

Tenuto conto dei limiti degli studi riportati in letteratura relativamente a questo campo e, in particolare, considerato che:

- gli studi sopra menzionati, per quanto numerosi, sono piuttosto recenti e dunque necessitano di un'ulteriore approfondita osservazione,
- i dati finora riportati in letteratura forniscono una descrizione delle regioni cerebrali corrispondenti ai processi mentali di volta in volta "interrogati" e non una "dimostrazione" (/prova/evidenza) scientifica che la regione cerebrale correlata ad un processo mentale è implicata in tale processo (e cioè dalla correlazione non deriva logicamente il coinvolgimento della regione cerebrale nel processo mentale),
- le informazioni fornite dalla analisi mediante RMFi hanno una rilevante importanza nel comprendere la geografia del cervello e il suo funzionamento e che queste informazioni assumono una valenza scientifica ulteriore quando sono comparate e integrate con ulteriori studi condotti in campo psicologico, neurologico.

Questo studio si propone di "esplorare", mediante risonanza magnetica funzionale per immagini, il giudizio morale in soggetti sani in età evolutiva, appartenenti alle seguenti fasce di età:

- anni 9/10 (quarta elementare)
- anni 12/13 (seconda media)
- anni 15/16 (seconda superiore)

In generale, le informazioni acquisite mediante questo studio possono essere utili a comprendere meglio, insieme alle conoscenze psicologiche e pedagogiche attuali, la capacità morale del bambino e del giovane non ancora maggiorenne, con possibili implicazioni di tipo conoscitivo riguardo al loro comportamento.

Nello specifico clinico, la correlazione delle informazioni di neuroimmagine funzionale con le prestazioni comportamentali potrà fornire indicazioni utili per futuri approfondimenti riguardo la comprensione e l'intervento riabilitativo dei disturbi di giudizio morale in pazienti cerebrolesi e psichiatrici.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Sono stati messi a punto i set di dilemmi morali da sottoporre ai soggetti che prenderanno parte allo studio. Tali set di dilemmi morali verranno sottoposti a validazione mediante lo svolgimento di test su campioni selezionati.

ATTIVITÀ PREVISTE

1. Definizione delle modalità di reclutamento dei soggetti che parteciperanno allo studio e loro sviluppo
2. Avvio della fase operativa che include anche le scansioni con risonanza magnetica funzionale per immagini con i soggetti che hanno prestato il proprio consenso informato alla partecipazione allo studio

STUDIO RM AD ALTA RISOLUZIONE SPAZIALE (3 TESLA 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. FABIO TRIULZI

E-MAIL: FABIO.TRIULZI@BP.LNF.IT

Linea di Ricerca n. 10

Neuroimaging

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Bosisio Parini

DESCRIZIONE

Il progetto si articola nei seguenti protocolli:

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.

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
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.
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.

Descrizione del progetto:

Protocollo 0:

La conoscenza della crescita e dello sviluppo normale delle strutture del sistema nervoso centrale è requisito pressoché imprescindibile per poter comprendere in maniera approfondita l'ampio spettro di patologia cerebrale, malformativa e non, che può colpire i pazienti in età pediatrica, quali quelli

affidenti all'IRCCS E. Medea.

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. Per ovviare a tale carenza è necessario "costruire" autonomamente un archivio di RM cerebrali di soggetti pediatrici sani il più ampio e uniforme possibile.

Protocollo 1:

La risonanza magnetica ha permesso di ottenere, 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.

Tuttavia, dalla pratica clinica quotidiana, risulta che, in questo tipo di soggetti, un gran numero di esami di neuroimaging siano giudicati normali, sulla base dei soli tradizionali criteri di valutazione qualitativa.

Recentemente, nel campo della ricerca clinica avanzata in neuroimaging, sono stati sperimentati approcci metodologici di tipo analitico quantitativo allo studio della patologie neurologiche, soprattutto nell'adulto (es. demenze, parkinsonismi, etc.). Tali innovative tecniche di acquisizione ed elaborazione delle immagini (es: VBM, DTI, fMRI) permettono di ottenere informazioni maggiormente dettagliate rispetto al puro dato morfologico tradizionale.

L'utilizzo di un magnete a 3T, combinato ad un approccio di post-processing delle immagini di tipo quantitativo, potrebbe aiutare a ridurre la percentuale di esami falsamente negativi attualmente ancora presente in questo campo di patologia neurologica pediatrica.

Protocollo 2:

Un numero significativo di pazienti con malattia epilettica presenta quadri RM ottenuti con tecniche tradizionali del tutto normali. 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 RM a 3T permette una risoluzione spaziale delle immagini sicuramente superiore rispetto alle tradizionali apparecchiature a 1.5 T. Inoltre, l'utilizzo di una bobina di ricezione a 32 canali permette di ottenere maggiore segnale dalle strutture più superficiali come la corteccia cerebrale, fino ad ottenere quindi valori di risoluzione spaziale superiori a quanto prima d'ora possibile. Tali innovazioni tecnologiche sono state introdotte sul mercato solo recentemente e pertanto ancora scarse sono le esperienze ed i dati sulle potenzialità diagnostiche soprattutto in ambito epilettologico pediatrico, ove le dimensioni cerebrali sono anche minori di quelle dell'adulto.

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 volumetrica cerebrale. L'impiego dell'imaging funzionale (fMRI) consente inoltre di valutare se le lesioni individuate possono interferire con l'attività dei circuiti corticali responsabili delle funzioni cognitive superiori.

Protocollo 3:

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 assonali costituisce a riguardo un interessante metodo di studio.

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 e che in tali pazienti possono essere alterati. 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.

RISULTATI E PRODOTTI CONSEGUITI

Dopo la fase di avvio del progetto nell'anno 2010, finalizzata alla messa a punto degli specifici protocolli di acquisizione dati e alla risoluzione di alcuni problemi tecnici insorti in fase di start-up del magnete, nell'anno appena trascorso, 2011, è stato possibile dare inizio alla fase più operativa del progetto, con la acquisizione dei dati sui primi soggetti pediatrici.

Sono stati arruolati e sottoposti a indagine RM un totale di 178 soggetti, così ripartiti nei diversi protocolli:

Protocollo 0: 4 soggetti

Protocollo 1: 103 soggetti

Protocollo 2: 26 soggetti

Protocollo 3: 45 soggetti

158/178 esami sono stati eseguiti in regime di sedazione a causa della impossibilità dei soggetti a mantenere l'immobilità necessaria per un tempo sufficiente ad acquisire i dati. In nessun caso si sono verificate complicanze maggiori durante o al termine delle sedazioni.

L'utilizzo di protocolli mirati, ad elevata risoluzione, ha permesso di ottenere primi incoraggianti risultati nell'ottica di un miglioramento della performance diagnostica della RM.

Nella popolazione di soggetti con ritardo mentale e/o disturbo del comportamento e in quelli con epilessia, in particolare, è stato possibile in molti casi definire al meglio quadri malformativi cerebrali che in precedenti indagini a 1.5T rimanevano indefiniti o mal caratterizzati. Le sequenze ultra high resolution, con voxel inferiore ai 100 nl di volume, hanno spesso permesso di individuare reperti altrimenti non evidenziabili (eterotopie subependimali e sottocorticali, displasie corticali, alterazioni cerebellari ecc) in una quota consistente di soggetti. Tali dati permettono osservazioni interessanti nell'ambito della discussione sulla origine e classificazione delle malformazioni cerebrali, e meritano di essere espansi nel corso dell'anno corrente.

L'attenzione posta nel ottenere immagine di elevata risoluzione ha consentito di effettuare alcune interessanti osservazioni preliminari sull'imaging dello strato corticale in età pediatrica. E' stato infatti notato come sia possibile già a 3 T, e non solo a 7T, osservare una effettiva "laminazione" del manto corticale, caratterizzata da strati sovrapposti con intensità di segnale differente, in accordo con quanto noto da studi di anatomia patologica e citoarchitettura. Stiamo attualmente rielaborando i dati ottenuti per cercare un metodo di analisi quantitativa affidabile che ci permetta di rendere misurabile tale osservazione e che permetta confronti tra soggetti sani e patologici.

In pressoché tutti i soggetti sottoposti a RM, sono stati acquisite sequenze di DTI secondo il protocollo messo a punto nel 2010 con la collaborazione del Dr. Pierpaoli dell'NIH.

Tale ingente mole di dati è attualmente in fase di elaborazione secondo diversi approcci metodologici, ovvero sia come studi di popolazioni di soggetti con caratteristiche cliniche/morfologiche simili (es: soggetti con ritardo mentale e RM negativa), sia come singoli casi, caratterizzati da quadro RM di particolare interesse e unicità.

A tal proposito, l'analisi dual-compartment dei parametri di diffusione in soggetti con malattie della sostanza bianca ha permesso di individuare modelli di danno differenti, che rappresentano una assoluta novità nella letteratura di tali patologie.

Nel corso del 2011 sono infine già stati pubblicati alcuni articoli su soggetti arruolati nell'ambito di questo protocollo, ed altri lavori sono in fase di valuta-

zione presso gli editori. A tal proposito si riportano:

- Poretti A, Vitiello G, Hennekam RC et al. Delineation and Diagnostic Criteria of Oral-Facial-Digital Syndrome Type VI. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Jan 11;7
- Romaniello R, Tonelli A, Arrigoni F et al. A novel mutation in the β -tubulin gene TUBB2B associated with complex malformation of cortical development and deficit in axonal guidance. ACCEPTED by *Developmental Medicine & Child Neurology*

ATTIVITÀ PREVISTE

Nel corso del 2011 una delle criticità maggiori è stata l'arruolamento di soggetti con sviluppo neurologico normale da inserire nel protocollo 0. Tale deludente risultato è imputabile soprattutto alla difficoltà di contattare direttamente soggetti minori sani sul territorio. Nell'anno in corso si cercherà di ovviare a questa difficoltà con diversi approcci, ovvero tentando un contatto che passi attraverso i pediatri di libera scelta oppure attraverso le strutture scolastiche sul territorio adiacente all'Istituto.

Per il resto si provvederà a continuare l'arruolamento dei soggetti nei protocolli 1, 2, 3, ad acquisire i dati ed analizzarli, al fine di confermare le osservazioni riportate nel precedente capitolo.

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

DR. ANDREA MARTINUZZI

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

Linea di Ricerca n. 10

Neuroimaging

Periodo di svolgimento

2012

Tipo di ricerca

Corrente

Polo scientifico

Conegliano e Pieve di Soligo

Collaborazioni

IRCCS E. Medea di Bosisio Parini: CeSNE – Centro Studi di Neuroimaging dell'Età Evolutiva: U.O. Neuroriabilitazione 1

Istituto di Fisiologia Clinica CNR-CREAS di Pisa

ULSS 7 Pieve di Soligo: Dipartimento di Immagini

DESCRIZIONE

Esiste un'unica pubblicazione che dettaglia aspetti di analisi MRI volumetrici 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 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 sta-

ta 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.

Obiettivi

1. Descrivere le caratteristiche fenotipiche in termini di neuroimaging in HSP e JPLS molecolarmente definite
2. Correlare le predette caratteristiche con il genotipo
3. 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

È stato definito e condiviso il protocollo di valutazione clinica-strumentale.

È stato definito il protocollo di acquisizione con magnete 1.5T, riscontrando difficoltà non indifferenti per quanto concerne lo spettro da midollo, per il quale si è deciso di ricorrere al magnete disponibile a Pisa (Siemens 3T).

Sono state acquisite le immagini e gli spettri di 64 soggetti, 36 pazienti con diagnosi di HSP e 28 controlli. I dati sono attualmente in corso di elaborazione, e verranno stratificati sulla base della

diagnosi definita di HSP da mutazione nei loci SPG4, SPG7, SPG3a, SPG5, SPG10, SPG11, SPG31, ALS2, ALS4.

È in avvio l'attività di acquisizione RMN presso l'UOP di Bosisio.

Nel contempo il database clinico-neurofisiologico è stato strutturato e condiviso nei contenuti con l'UO di Bosisio. Tale database costituirà lo strumento per la analisi delle correlazioni clinico-genetico-imaging.

Sono partite per i soggetti reclutati nei primi due anni della ricerca i follow-up clinici, mentre per i follow-up di imaging si attende il completamento dell'analisi del primo set di soggetti molecularmente definiti.

ATTIVITÀ PREVISTE

- Acquisizione delle immagini/spettri dei soggetti afferenti l'UO di Bosisio e confronto con i dati elaborati per il set di Conegliano.
- Individuazione degli indicatori specifici e sensibili da seguire nel corso del follow-up in neuroimaging per i soggetti già testati.
- Completamento del follow-up sul set di soggetti già valutati nel primo biennio.
- Elaborazione ed analisi dei dati emergenti dai cluster familiari ALS2 e AOA2
- Conclusione dello studio e elaborazione dei lavori scientifici.

RICERCHE
MINISTERIALI
FINALIZZATE 2009

RAZIONALI

DALLA BIOINGEGNERIA, NUOVI STRUMENTI PER L'IDENTIFICAZIONE DI INDICATORI PRECOCI DI INSUFFICIENZA RESPIRATORIA E CARDIACA IN DISTROFIA MUSCOLARE DI DUCHENNE

FROM BIOENGINEERING NEW TOOLS FOR IDENTIFICATION OF EARLY INDICATORS OF RESPIRATORY AND CARDIAC IMPAIRMENT IN DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY

DR.SSA MARIA GRAZIA D'ANGELO

E-MAIL: GRAZIA.DANGELO@BP.LNF.IT

Linea di ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

Periodo di svolgimento

36 mesi

Tipo di ricerca

Finalizzata

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Politecnico di Milano- TMB Lab. Dipartimento di BioIngegneria
Fondazione IRCCS "Ca' Granda" Ospedale Maggiore Policlinico di Milano:
Dipartimento di Neuroscienze, Laboratorio Biochimica e Genetica

DESCRIZIONE SINTETICA DEL PROGETTO

Gli adolescenti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (DMD), assieme alla perdita del cammino ed al correlato sviluppo della scoliosi, sviluppano cardiomiopatia ed insufficienza respiratoria.

Le anomalie ECGgrafiche possono essere ritrovate già all'inizio dei sintomi neurologici ma rimangono asintomatiche fino ai 10 anni circa. Minime anomalie cardiologiche sono rilevate nel 26% dei soggetti al di sotto dei 6 anni. Nelle fasi avanzate della malattia, le anomalie ECGrafiche (tachicardia sinusale, battiti atriali prematuri, tachicardia ectopica atriale, fibrillazione/flutter atriali, accorciamento dell'intervallo PQ per il 40% dei soggetti) diventano evidenti nel 90% dei casi.

In base allo stadio evolutivo della malattia, l'ecocardiogramma rivela ispessimento della parete miocardica, alterazioni della cinesi parietale (ipocinesia, discinesia ed acinesia), dilatazione delle camere cardiache, anomale valvolari, formazione di trombi, alterazioni sistoliche o diastoliche di entrambi i ventricoli. Attorno ai 14 anni, 1/3 ei ragazzi DMD ha sviluppato ispessimento della parete, attorno ai 18 anni la metà dei soggetti la presenta e al di sopra dei 18 anni l'ispessimento della parete è una costante del quadro cardiologi-

co. L'insufficienza cardiaca si verifica ne 35% dei soggetti.

La gravità del quadro clinico motorio nei ragazzi con distrofia di Duchenne nella tarda adolescenza e successivamente maschera i sintomi di disfunzione cardiaca fino a che essi non sono particolarmente importanti.

D'altro canto, l'esordio dell'insufficienza respiratoria può essere subdolo e la maggior parte dei pazienti con DMD non si rendono conto di aver perso forza nella muscolatura respiratoria fino a quando la tosse non diviene severamente ipovalida al punto da causare frequenti infezioni alle alte vie respiratorie e polmoniti. I sintomi di ipoventilazione notturna comprendono aumento dei risvegli notturni, sonnolenza diurna e cefalea mattutina; più raramente vomito. L'insufficienza respiratoria, spesso associata ad episodi di ab ingestis ed infezioni, è una delle cause più comuni di morte nei soggetti con patologia neuromuscolare, in genere quando la patologia è a un grado avanzato di evoluzione. Dall'avvento della terapia steroidea nella DMD, molti studi hanno dimostrato valori di capacità vitale forzata (FVC) nei pazienti trattati nettamente più alti di quelli nei pazienti non trattati con un aumento anche dei valori ottenuti alla prova del PCF (picco di flusso della tosse) e della forza della muscolatura respiratoria.

In generale, una FVC inferiore al 50% del valore atteso è visto come un indicatore di necessità di ventiloterapia notturna non invasiva. Peraltro noto nella pratica clinica che il timing ottimale per inizio della ventilazione assistita è molto difficile da determinare e i criteri di tale inizio sono ancora poco definiti. La polisonnografia, i test di funzionalità respiratoria e l'emogasanalisi sono test largamente utilizzati per ottenere alcuni parametri per inizio della ventiloterapia. È noto peraltro che l'emogasanalisi eseguita di giorno può risultare normale a dispetto della presenza di sintomi di ipoventilazione notturna, inoltre il 30% dei soggetti iperventila a causa del dolore indotto dal prelievo arterioso, con conseguente risultato di valori di PaCO₂ che devono essere corretti per il pH. Inoltre, i test convenzionali per la funzionalità respiratoria che comprendono i flussi e i volumi espiratori forzati, sono stati definiti per i pazienti con patologie polmonari e delle vie aeree; la capacità vitale misurata nei pazienti in posizione supina non è eseguita nella pratica clinica, ma è la prova in grado di mostrare la debolezza diaframmatici in maniera migliore rispetto alla prova eseguita nella posizione seduta. Alcuni pazienti possono avere una capacità vitale (VC) pressoché normale quando sono seduti, ma questa crolla del 50% quando in posizione supina, causando gravi difficoltà respiratorie da supini appunto.

Molti lavori riportano l'inaccuratezza di considerare la capacità vitale isolata, in particolar modo nella posizione seduta, come un criterio indicatore per la ventiloterapia. Parametri numerici quali la frequenza respiratoria, il respiro rapido e superficiali, a PaCO₂ sono stati indicati come altri parametri per la

ventiloterapia notturna, ma si sono successivamente rivelati poco affidabili. Sebbene la polisonnografia sia abbastanza diffusa e popolare nelle valutazioni dei pazienti con patologia neuromuscolare, si deve sottolineare che i polisonnografi sono stati programmati per interpretare le ipopnee e le apnee di Origine sia centrale che ostruttiva ma non quelle indotte a debolezza della muscolatura respiratoria. Bach e colleghi hanno proposto il (ventilator requirement index (VRI) calcolato attraverso la moltiplicazione dell'indice $(T_i/T_{tot} \times V_t/VC)$ per la frequenza respiratoria o $60 \times T_i/(T_{tot})^2 \times V_t/VC$; evidenziando che questi parametri, ottenuti comunque tramite una semplice spirometria, risultano essere migliori indicatori di necessità di ventiloterapia rispetto alle misure usate isolatamente.

Un altro metodo utilizzato è quello del calcolo di TTmus (indice di tensione della muscolatura inspiratoria - Tension-time index of the inspiratory muscles): in 46 soggetti DMD questo valore aumenta con l'avanzare della malattia ed è un indicatore sensibile della fatica della muscolatura inspiratoria e dell'uso di ventiloterapia.

Inoltre, per testare la forza della muscolatura respiratoria, la pressione generata può essere calcolata sia durante manovre volontarie e durante contrazioni involontarie, tramite la stimolazione del nervo frenico. Questo test richiede però personale esperto e equipaggiamento adeguatamente calibrato.

Le prove volitive come la MIP e la MEP, la pressione di tosse massima richiedono la cooperazione del soggetto (scarsa nei bambini) ed i valori ottenuti spesso sottostimano la forza reale della muscolatura respiratoria. In pazienti con DM più grandi e compromessi, l'attesa di una tardiva comparsa di ipoventilazione diurna può mettere a rischio di insufficienza respiratoria improvvisa, ma contemporaneamente un inizio troppo precoce della ventiloterapia si è dimostrato inefficace.

Al fine di superare tutti i problemi sovraccitati, noi abbiamo programmato di valutare il respiro spontaneo, le manovre massimali e la capacità vitale tramite la tecnica non invasiva della Pletismografia optoelettronica; inoltre l'ecografia del diaframma sarà in grado di testare:

- 1) lo spessore del diaframma nell'area di connessione al torace
- 2) i movimenti craniocaudali e
- 3) le variazioni di questa connessione

La risonanza magnetica (effettuata in soggetti di età maggiore ai 14 anni, senza sedazione) sarà invece in grado di valutare la geometria tridimensionale delle differenti condizioni e dei diversi volumi polmonari.

La pletismografia consentirà di calcolare il volume addominale (come recentemente riportato, indicatore della geometria del diaframma)

Lo studio fornisce pertanto metodi non invasivi capaci di valutare le modifi-

cazioni respiratorie anche avvengono nel tempo nel corso della distrofia di Duchenne.

La OEP fornisce, in modo completamente non invasivo, la misura accurata del volume del volume della parete toraco-addominale e perciò delle variazioni del volume polmonare. Questa tecnica è basata sul rilievo del movimento di un insieme di marcatori retro-riflettenti mediante un sistema automatico optoelettronico di analisi del movimento. I marcatori posti sul torace e sull'addome del soggetto vengono rilevati da un insieme di telecamere e successivamente la loro posizione viene ricostruita nello spazio tridimensionale, ad una frequenza di campionamento pari a 60 Hz; sulla base di un modello geometrico che connette i diversi punti ed approssima la forma della superficie toraco-addominale ad un insieme finito di triangoli è quindi possibile calcolare il volume racchiuso dalla parete toraco-addominale e le sue variazioni durante la respirazione. Considerando il modello geometrico dell'intera parete toraco-addominale è così possibile ottenere le variazioni di volume totali, mentre la definizione di diverse parti del tronco consente il calcolo delle variazioni di volume dei diversi compartimenti della gabbia toracica e dell'addome. L'approccio utilizzato consente non solo la misura delle variazioni totali di volume, ma delle variazioni di volume dei diversi compartimenti del tronco (gabbia toracica polmonare, gabbia toracica diaframmatica ed addome); inoltre, al contrario degli altri metodi fino ad oggi utilizzati, è possibile quantificare le asimmetrie di ventilazione in senso verticale (destro e sinistro), totali e suddivise per compartimenti.

La OEP costituisce perciò un importante strumento per la valutazione funzionale respiratoria dei pazienti DMD. I principali vantaggi della OEP sono:

- a) l'accuratezza di misura dei volumi totali e compartimentali della parete toraco-addominale;
- b) la possibilità di determinare in modo completo ed accurato il pattern ventilatorio in modo completamente non invasivo e senza l'utilizzo di boccagli e/o collaborazione da parte del paziente;
- c) la possibilità di seguire le variazioni dei volumi di fine inspirazione e fine espirazione del volume totale e dei diversi compartimenti;
- d) la possibilità di analizzare il paziente in diverse posture (ad esempio seduto su carrozzina e in posizione supina);
- e) la possibilità di analizzare il paziente durante il sonno (le telecamere operano infatti nell'infrarosso e quindi è possibile effettuare le misure nell'oscurità);
- f) la possibilità di analizzare il paziente durante diverse modalità di ventilazione meccanica [Aliverti A, in press, 2006], di combinare le misure di volume con altre misure (quali ad es. quella del flusso e della pressione alle vie aeree) e di determinare in modo accurato la ventilazione del paziente. Nel caso di ventilazione non invasiva, infatti, la misura del flusso alle vie aeree spesso

non consente di determinare l'effettiva ventilazione polmonare a causa delle perdite di aria a livello dell'interfaccia ventilatore/paziente (solitamente maschere nasali).

Alla Pletismografia Optoelettronica saranno unite tecniche di imaging quali (per ora ancora esplorative nell'ambito della muscolatura respiratoria).

Lo scopo dello studio è quello di confrontare diverse metodiche non-invasive per valutare la funzione del diaframma, più specificamente la sua geometria ed il suo movimento, nella distrofia muscolare di Duchenne. Due diverse metodiche saranno considerate: a) ultrasonografia, b) pletismografia optoelettronica. Per quanto riguarda l'analisi ultrasonografica, si analizzeranno, con diverse metodologie e diverse condizioni (respirazione spontanea, manovre massimali e di capacità vitale) i seguenti parametri: 1) spessore del diaframma nella sua zona di apposizione sulla gabbia toracica; 2) movimento cranio-caudale del diaframma; 3) variazione della zona di apposizione del diaframma. L'analisi di risonanza magnetica consentirà la determinazione della geometria tridimensionale della superficie del diaframma a diversi volumi polmonari. L'analisi mediante pletismografia optoelettronica consentirà di valutare, nelle condizioni sopra riportate, le corrispondenti variazioni di volume addominale, che recentemente si è dimostrato un ottimo indice di variazione di geometria diaframmatica. Il confronto tra le diverse metodiche sarà effettuato sia su soggetti sani, utilizzati come riferimento, sia su soggetti patologici.

La possibilità di valutare in maniera dettagliata i cambiamenti nella funzionalità del diaframma potrebbe avere un doppio vantaggio: da un lato ci permetterebbe di porre in essere, come già detto, terapie specifiche per la funzionalità respiratoria, dall'altro ci potrebbe anche permettere di avere un metodo assolutamente non invasivo di testare l'efficacia delle nuove terapie sperimentali volte alla riduzione della degenerazione muscolare tipica della malattia e alla stimolazione della rigenerazione (farmacologiche o genetiche o cellule mediate tramite cellule staminali).

RELAZIONE TRA CIBO, MICOTOSSINE, DISTURBI GASTROINTESTINALI E AUTISMO: UN APPROCCIO MULTIDISCIPLINARE PER L'INDAGINE A LIVELLO MOLECOLARE

THE RELATIONSHIP AMONG FOOD, MYCOTOXINS, GASTROINTESTINAL DISORDERS AND AUTISM: A MULTIDISCIPLINARY APPROACH FOR THE MOLECULAR INVESTIGATION

DR.SSA ANNA MARABOTTI

E-MAIL: ANNA.MARABOTTI@ITB.CNR.IT

Linea di ricerca n. 5

Neurobiologia

Periodo di svolgimento

36 mesi

Tipo di ricerca

Finalizzata – Giovani Ricercatori

Polo Scientifico

Bosisio Parini

Collaborazioni

Istituto Superiore di Sanità di Roma: Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare - Reparto OGM e Micotossine e Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare
Consiglio Nazionale

DESCRIZIONE SINTETICA DEL PROGETTO

L'interazione tra cibo, fattori genetici, disturbi gastrointestinali (GI) e malattie neuropsichiatriche è presente in diverse patologie umane. A titolo di esempio, alcune malattie metaboliche rare causano effetti sia a livello del tratto GI, sia a livello neurologico/psichiatrico. Un esempio significativo è dato dalla galattosemia classica, una malattia rara causata da mutazioni nel gene codificante per galattosio-1-fosfato uridiltransferasi, un enzima coinvolto nel metabolismo del galattosio. Il danneggiamento della sua attività non causa solo effetti negativi a livello GI (ad es. epatomegalia, vomito, diarrea), ma anche disturbi del linguaggio e disabilità cognitive, e anche un persistente ritardo mentale. Pertanto, è possibile ipotizzare che lo sviluppo corretto delle abilità mentali e neuronali durante l'infanzia è estremamente sensibile a disfunzioni correlate al cibo e a disturbi GI.

I disturbi dello spettro autistico (ASD) sono un insieme di disordini dello sviluppo descritti per la prima volta da Kanner nel 1943. Sono una malattia multifattoriale a eziologia incerta [Rapin 2002, Volkmar e Pauls 2003], ed un certo numero di fattori sono stati coinvolti nella sua patogenesi, tra cui una componente genetica diretta, che peraltro rappresenta meno del 10% dei

casi [Persico e Bourgeron 2006], fattori epigenetici e fattori ambientali. In un primo tempo considerata una malattia rara, il notevole aumento dell'incidenza di casi di ASD negli ultimi decenni [Rice et al 2007, Kuehn et al 2007], sebbene parzialmente spiegato dall'uso di criteri diagnostici migliori e dall'aumento dell'attenzione da parte dei medici, induce a pensare che l'aumento dell'esposizione a fattori ambientali possa giocare un ruolo nella sua eziologia. Alcuni studi hanno ricercato un ruolo per diversi xenobiotici, tra cui metalli pesanti (in particolare arsenico, piombo e mercurio) [Bernard et al 2002, Lamphear et al 2005, Trasande et al 2005, Wright et al 2006], patogeni tra cui il virus della rosolia o citomegalovirus [Chess et al 1978, Yamashita et al 2003] e pesticidi (in particolare derivati organofosforici) [D'Amelio et al 2005], nell'indurre ASD. Tuttavia, diversi risultati sono contraddittori e non è ancora stato possibile stabilire una chiara correlazione. Probabilmente, la variabilità genetica gioca a sua volta un ruolo fondamentale nel modulare la suscettibilità di un individuo a diversi fattori ambientali. Infatti, diversi studi hanno ipotizzato la presenza di geni di vulnerabilità con varianti comuni in grado potenzialmente di innalzare il rischio di sviluppare ASD ma non in grado di causare ASD di per sé [Persico e Bourgeron 2006].

Nelle persone con ASD, i disturbi GI e i sintomi ad essi associati sono riportati comunemente, sebbene la loro esatta prevalenza sia non ancora perfettamente spiegata e vari dal 9 al 70% e più a seconda degli studi epidemiologici condotti e disponibili [Buie et al 2010]. Tra le varie cause ipotizzate per questi disturbi GI associati ad ASD, una delle cause più popolari è l'"ipotesi dell'intestino permeabile" ("leaky gut hypothesis") [White 2003] che ipotizza che l'alterata permeabilità intestinale permetta l'entrata di molecole quali tossine nel flusso sanguigno, in grado sia di colpire direttamente il sistema nervoso centrale (CNS), sia di causare sensibilizzazione del sistema immunitario della mucosa dell'intestino. Questo potrebbe promuovere anche l'insorgenza di una condizione patologica simile ad una allergia al cibo.

Le micotossine sono contaminanti del cibo presenti in maniera ubiquitaria e derivati dal metabolismo secondario di diverse muffe e funghi [Fox e Howlett 2008]. Alcune micotossine sono note per i loro effetti negativi sull'organismo umano, ad esempio le aflatossine promuovono carcinogenesi epatica ed hanno un'alta attività genotossica, l'ocratossina ha un'attività nefrotossica, lo zearalenone mostra effetti estrogenici, le fumonisine interferiscono con la sintesi de novo dei complessi glico-sfingolipidi causando alterazioni nei processi cellulari, e infine le gliotossine possiedono proprietà immunosoppressive [Richard 2007, Waring e Beaver 1996]. Il consumo di diversi cibi, specialmente quelli derivati da latte e cereali espone le persone all'assunzione di micotossine, e l'Unione Europea ha introdotto livelli massimi di micotossine nel cibo e negli alimenti per animali. Tuttavia, gli effetti delle micotossine in

concentrazioni subliminali non sono noti. Inoltre è importante considerare che i bambini possono essere più esposti degli adulti alle micotossine, per la loro dieta particolare (essenzialmente latte fino a 1 anno di età, successivamente con introduzione di cereali), per la bassa variabilità della dieta rispetto agli adulti e per il fatto che un neonato assume più cibo di un adulto, in rapporto al peso corporeo. Essendo assunte con la dieta, le micotossine potrebbero promuovere subdoli effetti negativi difficili da identificare e correlati alla contaminazione da micotossine nel tratto GI e in altri tessuti, causando serie conseguenze negative sullo sviluppo corretto, o giocando un ruolo nello sviluppo di sindromi ad eziologia sconosciuta.

Anche il coinvolgimento del sistema immunitario nello sviluppo di problemi neurocomportamentali dovrebbe essere studiato con maggiore attenzione per l'insorgenza di autismo, dato che vi sono evidenze di una relazione. Precedenti studi di analisi massive del genoma (genome-wide analysis, GWA) e analisi immunologiche su popolazioni di pazienti autistici hanno già mostrato il coinvolgimento di geni dell'autoimmunità o dell'immunità diversi da quei geni di rischio coinvolti nello sviluppo del CNS, suggerendo la presenza di un'interazione aberrante neuro-autoimmune durante lo sviluppo neurologico [Odell et al 2005, Ashwood et al 2006]. D'altro canto, studi genetici di malattie autoimmuni hanno trovato un'associazione tra la storia familiare di disturbi autoimmuni e autismo [Enstrom et al 2009a,b, Atladottir et al 2010]. Numerose pubblicazioni recenti si sono focalizzate sulle disfunzioni immunitarie e presenza di autoimmunità in vari disordini neuropsichiatrici, compreso l'autismo [Lang et al 2003, Ashwood et al 2006]. È interessante notare che molti dei farmaci antipsicotici prescritti a pazienti con schizofrenia, tra cui la clozapina e l'aloiperidolo, sono noti per i loro potenti effetti immunosoppressivi in aggiunta alla loro azione principale [Leykin et al 1997, Ashwood et al 2006]. Infine, alcuni studi hanno evidenziato che una percentuale significativa di pazienti autistici mostra un alto numero di anticorpi antigliadina e anti-proteine del latte che mostrano reattività crociata con peptidi cerebellari [Vojdani et al 2002, 2004]. Questa situazione è in qualche modo simile a quella di persone con sindrome da malassorbimento intestinale e morbo celiaco, che spesso mostrano anche disturbi neurocomportamentali [Cooke e Thomas-Smith 1966, Hadjivassiliou et al 1998]. Da queste osservazioni è possibile ipotizzare che le proteine di cereali e latte, introdotte nel tratto GI, possono essere in grado di indurre l'insorgenza di una reazione immunitaria nel corpo di pazienti geneticamente predisposti, sostenuta dall'attivazione di mediatori dell'infiammazione. Questi anticorpi potrebbero quindi oltrepassare la barriera ematoencefalica e combinarsi con gli antigeni del tessuto cerebrale strutturalmente simili a quelli che hanno indotto la formazione di anticorpi, danneggiando il tessuto nervoso [Vojdani et al 2002] e causando l'insorgenza

di ASD. Analogamente, in altre persone una reazione immunitaria potrebbe essere causata non tanto da glutine e caseina di per sé, ma da micotossine legate a differenti frazioni proteiche nel latte o nel glutine. L'assunzione di cibi contaminati da micotossine, anche in quantità estremamente basse, potrebbe indurre direttamente lo sviluppo di una reazione immunitaria che potrebbe portare alla formazione di anticorpi diretti contro autoantigeni strutturalmente simili agli antigeni xenobiotici, o promuovere l'insorgenza di una sindrome da malassorbimento che potrebbe esporre l'intero organismo, incluso il CNS, agli effetti negativi degli xenobiotici. La dieta priva di glutine e caseina ("gluten-free casein-free", GFCF) sta diventando sempre più popolare nelle famiglie dei pazienti autistici, ma i dati attualmente disponibili non sono a favore di una sua efficacia generale [Elder 2008, Buie et al 2010]. Il successo della dieta GFCF potrebbe essere causato da questo meccanismo: solo i soggetti in cui una reazione autoimmune è iniziata dopo il contatto con derivati del glutine o della caseina potrebbero rispondere positivamente a questa dieta. Pertanto, evitare questi alimenti che sono spesso contaminati anche da micotossine potrebbe essere utile per quei pazienti che hanno sviluppato una risposta immunitaria, mentre potrebbe rivelarsi inefficace in altri casi.

Tutte le informazioni fin qui menzionate e disponibili in letteratura derivano da osservazioni sporadiche, spesso non correlate tra loro, prese da gruppi disomogenei di pazienti. Pertanto, non è possibile estrarre risultati netti da questi studi.

Lo scopo del presente progetto è quello di adottare un approccio sistematico per verificare la presenza di un'effettiva correlazione tra cibo, micotossine, disturbi gastrointestinali e ASD, e in aggiunta a ciò cercare una spiegazione molecolare per questa correlazione. Pertanto, partendo da un gruppo selezionato di pazienti con ASD, investigheremo il loro profilo genomico, trascrittomico e proteomico, la presenza di intolleranza al glutine e/o alle proteine del latte, la presenza di allergie, la presenza di uno stato di infiammazione cronica sulla base del loro profilo citochinico, la presenza e la quantità di micotossine nei loro fluidi corporei, e questi fattori verranno correlati con il loro stato clinico. Tutti i set di dati verranno elaborati con l'aiuto di metodologie statistiche e bioinformatiche per estrarre i pattern di fattori genetici ed epigenetici che possono essere associati ad una maggiore sensibilità alle micotossine, e/o ai disturbi GI, e/o a presenza di allergie o intolleranze alimentari. In questo modo potremo essere in grado di identificare nuove alterazioni geniche, o predisposizioni genetiche, o cammini metabolici collegati direttamente o indirettamente all'ASD, per migliorare quindi la diagnosi e la cura di questo disordine. La spiegazione di queste relazioni permetterà lo sviluppo di approcci razionali per evitare la cascata di effetti negativi che seguono l'interazione tra cibo, xenobiotici e componenti endogeni. Ad esem-

pio, la conoscenza dei markers genetici che predispongono alla maggiore sensibilità verso xenobiotici potrebbe permettere la creazione di chip a bassa densità per una diagnosi precoce e una precoce pianificazione di trattamenti. Inoltre questo permetterebbe un grande miglioramento nel trattamento dei pazienti con ASD, dato che potrebbe condurre a suggerimenti personalizzati sul tipo di intervento da adottare in caso di ASD, ad esempio selezionando le persone che potrebbero avvantaggiarsi della dieta GFCF sulla base del loro particolare aplotipo.

In parallelo, metodi di biologia computazionale (in particolare approcci di reverse docking) saranno usati per predire le macromolecole che possono legare le micotossine e/o gli antigeni del cibo, promuovendo gli effetti negativi nei pazienti con ASD. I risultati di queste predizioni saranno confrontati con i risultati sperimentali e potranno aiutare nella ricerca di possibili interattori. Infine, se saranno disponibili, o potranno essere ottenute con metodi di modellamento molecolare, informazioni strutturali sulle macromolecole che interagiscono con le micotossine e/o con gli antigeni del cibo, verranno svolte analisi computazionali allo scopo di analizzare i complessi molecolari e scoprire le interazioni più importanti. Queste informazioni potranno essere utili per ipotizzare il disegno razionale di molecole in grado di interrompere queste interazioni e quindi di proteggere le persone più sensibili dagli effetti negativi di queste interazioni.