

# LE LINEE DI RICERCA



# LINEA DI RICERCA N. 1

## NEUROPATOLOGIA

### RESPONSABILE:

#### RENATO BORGATTI

Per il curriculum vitae si rimanda a pag. 15

### COLLABORATORI

Rita Grasso – Aiuto

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Chiara Gagliardi – Aiuto

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Anna Cavallini – Assistente

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Maria Lorella Missaglia – Assistente

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Marco Pessina – Assistente

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Giuseppina Giammari Aldè – Consulente

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Romina Romaniello – Borsista

*Specialista in Neuropsichiatria Infantile*

Susan Marelli – Borsista

*Specialista in Genetica Medica*

Onorina Schiano Moriello – Psicologo

Rosario Montiroso – Psicologo

Patrizia Cozzi – Psicologo

Barbara Premoli – Psicologo

Claudio Premarini – Pedagogista

Massimo Guerreschi – Pedagogista

Ersilia Riva – Assistente Sociale

### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

È possibile individuare sei ambiti principali di ricerca:

#### Studio delle malformazioni cerebrali

Quello delle malformazioni cerebrali rappresenta uno degli ambiti dove maggiormente si è sviluppata l'area di ricerca di neuropatologia. Per ogni paziente è stata predisposta una scheda di raccolta dati informatizzata per consentire una rapida consultazione a scopi di ricerca, che comprende informazioni di tipo anamnestico,

clinico e strumentale. È possibile individuare tre filoni lungo i quali si sono aggregate le principali ricerche: I) Malformazioni dello Sviluppo Corticale; II) Malformazioni del Cervelletto e della Fossa Cranica Posteriore; III) Malformazioni delle Strutture Commessurali. Per ognuno di questi quadri la ricerca genetica (cariotipo, ricerca delezioni sub-telomeriche, analisi di mutazione per geni noti) e la raccolta di pazienti, la loro precisa classificazione e lo studio in follow-up nel tempo rappresentano la base per i successivi studi di correlazione genotipo-fenotipo che consentono di valutare l'associazione fra le mutazioni identificate e la variabilità fenotipica.

#### Epilessia

L'epilessia rappresenta insieme al ritardo mentale la patologia più frequentemente associata alle cerebropatie dell'età evolutiva indipendentemente dalla causa che le ha determinate. Le linee di ricerca che si sono sviluppate in questo ambito sono nate da esigenze cliniche di gestione della popolazione di pazienti che afferiscono ai Centri dell'Istituto, per la maggior parte bambini ed adolescenti affetti da Epilessie sintomatiche e, solo più recentemente, si è posta particolare attenzione anche ad alcune forme idiopatiche (in particolare BFNC). Per quanto riguarda la ricerca si possono distinguere studi I) su epilessie sintomatiche associate a malformazioni dello sviluppo corticale su base genetica (geni DCX, LIS1, FLN1, FCMD e RELN); II) epilessie idiopatiche parziali (geni CHRNA4 e CHRNB2; LGI1); III) epilessie idiopatiche generalizzate tipo GEFS+ (geni SCN1A, SCN1B, GABRG2); IV) epilessie idiopatiche con crisi sia generalizzate che parziali tipo BFNC e BFIC (geni KCNQ2, KCNQ3); V) epilessie tipo sindrome di West X-linked associate a ritardo mentale e fenotipi complessi (geni STK9 e ARX) tutte finalizzate a valutare la correlazione fra le mutazioni identificate ed il fenotipo epilettico.

#### Malattie rare con ritardo mentale

La presa in carico, sia a fini diagnostici che, ancor di più, a fini riabilitativi, del paziente con ritardo mentale appartiene alla storia e alla tradi-

zione dell'Associazione La Nostra Famiglia da cui l'RCCS si è gemmato. Per quanto attiene all'Area di Neuropatologia la ricerca si è essenzialmente orientata allo studio delle cause e dei diversi quadri sindromici che accompagnano il ritardo mentale. Si possono così distinguere: 1) studi centrati sulla messa a punto di protocolli diagnostico-valutativi del Ritardo Mentale associato a patologie genetiche note (progetti di ricerca riguardano le Sindromi di Williams, Down, Angelman, Prader-Willy, Inv-dup15, Cornelia De Lange, Wolf). 2) Studi relativi a soggetti in cui il Ritardo Mentale è associato ad un quadro plurimalformativo complesso non ascrivibile ad alcun quadro sindromico noto attraverso l'impiego della tecnica CGH-array che consente l'analisi del genoma totale ad alta risoluzione fornendo informazioni direttamente rapportabili alle mappe genetiche e fisiche del genoma umano. 3) Studi di soggetti in cui il ritardo mentale non si associa ad alcun altro segno distintivo (RM Non Sindromico Idiopatico) e presenta un andamento familiare compatibile con una trasmissione X-linked (partecipazione al network nazionale "X-linked MR" coordinato dalla Professoressa Reinieri di Siena).

### Deficit neuropsicologici

La neuropsicologia dell'età evolutiva è una branca delle neuroscienze che ha come scopo lo studio delle funzioni cerebrali superiori e la loro correlazione con le strutture cerebrali in una fase in cui i processi di plasticità e di progressiva organizzazione delle funzioni comportano rimodellamenti complessi. In particolare la ricerca nell'ambito dei deficit neuropsicologici si è concentrata sullo studio di alcune funzioni - integrazione percettivo/spaziale; organizzazione prassica e prassico costruttiva; attenzione; memoria implicita; emozioni espresse dai volti; funzioni esecutive - in quadri sindromici/malattie rare e in lesioni cerebrali congenite e/o malformative.

### Disturbi neuro-oftalmologici

La neuro-oftalmologia, sorta inizialmente come branca di supporto allo studio dei disturbi visivi di bambini con patologie cerebrali complesse, ha acquisito nel corso degli anni un notevole sviluppo muovendosi ora come realtà autonoma anche nel campo della ricerca. Si possono individuare almeno tre principali ambiti di ricerca: I) Le Degenerazioni Retiniche Eredo Familiari: un gruppo eterogeneo di disordini genetici di frequente

riscontro clinico che possono presentarsi come anomalie isolate in soggetti peraltro normali o, più raramente, associarsi ad altre anomalie sistemiche nell'ambito di quadri sindromici a prevalente carattere malformativo. II) I Disturbi Visivi di Origine Centrale ambito all'interno del quale viene affrontata la complessa problematica della disfunzione visiva conseguente a lesioni cerebrali. Il medesimo evento che provoca il disturbo visivo può anche interessare il nervo ottico o altre aree cerebrali per cui la maggior parte dei soggetti sono portatori di multihandicap, rappresentati in genere da paralisi cerebrale infantile, ritardo mentale, epilessia. III) Un terzo ambito di ricerca è rappresentato dallo Studio dei Disturbi dei Movimenti Oculari un capitolo di estrema importanza in un approccio globale al paziente di età pediatrica. Infatti le anomalie della motilità oculare e della visione binoculare hanno una alta incidenza nella popolazione generale (4-8%) percentuale che sale fino al 50% se ci si riferisce solo a soggetti portatori di handicap.

### Studio dello sviluppo emozionale nei primi tre anni di vita

La salute mentale del bambino da zero a tre anni può essere considerata sinonimo di un equilibrato sviluppo socio-emozionale. In quest'ambito l'attività clinica e di ricerca è rivolta a individuare segnali di disagio con l'obiettivo di prevenire e trattare precocemente eventuali difficoltà di sviluppo in soggetti a rischio evolutivo (ad esempio, nascita pretermine, ritardo psicomotorio, ecc.). La maggior parte dell'attività svolta ha come area di indagine specifica l'analisi della qualità della relazione madre-bambino e dello sviluppo affettivo. La metodologia di indagine è basata prevalentemente sull'osservazione del comportamento infantile nel corso della quale il bambino è posto in una condizione di stress relazionale compatibile con la sua età. Si tratta della procedura nota come paradigma Still-Face messo a punto dal prof. Tronick della Harvard medical school University di Boston che oltre a prevedere due brevi periodi di interazioni viso-a-viso, implica anche un breve periodo nel corso del quale alla madre viene chiesto di mantenere un'espressione neutra, di non parlare e/o toccare il bambino. Tale condizione genera nel bambino una tipica reazione che permette di valutare la sua capacità di regolazione emozionale, nonché lo stile relazionale della madre nello scambio affettivo con il bambino.

**REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005****Ricerca Ministeriale Corrente 2005:**

- Screening ad alta risoluzione mediante CGH-array (comparative genomic Hybridization) in soggetti con quadro malformativo complesso
- Leucoencefalopatie genetiche: studio clinico-neuroradiologico e genetico
- Studio della qualità delle cure, dei livelli di stimolazione e dei processi di regolazione precoce del bambino pretermine come fattori predittivi della qualità della relazione madre-bambino
- Disturbi visuo percettivi complessi in quadri disfunzionali in età evolutiva: la dislessia e la Sindrome di Williams

**Altri progetti:**

- “Studio longitudinale sulla qualità della vita, la qualità delle cure e il consumo di risorse nel neonato pretermine” – Capofila Ospedale Manzoni, Lecco

**REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006****Ricerca Ministeriale Corrente 2006:**

- Screening ad alta risoluzione mediante CGH-array (comparative genomic Hybridization) in soggetti con quadro malformativo complesso
- Studio della qualità delle cure, dei livelli di stimolazione e dei processi di regolazione precoce del bambino pretermine come fattori predittivi della qualità della relazione madre-bambino
- Deficit visuocognitivi e disturbi della occlusione in soggetti affetti da Paralisi Cerebrale Infantile (quadri di diparesi): frequenza, distribuzione, tipologia e correlazioni per l'inquadramento diagnostico ed il progetto riabilitativo
- Valutazione del campo visivo e dell'attenzione spaziale e sostenuta in soggetti con dislessia evolutiva

**Altri progetti:**

- “Studio longitudinale sulla qualità della vita, la qualità delle cure e il consumo di risorse nel neonato pretermine” – Capofila Ospedale Manzoni, Lecco
- AISEA – Valutazione dello stato di salute, del livello di funzionamento e del grado di dis-

bilità attraverso la Classificazione ICF in una popolazione affetta da Emiplegia Alternante

**VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO “TRASLAZIONALE” DELLE RICERCHE CONDOTTE)**

La linea di ricerca in Neuropatologia ha sviluppato da sempre progetti di ricerca strettamente connessi alla attività di diagnosi e cura svolta all'interno dell'IRCCS E. Medea per cui ogni progetto di ricerca ha sempre avuto ricadute applicative dirette sull'attività clinica.

In particolare i progetti di ricerca relativi alle *Malformazioni Cerebrali* hanno consentito di sviluppare protocolli di studio e di classificazione utili ad organizzare percorsi diagnostici programmati in gradi progressivi (messa a punto di flow-chart diagnostici).

Parimente le ricerche genetiche svolte nel campo dell'*Epilessia* hanno migliorato il livello diagnostico e consentito anche più adeguati counselling genetici per la valutazione di rischi riproduttivi. Le ricerche in ambito farmacologico, ed in particolare la ricerca finalizzata 2003 (Studio delle complessità fenotipica delle epilessie attraverso un approccio integrato di genetica, biochimica e farmacogenomica) dedicata alle epilessie farmacoresistenti ha consentito di definire approcci terapeutici più razionali in pazienti molto complessi. Le ricerche svolte nell'ambito delle *Malattie Rare con Ritardo Mentale* hanno consentito di sviluppare sia protocolli diagnostici che di intervento riabilitativo. In particolare la ricerca mediante la tecnica CGH-array ha consentito l'identificazione di nuovi geni candidati per la diagnosi di Ritardo Mentale e la comprensione delle basi cromosomiche di nuove sindromi e di nuove condizioni genetiche esistenti.

La ricerca in *Ambito Neuropsicologico* ha messo a punto protocolli di valutazione di alta specializzazione relativi a: I) Quadri Malformativi (malformazioni cerebellari e agenesia del corpo calloso); II) Sindromi Genetiche (Sindrome di Down e Sindrome di Williams); III) Sindromi Epiletiche (per le valutazioni pre-chirurgiche e per lo studio degli effetti della introduzione e sospensione dei farmaci antiepilettici).

La ricerca nell'ambito del *Paziente Ipovedente*, posandosi su migliaia di casi seguiti anche per molti anni, indipendentemente dalla causa che ha determinato il difetto, ha sviluppato competenze non solo per gli aspetti diagnostici ma soprattutto per quelli riabilitativi consentendo di mettere a

punto protocolli di intervento per bambini in diverse fasce di età e per differenti quadri clinici.

Dal punto di vista scientifico le *ricerche sullo Sviluppo Socio-Relazionale da zero a tre anni* permettono di ampliare le nostre conoscenze circa la salute mentale del bambino. Inoltre forniscono importanti elementi per promuovere l'attività degli operatori e dei genitori finalizzandola a migliorare la qualità dello sviluppo socio-emozionale e quindi, in definitiva, la qualità della vita dei bambini e delle loro famiglie. Dal punto di vista clinico la precoce valutazione delle capacità di regolazione e delle competenze relazionali permette di individuare indicatori in grado di indirizzare interventi riabilitativi mirati e tempestivi. In termini operativi questo significa poter integrare la diagnostica di routine con una accurata pianificazione di obiettivi riabilitativi. Non solo ma permette di fornire ai genitori indicazioni dettagliate sullo stile relazionale e sul comportamento del loro bambino in modo da facilitarne gli scambi affettivi e limitare e/o prevenire ulteriori disagi.

### **PUBBLICAZIONI PRODOTTE**

Piccinelli P, Borgatti R, Nicoli F, Calcagno P, Bassi MT, Quadrelli M, Rossi G, Lanzi G, Balottin U.: RELATIONSHIP BETWEEN MIGRAINE AND EPILEPSY IN PEDIATRIC AGE. *Headache* 2006 Mar;46(3):413-421

Ruberto G, Salati R, Milano G, Bertone C, Tinelli C, Fazzi E, Guagliano R, Signorini S, Borgatti R, Bianchi A, Bianchi PE.: CHANGES IN THE OPTIC DISC EXCAVATION OF CHILDREN AFFECTED BY CEREBRAL VISUAL IMPAIRMENT: A TOMOGRAPHIC ANALYSIS. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006 Feb;47(2):484-8

Frigerio E, Burt DM, Gagliardi C, Cioffi G, Martelli S, Perret DI, Borgatti R.: IS EVERYBODY ALWAYS MY FRIEND? PERCEPTION OF APPROACHABILITY IN WILLIAMS SYNDROME. *Neuropsychologia* 2006;44(2):254-259

# LINEA DI RICERCA N.2

## RIABILITAZIONE NEUROMOTORIA E NEUROPSICOLOGIA FUNZIONALE

### RESPONSABILI:

**ANNA CARLA TURCONI**

**SANDRA STRAZZER**

Per il curriculum vitae di Anna Carla Turconi si rimanda a pag. 26 mentre per quello di Sandra Strazzer a pag. 23

### COLLABORATORI

*Riabilitazione Funzionale*

Paolo Frascini - Aiuto Fisiatra

Luigi Piccinini - Aiuto Fisiatra

Grazia D'Angelo - Aiuto Neurologo

Elena Beretta - Fisiatra

Sara Bonato - Neurologo

Giovanna Cerina - Fisiatra

Chiara Germinasi - Fisiatra

Cristina Maghini - Fisiatra

Simona Pochintesta - Fisiatra

*Unità Operativa NR3*

Geraldina Poggi - Aiuto Neuropsichiatria

Alessandra Bardoni - Aiuto Neurologo

Sara Galbiati - Neurologo

Francesca Formica - Neuropsichiatria

Federica Locatelli - Neurologo

Paolo Avantaggiato - Neuropsichiatria

### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

È possibile individuare attualmente i seguenti ambiti principali di ricerca:

#### **Paralisi Cerebrali Infantili (PCI)**

Si definisce PCI una turba persistente ma non immutabile della postura e del movimento dovuta ad alterazioni della funzione cerebrale per cause pre-peri-post natali, prima che se ne completi la crescita e lo sviluppo. L'attività di ricerca in questo campo ha portato alla realizzazione delle Linee Guida per la Riabilitazione nelle PCI sotto il patrocinio della S.I.M.F.E.R.-S.I.N.P.I.A. È in atto una collaborazione continua per iniziative formative e scientifiche del Gruppo Italiano Paralisi Cerebrali Infantili (GIPCI). È in atto uno studio multicentrico sull'efficacia della Constraint Induced Therapy (CIT) nel bambino emiplegico.

Tale terapia prevede la penalizzazione mediante costrizione parziale dell'arto sano abbinata ad allenamento intensivo dell'arto plegico col proposito di migliorare l'utilizzo di tale arto sulla scorta delle evidenze sperimentali e cliniche che comprovano l'efficacia di tale approccio terapeutico.

#### **Malattie neuromuscolari: comprende studi su patologie specifiche**

##### **Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD)**

2 studi:

1) È in corso uno studio per descrivere il profilo cognitivo e neuropsicologico di 40 bambini italiani affetti da distrofia muscolare di Duchenne valutando il livello intellettivo, le abilità linguistiche e di lettura, l'attenzione e la memoria. Nell'insieme i soggetti DMD non presentano disturbi specifici di linguaggio; in alcune valutazioni linguistiche i bambini distrofici hanno ottenuto punteggi al di sotto dei valori medi, sono emerse "difficoltà" di comprensione grammaticale e sintattica e lievi difficoltà nelle prove che esaminano le modalità visive, in particolare nell'attenzione visiva.

2) Viene studiato il pattern di attivazione cerebrale alla risonanza magnetica funzionale per derivare il possibile ruolo della distrofina cerebrale nei processi cognitivi. I test selezionati coinvolgono la memoria e l'attenzione visiva (che sono risultate deficitarie in questa patologia), la memoria e l'attenzione uditiva (nei limiti di norma) e la comprensione grammaticale. Il protocollo sperimentale è completo e deve essere applicato sui pazienti.

##### **Paraparesi spastica familiare**

Studio clinico funzionale e correlazione genotipica. Molti soggetti sono stati definiti da un punto di vista genetico. Nello studio funzionale è inclusa l'analisi optoelettronica del cammino che evidenzia pattern tipici di iperestensione di ginocchio in mid-terminal stance di durata ed entità maggiore rispetto al pattern dei diparesi da esiti di sofferenza neonatale. In alcuni dei soggetti è

documentabile un aumento dell'area della base di appoggio a supporto della presenza di segni di coinvolgimento cerebellare.

### **Distrofie Muscolari dei Cingoli**

Lo studio si inserisce in una collaborazione multicentrica italiana che ha portato alla raccolta di un'ampia casistica di pazienti e ad una dettagliata descrizione del rapporto fenotipo/genotipo. Nella casistica è stato selezionato un gruppo di 41 pazienti sulla base della presenza di un fenotipo clinico cingolare, di un'anamnesi positiva per iperCPKemia sintomatica o di un quadro distrofico all'analisi morfologica della biopsia muscolare, in presenza di una normale espressione della distrofina. I pazienti sono stati quindi suddivisi in base al deficit proteico all'analisi di WB o, se già disponibile, all'esito dell'analisi genetica. Correlazioni fenotipo/genotipo sono state poste in essere.

### **Gravi Cerebrolesioni Acquisite (GCLA)**

Le GCLA rappresentano sempre più un problema ad alta rilevanza medica e sociale anche in età evolutiva. Per GCLA si intendono, secondo le linee guida italiane, le patologie acquisite (traumatiche, anossiche, infettive...) che determinano nel soggetto un coma grave in fase acuta (GCS <8). Accanto alle GCLA un'altra patologia acquisita del Sistema Nervoso Centrale, frequente in età pediatrica, è rappresentata dai tumori cerebrali.

Gli ambiti di ricerca per le GCLA sono diversi e hanno riguardato uno Studio Nazionale multicentrico prospettico sulle caratteristiche cliniche delle gravi cerebrolesioni acquisite e riabilitazione nel bambino 0-14 anni, promosso dal nostro Istituto, iniziato a maggio 2004 e terminato ad agosto 2006 che ha visto la partecipazione di diversi Centri Italiani (STUDIOGISCAR ETÀ EVOLUTIVA).

La sopravvivenza anche di casi gravi di GCLA rende necessario un approccio multidisciplinare specializzato e complesso sia nella fase acuta, con interventi tempestivi e appropriati, che nella fase post-acuta dove assumono particolare rilevanza gli interventi riabilitativi. In età pediatrica l'evento lesivo interviene su strutture nervose e funzioni in fase di maturazione, e questo può determinare una regressione, un arresto o una distorsione dei processi di sviluppo motorio, sensoriale, cognitivo ed affettivo comportamentale, rendendo spesso più complesso e prolungato

l'iter riabilitativo. Non va dimenticato che trattandosi di soggetti in età scolare vengono spesso anche pregiudicati gli apprendimenti formalizzati. Ne deriva la necessità di una valutazione clinica e di un progetto riabilitativo ad hoc che richiede lo studio di casistiche rilevanti per numerosità dei pazienti.

Sono stati inoltre condotti due studi riguardanti la riorganizzazione cerebrale in pazienti con esiti di trauma cranico: analisi funzionale ed elettrofisiologica dei meccanismi di plasticità neuronale alla base del recupero clinico a distanza. Gli studi in oggetto si prefiggevano di comprendere i meccanismi di riorganizzazione cerebrale in pazienti che dopo un trauma cranico severo recuperano la capacità di mantenere l'attenzione, facoltà neuropsicologica sempre compromessa nelle GCLA. I risultati evidenziano come l'attivazione cerebrale nei pazienti che hanno eseguito un trattamento riabilitativo migliori in modo significativo rispetto ai non trattati e come anche l'attivazione a livello cerebrale si modifichi con attivazione di aree cerebrali diverse evidenziando una plasticità neuronale maggiore favorita dal trattamento riabilitativo.

L'altro principale ambito di ricerca è sui pazienti affetti da tumore cerebrale: tale patologia ha subito un notevole incremento in questi ultimi anni, occupandosi prevalentemente della valutazione e riabilitazione: fino ad oggi sono stati seguiti nel nostro Istituto più di 300 pazienti e la casistica si sta costantemente ampliando. I bambini vengono inviati dai Reparti di Oncologia Pediatrica e dalle Neurochirurgie di diversi Istituti italiani. Negli anni sono state condotte diverse ricerche finalizzate e correnti per valutare l'effetto dei trattamenti medici (chirurgici, chemio-radioterapici) sulle prestazioni neurologiche e neuropsicologiche e per valutare l'eventuale indicazione all'avvio di trattamenti riabilitativi finalizzati al miglioramento delle competenze deficitarie. In particolare, è in corso uno studio su pazienti affetti da esiti di ependimoma. I soggetti studiati presentano generalmente problemi in ambito visuospatiale, attentivo, mnestico ed esecutivo. Tali problematiche sono, in generale, più accentuate nei pazienti con ependimomi a sede sovratentoriale; in questi pazienti i disturbi neuropsicologici sono generalmente correlati alla sede della lesione. L'entità della compromissione rilevata non risulta così estesa come nei pazienti che hanno ricevuto la radioterapia cranio-spinale per altri tipi di tumori (ad esempio medulloblastoma).

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

### Ricerca Ministeriale Corrente 2005:

- Valutazione delle modificazioni funzionali indotte nell'ambito del processo riabilitativo
- Disfagia e problemi correlati in bambini con patologia neurologica: delineazione di protocolli di valutazione e trattamento
- Integrazione funzionale tra l'assessment neuropsicologico, le misure di un simulatore di guida e il test drive. Studio per la valutazione delle capacità di guida su persone con cerebrolesione acquisita
- Induzione dell'attività osteoblastica in vitro ed in vivo di soggetti con osteogenesi imperfetta con fratture complesse o pseudoartrosi mediante l'utilizzo di matrici di supporto a base di PCL ed acido ialuronico

### Altri progetti:

- Progetto Telethon - GUP04001 "Language and reading disorders in Duchenne Muscular Dystrophy: neuropsychological evaluation"
- Progetto AIRC - Regional Grant Proposal 2005 "Comprehensive diagnosis and treatment for intracranial pediatric ependynoma" – Capofila Istituto Nazionale dei Tumori, Milano
- Progetto Fondazione Città della Speranza "Pilot study on neurocognitive rehabilitation in long term survivors of childhood brain tumors" (continuazione dall'anno precedente)

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- La penalizzazione terapeutica dell'arto conservato (Constraint induced therapy)
- Valutazione e riabilitazione delle funzioni esecutive in giovani adulti con trauma cranico. Studio sulla generalizzazione di un training cognitivo specifico
- Disfagia e problemi correlati in bambini con patologia neurologica: delineazione di protocolli di valutazione e trattamento
- Pattern di attivazione cerebrale alla risonanza magnetica funzionale (fRMN) in pazienti affetti da distrofia muscolare: possibile ruolo della distrofia cerebrale nei processi cognitivi

### Altri progetti:

- Progetto Telethon - GUP04001 "Language

and reading disorders in Duchenne Muscular Dystrophy: neuropsychological evaluation"

- Progetto AIRC - Regional Grant Proposal 2005 "Comprehensive diagnosis and treatment for intracranial pediatric ependynoma" – Capofila Istituto Nazionale dei Tumori, Milano
- Progetto Fondazione Città della Speranza "Pilot study on neurocognitive rehabilitation in long term survivors of childhood brain tumors" (continuazione dall'anno precedente)

### Ex-proposte ricerca corrente 2006 finanziate con fondi propri:

- Lo sviluppo posturale, cognitivo e linguistico nell'Aprassia Oculomotoria Congenita (c-OMA)

## VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO "TRASLAZIONALE" DELLE RICERCHE CONDOTTE)

La linea di ricerca in Riabilitazione Neuromotoria e Neuropsicologia Funzionale ha sviluppato da sempre progetti di ricerca strettamente connessi alla attività di diagnosi e cura svolta all'interno dell'IRCCS "E. Medea" per cui ogni progetto di ricerca ha sempre avuto ricadute applicative dirette sull'attività clinica.

In particolare nel campo delle PCI e delle Malattie Neuromuscolari sono state messe a punto le linee guida riabilitative in collaborazione con le Società Scientifiche Italiane di Riabilitazione Funzionale e Neuropsichiatria Infantile.

Esistono inoltre dei protocolli specifici di presa in carico clinica di queste patologie che sono strumenti di lavoro quotidiano e che sono derivate da tutte le attività di ricerca sul campo.

Tali protocolli sono validati e certificati UNI EN ISO 9001/2000.

In particolare, in riferimento ai progetti in atto, si specifica che nel campo PCI, il trial in corso consentirà di definire dei protocolli clinici-guida per la CTI che attualmente non sono definiti dalla letteratura internazionale.

Sono inoltre stati messi a punto programmi specifici di trattamento relativamente all'addestramento alle attività manuali-prassico-manipolative che costituiscono dei protocolli guida operativi per la riabilitazione.

Nel campo delle malattie neuromuscolari prosegue l'impegno del nostro Istituto nell'ambito di ricerca del coinvolgimento cognitivo in questa classe di disturbi.

Il contributo conoscitivo in questo settore è stato

molto importante in quanto in alcune categorie di pazienti le turbe cognitive venivano sottovalutate o addirittura misconosciute.

Grazie agli studi e alle conoscenze in questo campo molti disturbi di apprendimento soprattutto in età scolare hanno potuto essere contenuti, supportati e corretti.

Tutti gli studi complessi di correlazione genotipo-fenotipo hanno permesso un approccio clinico più mirato al paziente.

Ciò si è tradotto in un miglioramento e affinamento delle procedure diagnostiche con riconoscimento precoce di tipologie di disturbi e inquadramento prognostico preciso.

Si sono inoltre migliorati gli approcci in termini di presa in carico terapeutica e riabilitativa di malattie a coinvolgimento tipicamente multisistemico. Per quanto riguarda le GCLA sono in corso di definizione protocolli riabilitativi sull'età evolutiva per migliorare e seguire nel tempo l'outcome dei piccoli pazienti; tale definizione è di primaria importanza, data la complessità di valutazione e gestione delle problematiche cliniche in età evolutiva. Al momento attuale mancano dati di letteratura che supportano in modo adeguato l'attività clinica, e la mancanza di casistiche sufficientemente ampie rende difficoltosa la stesura di protocolli di intervento scientificamente validi. Lo studio Nazionale appena concluso ha potuto raccogliere una delle più grandi casistiche di questo tipo di patologia in età evolutiva, dando informazioni sulle cause determinanti le GCLA nel bambino che differiscono da quelle più note dell'adulto. Inoltre ha potuto evidenziare le principali problematiche mediche e riabilitative da affrontare, ha uniformato il percorso valutativo funzionale tra i diversi Centri Italiani e in prospettiva permetterà la definizione di percorsi riabilitativi più idonei.

Anche sulla patologia tumorale la numerosità e l'esperienza acquisita ha permesso lo sviluppo di competenze specifiche e portato alla collaborazione clinica e scientifica con i principali Centri Italiani di riferimento per la cura dei tumori cerebrali che, sempre più, sono sensibilizzati agli eventuali effetti collaterali disfunzionali legati ai diversi protocolli terapeutici in uso. Inoltre dobbiamo ricordare come gli esiti di tumori cerebrali condizionano fortemente la qualità della vita del piccolo paziente e compromettono anche gli apprendimenti scolastici. Un intervento riabilitativo specifico o un adeguato supporto per l'attività didattica possono modificare in modo significativo l'outcome a distanza, migliorando di conseguenza la qualità della vita del paziente.

## PUBBLICAZIONI

Negrini S, Aulisa L, Ferraro P, Frascini P, Masiero S, Simonazzi P, Tedeschi C, Venturin A.: ITALIAN GUIDELINES ON REHABILITATION TREATMENT OF ADOLESCENTS WITH SCOLIOSIS OR OTHER SPINAL DEFORMITIES. *Eur Medicophys* 2005 Jun;41:183-20

Tonelli A, D'Angelo MG, Salati R, Villa L, Germinali C, Frattini T, Meola G, Turconi AC, Bresolin N, Bassi MT.: EARLY ONSET, NON FLUCTUATING SPINOCEREBELLAR ATAXIA AND A NOVEL MISSENSE MUTATION IN CACNA1A. *Journ Neurol Sci* 2006:1-2: 13-17

Piccinini L, Cimolin V, Galli M, Berti M, Crivellini M, Turconi AC.: QUANTIFICATION OF ENERGY EXPENDITURE DURING GAIT IN CHILDREN AFFECTED BY CEREBRAL PALSY. *Eura Medicophys*. 2006 Oct 3;[Epub ahead of print]

Poggi G, Liscio M, Adduci A, Galbiati S, Massimino M, Sommovigo M, Zetiin M, Figini E, Castelli E.: PSYCHOLOGICAL AND ADJUSTMENT PROBLEMS DUE TO ACQUIRED BRAIN LESIONS IN CHILDHOOD: A COMPARISON BETWEEN POST-TRAUMATIC PATIENTS AND BRAIN TUMOUR SURVIVORS. *Brain Injury* 2005 Sep;19(10):777-85.

Castelli E, Strazzer S, Stortini M, Bernasconi S, Bollea L, Zampolini M.: STUDIO GISCAR SULLE CEREBROLESIONI ACQUISITE IN ETÀ EVOLUTIVA: I PRIMI RISULTATI. *Eur Med Phys* 2006;in press.

# LINEA DI RICERCA N. 3

## PSICOPATOLOGIA DELLO SVILUPPO DEL LINGUAGGIO E DELL'APPRENDIMENTO

### RESPONSABILE:

**MASSIMO MOLTENI**

Per il curriculum vitae si rimanda a pag. 19

### COLLABORATORI

#### *Polo di Bosisio Parini*

Marco Battaglia - Psichiatra  
 Cecilia Marino - Psichiatra  
 Maria Nobile - Psichiatra  
 Andrea Facchetti - Psicologo  
 Alessandra Frigerio - Psicologa  
 Sara Forti - Psicologa  
 Maria Luisa Lorusso - Psicologa  
 Eleonora Maino - Psicologa  
 Monica Bellina - Psicologa borsista  
 Elisa Ceppi - Psicologa borsista  
 Alessandra Citterio - Psicologa borsista  
 Milena Ruffino - Psicologa dottoranda  
 Michele Burigo - Psicologo borsista

#### *Polo di San Vito e Conegliano*

Franco Fabbro - Neuropsichiatra  
 Alberto Angarano - Psichiatra  
 Loredana Urgesi - Psicologo  
 Ombretta Carlet - Neuropsichiatra infantile  
 Susanna Villa - Psicologa  
 Paolo Brambilla - Psichiatra

#### *Polo di Ostuni*

Angelo Massagli - Neuropsichiatra Infantile  
 Rita Galluzzi - Neuropsichiatra Infantile  
 Vitilde Ancona - Neuropsichiatra Infantile  
 Maria Grazia Pasca - Neuropsichiatra Infantile  
 Luigi Russo - Psicologo  
 Mario Liso - Psicologo  
 Alessia Zaccaria - Psicologa  
 Daniela Zizzi - Psicologa  
 Anna Lerna - Psicologa

### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

L'infanzia è il luogo specifico dove attraverso la interiorizzazione di stili di vita adeguati si pon-

gono le basi per una vera cultura della prevenzione, risorsa fondamentale dei sistemi sanitari del futuro, è l'ambito dove si costruisce lo "stare bene" dell'adulto: benessere che è sempre più giocato sulle competenze emotive, relazionali e cognitive che proprio nella prima infanzia subiscono un imprinting decisivo. L'enorme e tumultuoso sviluppo delle neuroscienze, sta investendo con nuove conoscenze e competenze la cruciale interazione tra "natura e cultura". In questo contesto, partendo dai principali quadri patologici della psicopatologia dello sviluppo, questa linea di ricerca ha come obiettivo quello di dare il proprio contributo alla comprensione dello sviluppo psichico.

Per raggiungere questo ambizioso obiettivo si sono sviluppati differenti ambiti di ricerca.

Un primo ambito è quello dello studio epidemiologico dei fenomeni psicopatologici in età evolutiva, accompagnato dall'adattamento e validazione nel contesto italiano dei principali strumenti di valutazione adottati a livello internazionale, contribuendo così a colmare il gap che si era sviluppato tra i principali paesi anglosassoni e l'Italia, proprio nel settore degli strumenti di valutazione delle patologie psichiche dell'età evolutiva.

Un secondo ambito sviluppato è stato quello della genetica del comportamento: con sempre più evidenza si è affermato il convincimento che una parte del comportamento umano è influenzato dall'assetto genetico di ciascun individuo, in complessa interazione con fattori ambientali condivisi e no: la patologia depressiva, la dislessia e gli studi del comportamento nei gemelli, lo studio dell'attaccamento madre-bambino sono ambiti dove applicare gli studi genetici di linkage, per verificare la eventuale influenza che i diversi polimorfismi coinvolti nella regolazione dei principali neurotrasmettitori giocano nella manifestazione dei fenomeni comportamentali che vengono osservati.

Un terzo ambito sviluppato è quello dello studio neuropsicologico e neurofisiologico di fenomeni complessi come la lettura, il linguaggio, l'atten-

zione, al fine di caratterizzare possibili anomalie funzionali e dei circuiti sottesi, coinvolti nelle funzioni neuropsicologiche di base all'origine dei principali disturbi specifici di sviluppo: dall'analisi dei disturbi neuropsicologici coinvolti si procede a verificare le reali influenze che i trattamenti riabilitativi sono in grado di esercitare sulle funzioni di base.

Un quarto ambito sviluppato riguarda specificamente la primissima infanzia: da una parte i legami di attaccamento quali possibili fattori di protezione contro lo stress ambientale e la vulnerabilità intrinseca di ogni individuo, dall'altra l'analisi precocissima del movimento (reaching, grasping, etc) attraverso il concorso di tecnologie non intrusive, quale possibile indicatore di anomalie del comportamento che diventeranno evidenti nel corso dello sviluppo.

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

### Ricerca Ministeriale Corrente 2005:

- Basi genetiche dell'autismo
- Disturbi neuropsicologici complessi: correlati neurofisiologici e genetici
- Reattività adrenocorticale e vulnerabilità genetica in funzione della relazione di attaccamento madre-bambino in un campione ad alto rischio
- Disturbi del discorso e dalla pragmatica nei bambini. Strumenti per la valutazione e la riabilitazione

Progetto finanziato da Eli Lilly B4Z-IT-LYCY "An Italian randomised, double-blind placebo controlled study of the efficacy of atomoxetine hydrochloride in the treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid oppositional defiant disorder"

Progetto "Studio di Voxel based morphometry e diffusion tensor imaging in pazienti dislessici con variante rara dei polimorfismi 3G/A e 1249G/T del DYX1C1" – Capofila Ospedale San Raffaele, Milano

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- Basi genetiche dell'autismo
- Disturbi neuropsicologici complessi: correlati neurofisiologici e genetici
- Reattività adrenocorticale e vulnerabilità genetica in funzione della relazione di attacca-

mento madre-bambino in un campione ad alto rischio

- Standardizzazione italiana della NEPSY: A Developmental Neuropsychological Assessment (M. Korkman, U. Kirk, S. Kemp, 1998)
- Il protocollo di valutazione delle Abilità Pragmatiche Verbali nei bambini (PAPV): applicazione clinica
- L'utilizzo del PECS (Picture Exchange Communication System) in bambini con disturbo autistico

### Progetti europei VI programma quadro:

- The origins, representations and use of abstract concepts (ABSTRACT) – Capofila DIBIT, Milano
- Progetto NEST "Thought in action (TACT)" – Capofila Campus Biomedico, Roma

Progetto finanziato da Eli Lilly B4Z-IT-LYCY "An Italian randomised, double-blind placebo controlled study of the efficacy of atomoxetine hydrochloride in the treatment of children and adolescents with attention-deficit/hyperactivity disorder and comorbid oppositional defiant disorder"

### Bando Fondazione Provincia di Lecco "Il libro parlato"

#### Progetti finanziati con fondi privati:

- Valutazione delle competenze discorsive in tre popolazioni di soggetti in età evolutiva con sviluppo atipico (bambini con DSL, DMD e Sindrome di Williams)"
- I movimenti oculari saccadici e d'inseguimento lento nel bambino autistico – Capofila IRCCS Ospedale Infantile e Pie Fondazioni Burlo Garofolo e de Manussi, Trieste

## VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO "TRASLAZIONALE" DELLE RICERCHE CONDOTTE)

Le ricadute traslazionali riguardano tutti gli ambiti di ricerca sviluppati.

In campo epidemiologico, è stato prodotto il primo studio nazionale sulla salute mentale degli adolescenti (progetto Prisma) che sta mettendo in condizione la programmazione sanitaria di disporre di dati epidemiologici italiani derivati da un vasto campione di popolazione, costituendo così un primo elemento statistico su cui confrontare le eventuali evoluzioni negli anni a venire.

Inoltre sono state messe a disposizione della comunità scientifica nazionale e dei vari servizi per l'età evolutiva numerosi strumenti diagnostici quali: Cbcl, Conners, Dawba, SDQ, Honoscha, Nepsy, VAB, Pep-R e Pep 3, EFI.

L'adattamento e la validazione fatta su campioni italiani contribuisce a rendere più attendibile il loro utilizzo nel contesto nazionale.

In campo genetico i contributi apportati sono stati soprattutto nell'ambito della dislessia, anche attraverso collaborazioni internazionali, evidenziando in particolare il ruolo di alcuni specifici geni candidati, e la loro correlazione con alcune sottocomponenti neuropsicologiche della dislessia.

In campo neuropsicologico molto importanti sono state le evidenze scientifiche riguardo il ruolo dell'attenzione visuo-spaziale nel determinismo del disturbo dislessico: da queste evidenze sono discese numerose sperimentazioni riabilitative che hanno permesso di dimostrare come specifici interventi di stimolazione neuropsicologica siano in grado di far evolvere positivamente il quadro disfunzionale. Analogo approccio è in corso su alcune caratteristiche della funzione linguistica, con la relativa ricaduta riabilitativa.

### PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Marino C, Citterio A, Giorda R, Facoetti A, Menozzi G, Vanzin L, Lorusso ML, Nobile M, Molteni M.: ASSOCIATION OF SHORT-TERM MEMORY WITH A VARIANT WITHIN DYX1C1 IN DEVELOPMENTAL DYSLEXIA. *Genes Brain Behav.* 2007 Feb 13

Battaglia M, Zanoni A, Giorda R, Pozzoli U, Citterio A, Beri S, Ogliari A, Nobile M, Marino C, Molteni M.: EFFECT OF THE CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE VALMET GENOTYPE ON CHILDREN'S EARLY PHASES OF FACIAL STIMULIPROCESSING. *Genes Brain Behav.* 2006 Aug 29

Lorusso ML, Facoetti A, Paganoni P, Pezzani M, Molteni M.: EFFECTS OF VISUAL HEMISPHERE-SPECIFIC STIMULATION VERSUS READING-FOCUSED TRAINING IN DYSLEXIC CHILDREN. *Neuropsychol Rehabil.* 2006 Apr;16(2):194-212

Frigerio A, Vanzin L, Molteni M. et al.: THE ITALIAN PREADOLESCENT MENTAL HEALTH PROJECT (PRISMA): RATIONALE AND METHODS. *Int J Methods Psychiatr Res.* 2006 Mar;15(1):22-35

Facoetti A, Lorusso ML, Cattaneo C, Galli R, Molteni M.: VISUAL AND AUDITORY ATTENTIONAL CAPTURE ARE BOTH SLUGGISH IN CHILDREN WITH DEVELOPMENTAL DYSLEXIA. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2005;65(1):61-72

## LINEA DI RICERCA N. 4 NEUROFISIOPATOLOGIA

### RESPONSABILE:

#### CLAUDIO ZUCCA

Nato a Milano il 12.08.1960



### Istruzione

- Il 21 Marzo 1986 si è laureato in Medicina e Chirurgia, con il massimo dei voti e la lode, discutendo una tesi sperimentale su “Il potenziale evocato uditivo a media latenza: studio in soggetti normali”
- Il 13 Luglio 1990 ha conseguito la Specializzazione in Neurologia, con il massimo dei voti e la lode, discutendo una tesi intitolata: “Sospensione del trattamento cronico con farmaci antiepilettici: studio prospettico”
- Il 7 luglio 1994 ha conseguito la Specializzazione in Neurofisiopatologia con il massimo dei voti e la lode discutendo una tesi intitolata: “Anomalie della migrazione neuronale: studio degli aspetti neurofisiopatologici e clinici in 25 pazienti”

### Esperienze professionali

- Nell'Aprile 1991 è stato assunto come Assistente medico presso il Servizio di Neurofisiopatologia dell'IRCCS “E. Medea”, Associazione La Nostra Famiglia di Bosisio Parini
- Dall'Ottobre 1992 è stato nominato Aiuto presso il Servizio di Neurofisiopatologia dell'IRCCS “E. Medea”, Associazione La Nostra Famiglia di Bosisio Parini
- Dal Settembre 2005 è stato nominato Dirigente di secondo livello del Servizio di Neurofisiopatologia dell'IRCCS “E. Medea”, Associazione La Nostra Famiglia di Bosisio Parini

- È socio della Lega Italiana Contro l'Epilessia e dell'Associazione Italiana di Medicina del Sonno
- Dall'Aprile 1999 fa parte del Comitato Scientifico dell'Associazione Italiana per la Sindrome Emiplegia Alternante

### Attività Didattica

- Negli anni scolastici 1994-1995 e 1995-1996: è stato titolare dei corsi di “Anatomia e fisiologia del sistema nervoso” e “Neurologia” presso la Scuola Regionale per Terapisti della Riabilitazione dell'IRCCS “E. Medea”
- Negli anni accademici 1996-1997 e 1997-1998 è stato titolare dei corsi integrati di “Anatomofisiologia Speciale del Sistema Nervoso” e di “Neurologia” del I e II anno del Corso di Diploma Universitario per Fisioterapisti dell'Università di Milano
- Negli anni accademici 1999-2000, 2000-2001 e 2001-2002 è stato titolare dei corsi integrati di “Neuroanatomia” e “Neurofisiologia” per il I anno e “Neurologia” per il II anno di Corso del Diploma Universitario per Fisioterapisti dell'Università degli Studi dell'Insubria di Varese
- Negli anni accademici 2002-2003 e 2003-2004 è stato docente di “Neuroanatomia” del Primo Anno del Corso di Laurea di Fisioterapista dell'Università degli Studi dell'Insubria di Varese
- È stato docente in 8 Corsi accreditati per il Programma Ministeriale ECM (Educazione Continua in Medicina)

### Estratto delle pubblicazioni

È autore e coautore di oltre 130 lavori scientifici di argomento neurologico, neurofisiopatologico ed epilettologico; vengono di seguito riportati i 5 più significativi.

- Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, Zucca C, Bersano A, Dolcetta D, Boneschi FM, Barone V, Casari G.: A NOVEL MUTATION IN THE ATP1A2 GENE CAUSES ALTERNATING HEMIPLEGIA OF CHILDHOOD. J Med Genet. 2004 Aug;41(8):621-8

- Borgatti R, Zucca C, Cavallini A, Ferrario M, Panzeri C, Castaldo P, Soldovieri MV, Baschiroto C, Bresolin N, Dalla Bernardina B, Tagliatela M, Bassi MT.: A NOVEL MUTATION IN KCNQ2 ASSOCIATED WITH BFNC, DRUG RESISTANT EPILEPSY, AND MENTAL RETARDATION. *Neurology* 2004 Jul 13;63(1):57-65
- Zucca C, Binda S, Borgatti R, Triulzi F, Radice L, Buttè C, Barkhaus PE, Barbi M.: RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF CONGENITAL CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND CORTICAL MALDEVELOPMENT. *Neurology* 2003 Sep 9;61(5):710-2
- Guerreiro MM, Andermann E, Guerrini R, Dobyens WB, Kuzniecky R, Silver K, Van Bogaert P, Gillain C, David P, Ambrosetto G, Rosati A, Bartolomei F, Parmeggiani A, Paetau R, Salonen O, Ignatius J, Borgatti R, Zucca C, Bastos AC, Palmi A, Fernandes W, Montenegro MA, Cendes F, Andermann F: FAMILIAL PERISYLVIAN POLYMICROGYRIA: A NEW FAMILIAL SYNDROME OF CORTICAL MALDEVELOPMENT. *Ann Neurol.* 2000 Jul;48(1):39-48
- Borgatti R, Triulzi F, Zucca C, Piccinelli P, Balottin U, Carozzo R, Guerrini R.: BILATERAL PERISYLVIAN POLYMICROGYRIA IN THREE GENERATIONS. *Neurology.* 1999 Jun 10;52(9):1910-3

## COLLABORATORI

Nicoletta Zanotta - Neurologa

*Dirigente di primo livello*

Roberta Epifanio - Neuropsichiatria Infantile

*Dirigente di primo livello*

## INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

Il Servizio di Neurofisiopatologia è stato costituito, presso la sede di Bosisio Parini de La Nostra Famiglia ancor prima della fondazione dell'IRCCS "E. Medea". Fin dall'inizio si è occupato di:

- 1) attività clinico-diagnostica e riabilitativa a favore dei pazienti affetti da Epilessia,
- 2) attività diagnostica elettroencefalografia, anche dinamica e videopoligrafica in telemetria,
- 3) ricerca in tema di epilettologia infantile.

Successivamente il Servizio ha ampliato le sue competenze nell'ambito della neurofisiologia clinica occupandosi anche di elettromiografia e potenziali evocati e della diagnostica differenziale dei fenomeni parossistici anche nell'adulto. In relazione a numero e tipologia delle prestazioni dia-

gnostiche e al carico di pazienti di cui si occupa, il Servizio è stato inserito nella rete dei centri per l'epilessia della Regione Lombardia (Epinetwork) come centro di terzo livello per l'età infantile e di secondo livello per l'età adulta.

La casistica è costituita in prevalenza da bambini ed adolescenti affetti da sindromi epilettiche sintomatiche, seguiti per gli aspetti riabilitativi presso le U.O. ed i Centri di riabilitazione dell'IRCCS, per questo motivo le Ricerche Ministeriali di tipo corrente (RC) e finalizzato (RF) sono state incentrate sempre su tre tematiche principali:

1. **Epilessie Focali Sintomatiche** in particolare: Classificazione ed aspetti funzionali neuropsicologici (RC 1986, RC 1987, RC 1988), correlazioni tra quadri elettroclinici ed alterazioni strutturali (RC 1990), espressività età dipendente (RC 1991), encefalopatie infantili malformative (RC 1996, 1997).

2. **Forme atipiche di Epilessia Generalizzata Idiopatica ed Epilessie Generalizzate Criptogeniche** in particolare:

Forme atipiche di Epilessia tipo Assenze dell'Infanzia (RC 1993,1995), fotosensibilità come tratto genetico ( RC 1994),

3. **Farmacoresistenza** in particolare: I markers neurochimici (RF 1993, 1997), definizione precoce ed indicazioni neurochirurgiche (RF 1998), criteri elettroclinici predittivi (RC 2001, 2002, 2003), basi farmacogenomiche (RF 2003). Ricerche ministeriali sono state effettuate anche su tematiche più generali di neurofisiologia clinica come: l'analisi degli standard di valutazione neurofisiologici nelle diverse tipologie minorative (RC 1987, RC 1988), lo studio degli aspetti neurofisiopatologici delle disfasie evolutive (RC 1998), lo studio elettroencefalografico e dei potenziali evocati nei pazienti con esiti di traumi cranici in fase sub-acuta e cronica, lo studio del mioclono nelle cerebropatie epilettiche e non epilettiche (RC 2006).

Sono stati completati programmi di ricerca non ministeriali in collaborazione con:

- a) **Istituti universitari:** Università dell'Insubria di Varese (Studio degli aspetti neuropsicologici in bambini con Epilessie idiopatiche o criptogeniche). Facoltà di Ingegneria Politecnico di Milano e di Lecco (Analisi automatica del segnale EEG spontaneo ed evocato in soggetti sottoposti a test neuropsicologici di monitoraggio dell'attenzione sostenuta).
- b) **Lega Italiana contro L'Epilessia:** il Servizio ha partecipato al progetto di ricerca EPISCREEN

fornendo dati di 650 pazienti ed oltre 2300 visite; aderisce inoltre ai gruppi di studio LICE sulla genetica delle epilessie, sulla neuropsicologia e su epilessia e gravidanza.

- c) **Comunità Europea**, il Servizio partecipa ad uno studio sugli Aspetti neurofisiopatologici e genetici dell'Emiplegia alternante inserito nel Sixth Framework Program dell'EC.

Sono stati effettuati inoltre Studi controllati (fase IIIb/IV) e trials clinici in merito all'utilizzo, tollerabilità ed efficacia di farmaci antiepilettici.

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

### Progetti europei:

- ENRAH for SMES "European Network for research on alternative hemiplegia of childhood for promoting SMES integration (Contract 516513) – Coordinatore Dr.ssa Tsveta Schyns - ENRAH, Vienna

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- Caratteristiche Neurofisiopatologiche delle cerebropatie epilettogene e non epilettogene associate a canalopatie

### Progetti europei:

- ENRAH for SMES "European Network for research on alternative hemiplegia of childhood for promoting SMES integration (Contract 516513) – Coordinatore Dr.ssa Tsveta Schyns - ENRAH, Vienna

## VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO "TRASLAZIONALE" DELLE RICERCHE CONDOTTE)

Le linee di ricerca del Servizio sono sempre scaturite dalle esigenze cliniche di assistenza dei pazienti seguiti presso le UO ed i Centri riabilitativi dell'IRCCS.

Per quanto riguarda le ricerche in ambito epilettologico, i dati ottenuti hanno consentito di ricavare metodiche e protocolli mirati di inquadramento diagnostico e di gestione terapeutica. Hanno fornito inoltre importanti precisazioni sulla correlazione tra aspetti neurofisiopatologici e neuropsicologici di alcune sindromi nonché sull'influenza che il trattamento farmacologico esercita su entrambi questi aspetti.

Da questo punto di vista l'attività di ricerca del Servizio di Neurofisiopatologia si è costantemente integrata con l'attività clinica e di ricerca

dell'UO NR1 dell'IRCCS in particolare per quanto riguarda lo studio delle epilessie sintomatiche in età infantile ed i percorsi diagnostici delle epilessie sintomatiche di malformazioni dello sviluppo corticale e di sindromi-plurimalformative.

L'attività di ricerca svolta in collaborazione con l'UO NR3 ha fornito dati utili per la gestione terapeutica e il monitoraggio neurofisiologico delle epilessie sintomatiche post-tumorali in età infantile, post-atossiche e post-traumatiche anche dell'età adulta. Gli studi di neurofisiologia clinica condotti in collaborazione con l'UO NR2 hanno fornito contributi interessanti per la classificazione dei deficit neuropsicologici selettivi sia del linguaggio che della lettura. Con la UO di Riabilitazione Funzionale si sono ottenuti dati di utilità clinica per le epilessie sintomatiche conseguenti a cerebropatie congenite non evolutive. Si sono ottenuti inoltre dati di analisi automatica del segnale EEG spontaneo ed evocato utili alla realizzazione dei progetti riabilitativi anche basati sull'utilizzo del segnale EEG evocato nell'interazione uomo-computer. Infine la collaborazione con il Laboratorio di biologia molecolare ha prodotto risultati utili per la diagnosi non solo di forme di epilessia idiopatiche ma anche criptogeniche con importanti ricadute anche sulla comprensione della fisiopatologia di queste ultime. I dati ottenuti dall'attività di ricerca ed i risultati della loro applicazione clinica sono stati oggetto di relazioni e lezioni esposte dal personale medico e tecnico del Servizio nell'ambito di corsi accreditati per i Programmi Ministeriali ECM (Educazione Continua in Medicina).

## PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Strazzer S, Zucca C, Fiocchi I, Genitori L, Castelli E.: EPILEPSY AND NEUROPSYCHOLOGIC DEFICIT IN A CHILD WITH CEREBELLAR ASTROCYTOMA. *J Child Neurol.* 2006 Sep;21(9):817-20

Zanotta N, Raggi ME, Radice L, Degrade A, Bresolin N, Zucca C.: CLINICAL EXPERIENCE WITH TOPIRAMATE DOSING AND SERUM LEVELS IN PATIENTS WITH EPILEPSY. *Seizure.* 2006 Mar;15(2):86-92. Epub 2006 Jan 6

Canafoglia L, Ciano C, Panzica F, Scaioli V, Zucca C, Agazzi P, Visani E, Avanzini G, Franceschetti S.: SENSORIMOTOR CORTEX EXCITABILITY IN UNVERRICHT-LUNDBORG DISEASE AND LAFORA BODY DISEASE. *Neurology.* 2004 Dec 28;63(12):2309-15

# LINEA DI RICERCA N. 5

## NEUROBIOLOGIA

### RESPONSABILE:

#### NEREO BRESOLIN

Nato il 25.08.1952



#### Corso di studi

- Laureato in Medicina e Chirurgia il 13.7.77 con 110/110 e lode
- Specializzato in Neurologia presso l'Università di Padova il 14.7.81
- Specializzato in Neuropatologia presso l'Università degli Studi di Milano il 5.7.85

#### Esperienze professionali

- Dall'1.11.92 è Professore Associato di ruolo di Clinica Neurologica presso l'Università degli Studi di Milano, Istituto di Clinica Neurologica
- Dal 9.7.99 è Direttore Scientifico dell'IRCCS E. Medea
- Dal 1.3.01 è Professore Straordinario in Clinica Neurologica presso l'Università degli Studi di Milano, Istituto di Clinica Neurologica
- Dal 1.10.01 è Direttore della Scuola di Specialità in Neurologia presso l'Università degli Studi di Milano
- Dal 1.11.02 è Direttore dell'U.O. di Neurologia della Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena di Milano
- Dal 25.11.02 è nominato Direttore del Centro Dino Ferrari per la diagnostica e la terapia delle Malattie Neuromuscolari e Neurodegenerative

- Dal 01.10.2004 è Direttore del Dipartimento di Scienze Neurologiche dell'Università degli Studi di Milano
- Presidente del "Centro di Eccellenza sulle Malattie Neurodegenerative del Sistema Nervoso Centrale e Periferico: studio dei meccanismi molecolari per diagnosi, prevenzione e trattamento" dell'Università degli Studi di Milano
- Esperto del Consiglio Superiore di Sanità per il triennio 2003-2005 (decreto di nomina 31/01/2003)
- Componente del Comitato Tecnico Scientifico della Fondazione IRCCS "Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena" di Milano

#### Attività Didattica

Ha svolto continuamente attività didattica negli anni accademici dal 1985 al 2006 mediante lezioni e seminari per i corsi di Laurea in Medicina e Chirurgia e mediante seminari tenuti alla Scuola di Specializzazione in Neurologia e Neuropatologia dell'Università degli Studi di Milano. Docente di Clinica Neurologica alla Scuola di Specialità in Medicina Interna.

Ha inoltre partecipato alla stesura di oltre 150 tesi di laurea di studenti in Medicina e Chirurgia e oltre 100 tesi di Specializzandi in Neurologia e Neuropatologia partecipando alle sedute di laurea e di specializzazione in qualità di relatore e correlatore.

Titolare del corso di Clinica Neurologica per gli studenti di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano.

È Direttore della Scuola di Specialità in Neurologia.

È Coordinatore del Corso di Malattie del Sistema Nervoso – Polo Centrale Linea C della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano.

È titolare del Corso di Neurologia per la Linea H – Corso di Malattie del Sistema Nervoso Polo Centrale della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Milano.

Ha tenuto numerosi seminari in Italia e all'estero su invito delle più prestigiose Università.

**Estratto delle pubblicazioni**

- Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, Cusella De Angelis MG, Campbell KS, Bottinelli R, Cossu G.: CELL THERAPY OF ALPHA-SARCOGLYCAN NULL DYSTROPHIC MICE THROUGH INTRA-ARTERIAL DELIVERY OF MESOANGIOBLASTS. *Science* 2003;301(5632):487-492
- Torrente Y, Camirand G, Pisati F, Belicchi M, Rossi B, Colombo F, El Fahime M, Caron NJ, Issekutz AC, Constantin G, Tremblay JP, Bresolin N.: IDENTIFICATION OF A PUTATIVE PATHWAY FOR THE MUSCLE HOMING OF STEM CELLS IN A MUSCULAR DYSTROPHY MODEL. *The Journal of Cell Biology* 2003;162(3):511-520
- Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, Tonlorenzi R, Porretti L, Gavina M, Mamchaoui K, Pellegrino MA, Furling D, Mouly V, Butler-Browne GS, Bottinelli R, Cossu G, Bresolin N.: HUMAN CIRCULATING AC133+ STEM CELLS RESTORE DYSTROPHY EXPRESSION AND AMELIORATE FUNCTION IN DYSTROPHIC SKELETAL MUSCLE. *Journal of Clinical Investigation* 2004;114(2):182-195
- Cagliani R, Magri F, Toscano A, Merlini L, Fortunato F, Lamperti C, Rodolico C, Prella A, Sironi M, Aguenouz M, Ciscato P, Uncini A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.: MUTATION FINDING IN PATIENTS WITH DYSPERLIN DEFICIENCY AND ROLE OF THE DYSPERLIN INTERACTING PROTEINS ANNEXIN A1 AND A2 IN MUSCULAR DYSTROPHIES. *Human Mutation* 2005;26(3):283
- Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, Baschiroto C, Vazza G, Mostacciolo ML, Daga A, Orso G, Profice P, Trabacca A, D'Angelo MG, Comi GP, Galbiati S, Lamperti C, Bonato S, Pandolfo M, Meola G, Musumeci O, Toscano A, Trevisan CP, Bresolin N, Bassi MT.: EIGHT NOVEL MUTATIONS IN SPG4 IN A LARGE SAMPLE OF PATIENTS WITH HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA. *Archives of Neurology* 2006;63(5):750-755

**COLLABORATORI****Strutturati**

Maria Teresa Bassi - Biologa  
 Maria Clara Bonaglia - Biologa  
 Rachele Cagliani - Biologa

Roberto Giorda - Biologo  
 Uberto Pozzoli - Bioingegnere  
 Maria Elisabetta Raggi - Biologa  
 Manuela Sironi - Biologa

**Consulenti**

Emilio Clementi - farmacologo

**INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI**

L'eterogenea attività della linea di Neurobiologia si articola su diversi fronti nell'ambito della Biologia molecolare, della Citogenetica della Farmacologia e della Biochimica clinica. Lo studio e la caratterizzazione da un punto di vista genetico molecolare delle patologie neuromuscolari ha rappresentato in passato e continua ad essere un campo in cui l'Istituto si è distinto per la casistica analizzata e per i risultati ottenuti sia dal punto di vista clinico che molecolare in collaborazione con la Clinica Neurologica dell'Università di Milano. Particolare attenzione è stata riservata allo studio delle distrofinopatie, le distrofie dei cingoli e delle miopatie congenite. Più recentemente questa stessa attività è stata estesa a forme di patologie neurodegenerative che interessano prevalentemente o in parte soggetti in età pediatrica, quali le paraparesi spastiche, le malattie del motoneurone ad insorgenza precoce e le epilessie (in particolare quelle dell'età pediatrica). In questi ambiti l'attività della linea è strettamente connessa con l'attività clinica condotta sia all'interno dell'Istituto sia in collaborazione con altre Cliniche Neurologiche distribuite su tutto il territorio lombardo e nazionale. L'attività svolta riguarda la caratterizzazione genetico molecolare dei casi familiari raccolti per ciascuna delle patologie sopra menzionate e ove possibile lo studio funzionale delle mutazioni identificate in collaborazione con altri laboratori specialistici (es. Prof. Tagliatela - Università del Molise, Prof. Clementi - Università di Milano). Per quanto riguarda le epilessie, gli studi clinici e genetici sono affiancati e coadiuvati dalla sezione di Biochimica clinica e Farmacologia con la messa a punto di tecniche di dosaggio di numerosi farmaci antiepilettici, condizione essenziale all'avvio di trial farmacologici. Le collaborazioni intraprese in questi ambiti hanno permesso di attuare un notevole rinnovamento delle attività del laboratorio che parte dalla caratterizzazione genetico molecolare della casistica raccolta per approdare a studi funzionali sulle proteine mutate identificate grazie anche all'utilizzo di diversi modelli cellulari neuronali e non.

Altre aree di attività della linea di Neurobiologia sono rappresentate dallo studio di malattie rare e patologie di interesse psichiatrico e comportamentale (autismo, ADHD, dislessie) in stretta collaborazione con la linea di Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento. In questi ambiti sono stati compiuti notevoli sforzi per attuare un profondo rinnovamento in particolare nel campo della citogenetica dove è stata introdotta l'analisi di CGH-arrays (in collaborazione con la Prof.ssa Zuffardi - Università di Pavia). Tale tecnica affiancata a tecniche standard di genetica molecolare, all'introduzione del sequenziamento automatico applicato su larga scala, all'analisi computerizzata delle sequenze genomiche (in collaborazione con la linea di Bioinformatica) ha permesso l'avvio di uno studio sistematico delle basi molecolari dei riarrangiamenti cromosomici complessi. Analogamente lo studio dei pattern di espressione genica ha permesso un consistente rinnovamento di progetti di ricerca volti all'isolamento di nuovi geni responsabili di patologie rare. A tale riguardo, un esempio è dato dall'emiplegia alternante per la quale l'IRCCS "E. Medea" in seguito all'isolamento del gene coinvolto, ha costituito e conserva al suo interno una banca di materiale biologico proveniente da tutti i pazienti italiani.

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

### Ricerca Ministeriale Corrente 2005:

- Utilizzo del nitrossido come mezzo farmacologico per ottimizzare le terapie cellulari delle distrofie muscolari
- Valutazione clinica, modelli cellulari e approccio terapeutico in diverse patologie neurodegenerative e neuromotorie
- Stress ossidativo, difese antiossidanti e ruolo di recettori di membrana in pazienti con sindrome di Down e malattia di Alzheimer: studio in cellule periferiche da pazienti, modelli neuronali e muscolari
- Analisi di break point in riarrangiamenti cromosomici - Implementazione di algoritmi Support Vector Machines - Cinetiche di rimozione degli introni del gene DMD
- Sviluppo di un modello di Epilessia Mioclonica Giovanile in Drosophila

### RICERCA MINISTERIALE FINALIZZATA 2005:

- Stress ossidativi e fattori di protezione in modelli cellulari di neurodegenerazione

### Altri progetti:

- Ricerca Istituto Superiore Sanità "Approccio integrato clinico-genetico e di neuroimaging funzionale per la terapia cellulare delle ceroidolipofuscinosi"
- Ricerca AISEA "Basi molecolari dell'emiplegia alternante"
- Progetto finanziato da Pfizer e Edison Pharmaceuticals "Cybrids as a tool to investigate the influence of mitochondrial DNA haplogroups on cellular sensitivity to Zyvox (Linezolid-Oxazolidinone Class of Antibiotics)" - Capofila Università degli Studi di Bologna
- Progetto finanziato da Edison Pharmaceuticals "New compounds to impinge redox potential in cell lines harboring mtDNA pathogenic mutations" - Capofila Università degli Studi di Bologna
- Progetto finanziato da Janssen-Cilag SpA "Therapeutic Options in Refractory Epilepsy to Monotherapy" (THEOREM)

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- Utilizzo del nitrossido come mezzo farmacologico per ottimizzare le terapie cellulari delle distrofie muscolari
- Valutazione clinica, modelli cellulari e approccio terapeutico in diverse patologie neurodegenerative e neuromotorie
- Analisi di break point in riarrangiamenti cromosomici ricorrenti e non: studio citogenetico, molecolare, bioinformatico e verifica sperimentale attraverso l'uso di organismi modello
- Sviluppo di un modello di Epilessia Mioclonica Giovanile in Drosophila
- Atassie: valutazione clinico-strumentale e analisi genetica di un'ampia casistica di pazienti. Studio di modelli cellulari e animali

### Altri progetti:

- Ricerca Istituto Superiore Sanità "Approccio integrato clinico-genetico e di neuroimaging funzionale per la terapia cellulare delle ceroidolipofuscinosi"
- Ricerca AISEA "Basi molecolari dell'emiplegia alternante"
- Bandi chiusi 2005 Fondazione Cariplo - Genomica e proteomica di forme sindromiche

- di ritardo mentale associato al cromosoma X con quadri plurimalformativi ed epilessia – Capofila Fondazione Cariplo – inizio 20.02.2006
- Progetti Ricerca Finalizzata Regione Veneto:
    - ULSS 7 – Pieve di Soligo “Sviluppo di un modello di JME in *Drosophila*”
    - ULSS 9 – Treviso “Strategie di prevenzione e trattamento del danno ossidativo in modelli cellulari di malattia neurodegenerativa”
  - Progetti Bando Telethon 2006:
    - Pathogenic mechanism for degeneration of retinal ganglion cells in mitochondrial optic neuropathies – Application GGP0623 – Capofila Università di Bologna
    - The role of SHANK3/Proposal in the Neurological symptoms of patients affected by the 22q13 deletion syndrome – Application GGP06208 – Capofila Università di Milano, CNR Istituto di Neuroscienze, Dip. di Farmacologia

### VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO “TRASLAZIONALE” DELLE RICERCHE CONDOTTE)

L'attività di tipo genetico molecolare condotta nell'ambito delle patologie neuromuscolari e neurodegenerative in particolare nel campo delle malattie rare ha consentito un notevole ampliamento delle potenzialità di diagnostica molecolare con una immediata ricaduta dal punto di vista del SSN. Il successivo avvio di studi funzionali e di caratterizzazione dei prodotti mutati identificati nei pazienti ha lo scopo essenziale di chiarire e definire i meccanismi patogenetici della patologia in esame come condizione essenziale e preliminare per l'identificazione di target terapeutici innovativi. Questo è particolarmente rilevante soprattutto nel caso di patologie rare dove le scarse conoscenze di tipo clinico, epidemiologico e genetico - molecolare impediscono la messa a punto di strategie terapeutiche e farmacologiche efficaci e razionali.

Analogamente, nel campo delle epilessie riveste particolare rilevanza dal punto di vista del SSN dato il suo impatto sociale ed economico, l'avvio di studi farmacologici e di farmacogenomica volti alla comprensione dei meccanismi molecolari della farmacoresistenza, condizione questa presente in circa il 30% dei pazienti epilettici. All'interno di questa ampia casistica il dosaggio ematico dei farmaci più comunemen-

te usati seguito da un'accurata valutazione della loro cinetica di eliminazione permette un utilizzo più razionale e ove possibile personalizzato del farmaco stesso nell'ottica generale di un miglioramento della terapia antiepilettica.

In generale, gli sforzi strutturali ed organizzativi dell'Istituto parallelamente alle collaborazioni instaurate nell'ultimo anno dagli operatori nell'ambito di ciascuna delle ricerche in atto consentiranno una ulteriore evoluzione nella direzione di una ricerca sempre più collegata ed integrata alle necessità della clinica e mirata alla produzione di strategie, conoscenze da tramutarsi in linee guida e/o brevetti di immediato utilizzo per il paziente.

### PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor EL, Clementi E, Bassi MT.: THE FIRST ALS2 MISSENSE MUTATION ASSOCIATED WITH JPLS REVEALS NEW ASPECTS OF ALSIN BIOLOGICAL FUNCTION. *Brain* 2006 Jul;129(Pt 7):1710-9

Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O.: IDENTIFICATION OF A RECURRENT BREAKPOINT WITHIN THE SHANK3 GENE IN THE 22Q13.3 DELETION SYNDROME. *J Med Genet* 2006 Oct;43(10):822-8

Cagliani R, Magri F, Toscano A, Merlini L, Fortunato F, Lamperti C, Rodolico C, Prella A, Sironi M, Aguenouz M, Ciscato P, Uncini A, Moggio M, Bresolin N, Comi GP.: MUTATION FINDING IN PATIENTS WITH DYSFERLIN DEFICIENCY AND ROLE OF THE DYSFERLIN INTERACTING PROTEINS ANNEXIN A1 AND A2 IN MUSCULAR DYSTROPHIES. *Hum Mutat.* 2005 Sep;26(3):283

# LINEA DI RICERCA N. 6

## BIOINGEGNERIA

### RESPONSABILE:

#### GIANLUIGI RENI

nato a Busto Arsizio (Va) il 12/10/1961



#### Istruzione

Laurea in Ingegneria Elettronica presso il Politecnico di Milano

#### Esperienze professionali

- Consulente Tecnico d'Ufficio per il Tribunale di Busto Arsizio, come esperto in tecnologie sanitarie
- Consulente in automazione sanitaria per numerosi ospedali lombardi tra cui Ospedale San Raffaele di Milano, Ospedale Sant'Anna di Como, Policlinico di Milano
- Progettista di sistemi informativi per società di servizi nel campo della proprietà intellettuale (brevetti e marchi)

#### Attività Didattica

Docente di Informatica Medica e Telemedicina in qualità di cultore della materia presso il Politecnico di Milano; di Infrastrutture per la Telemedicina nel Master in Telemedicina, presso CEFRIEL, Milano; di Sistemi Informativi Sanitari, corso IFTS Regione Lombardia Tecnico Superiore di Informatica Medica, Bosisio Parini.

#### Estratto pubblicazioni

- Cavalleri M., Reni G.: A WEARABLE DEVICE TO FACILITATE ORIENTING AND NAVIGATION IN HEALTHCARE FACILITIES. World Congress on Medical Physics and Biomed-

cal Engineering, Proc. Int. Fed. for Med. And Biol. Eng., 4<sup>th</sup> Volume, Sydney, AU, August 24-29, 2003

- Reni G., Molteni M., Arlotti S., Pinciroli F.: CHIEF MEDICAL OFFICER ACTIONS ON INFORMATION SECURITY IN AN ITALIAN REHABILITATION CENTRE. Int. Journ. of Medical Informatics, 73: 271-279, 2004
- Cavalleri M., Morstabilini R., Reni G.: INTEGRATING TELEMONITORING WITH CLINICAL INFORMATION SYSTEMS: A CASE STUDY. Proc. 27th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., Shanghai, China, September 1-4, 2005
- Reni G., Cavalleri M., Pozzoli U.: APPARECCHIATURA PER LA VALUTAZIONE DELLA VERTICALE PROPRIOCETTIVA. Domanda di Brevetto di Invenzione Industriale Italia nr. MI2000A002696 del 13/12/2000
- Reni G., Cavalleri M.: APPARECCHIATURA PER FORNIRE INFORMAZIONI DI GUIDA ED ORIENTAMENTO, IN PARTICOLARE PER PAZIENTI IN ISTITUTI DI CURA. Domanda di Brevetto di Invenzione Industriale Italia nr. MI2003A000880 del 30/04/2003

#### COLLABORATORI

Matteo Cavalleri - Perito informatico

Francesca Motta - Borsista ingegnere

Aurora Pastori - Borsista ingegnere

#### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

L'attività di ricerca del Laboratorio di Bioingegneria si articola attualmente su varie linee:

1. Utilizzo di tecnologie elettroniche avanzate per lo sviluppo di apparecchiature elettromedicali originali
2. Analisi e sperimentazione di modelli e tecnologie per la gestione di dati di pazienti
3. Applicazione di modelli matematici per l'elaborazione di segnali bioelettrici

1. Utilizzo di tecnologie elettroniche avanzate per lo sviluppo di apparecchiature elettromedicali originali

Lavorando nel campo della riabilitazione in età pediatrica, ci si scontra talora con l'inadeguatezza di apparecchiature elettromedicali specificamente progettate per soggetti adulti e con la scarsità di dispositivi di ausilio, considerati dalle aziende produttrici un settore troppo di nicchia per giustificare investimenti importanti.

Grazie alla stretta interazione tra ingegneria e medicina che si è promossa all'interno dell'Istituto, è invece possibile sperimentare tecnologie innovative e trovare soluzioni originali a problemi di natura diagnostica o riabilitativa ancora irrisolti.

Nell'ambito di questo filone sono stati sviluppati diversi dispositivi, divenuti anche oggetto di brevetto di invenzione industriale.

Tra i dispositivi realizzati si segnalano: "Sistema per la stimolazione oculomotoria nei soggetti in età pediatrica"; "Apparecchiatura per la valutazione della verticale propriocettiva"; "SOGNO: Sistema di Orientamento, Guida e Navigazione automatizzato all'interno di edifici pubblici"; "Dispositivo indossabile RF-ID per l'identificazione automatica del paziente e del personale in ospedale".

## 2. Analisi e sperimentazione di modelli e tecnologie per la gestione di dati di pazienti

Ancora oggi la maggior parte dei dati clinici dei pazienti viene maneggiata come se ci trovassimo nel 19° secolo, con note scritte a mano su fogli di carta. Secondo studi recenti (2005), negli Stati Uniti meno di un terzo degli ospedali si avvalgono dell'informatica per registrare dati medici.

Eppure il progresso della conoscenza nel campo della salute si fonda proprio sulla raccolta dei dati sanitari registrati da ciascun paziente.

Da questi dati, attraverso un processo interpretativo ed eventualmente di aggregazione, derivano le informazioni sulla base delle quali si prendono delle decisioni, a tutti i livelli del sistema sanitario: dalla decisione che riguarda il singolo, ad esempio per formulare una diagnosi o per stabilire una terapia, alla decisione che riguarda l'intera organizzazione del servizio sanitario, ad esempio per l'allocazione delle risorse, per il miglioramento della qualità erogata e così via.

È necessario dunque costruire sistemi informativi adeguati, che siano in grado di sostenere un campo in continua evoluzione, dal punto di vista tecnologico, normativo, dal punto di vista delle stesse necessità informative.

L'attività del Laboratorio in questo campo ha consentito di costruire un sistema completo di gestione del paziente, Clinsuite, entrato nell'uso quotidiano del personale sanitario dell'Istituto.

## 3. Applicazione di modelli matematici per l'elaborazione di segnali bioelettrici

La disponibilità di strumentazione elettromedicale sofisticata consente oggi di registrare l'attività elettrica cerebrale durante l'esecuzione di prove con contenuto cognitivo complesso. Analogamente esistono apparati che permettono di registrare immagini del cervello durante il suo funzionamento (ad es. fMRI). Diventa sempre più importante poter disporre di modelli che consentano di fondere i risultati di queste diverse tipologie di esame per ottenere un quadro clinico integrato. Le ricerche in corso presso il nostro Laboratorio sono particolarmente indirizzate allo studio dei segnali EEG in congiunzione con immagini da risonanza funzionale.

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

### Ricerca Ministeriale Corrente 2005:

- Tecnologie per il telemonitoraggio domiciliare di parametri quantitativi in pazienti con patologie critiche

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- Architetture IT per l'integrazione di dispositivi domestici in applicazioni di home care (Itaca)

## VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO "TRASLAZIONALE" DELLE RICERCHE CONDOTTE)

I dispositivi realizzati dal Laboratorio sono utilizzabili per la diagnostica e la riabilitazione.

*Sistema per la stimolazione oculomotoria nei soggetti in età pediatrica*

Permette di ottenere informazioni sul sistema visuo-oculomotore, uno dei sistemi sensoriali normalmente utilizzati per ottenere un corretto orientamento spaziale. L'analisi dei movimenti oculari costituisce inoltre un mezzo per effettuare una migliore diagnosi neurologica, in particolare per individuare patologie troncoencefaliche e cerebellari. Rispetto ad analoghi dispositivi commerciali, lo stimolatore realizzato è in grado di fornire una più vasta gamma di tipologie di stimoli visivi, anche complessi e di rispondere alle esigenze di pazienti in età pediatrica o con limitata capacità di collaborazione.

*Apparecchiatura per la valutazione della verticale propriocettiva*

Consente di indagare la percezione di verticalità che si ottiene attraverso i canali propriocettivi.

Utilizza una tecnologia innovativa (M.E.M.S.), caratterizzata da una miniaturizzazione spinta di elementi semiconduttori in congiunzione con elementi elettromeccanici o chimici. Lo strumento è in grado di trasmettere i dati in modalità wireless dai sensori ad una unità di elaborazione remota, senza fornire punti di riferimento al paziente durante l'esecuzione del test. Il software appositamente sviluppato provvede alla ricostruzione e visualizzazione tridimensionale della posizione del rilevatore rispetto all'ambiente ed al calcolo dei parametri clinici.

*SOGNO: Sistema di Orientamento, Guida e Navigazione automatizzato all'interno di edifici pubblici*

È un dispositivo portatile in grado di fornire funzioni di NAVIGAZIONE: capacità di segnalare in anticipo la presenza di ostacoli fissi come scale, rampe, scivoli; ORIENTAMENTO: possibilità di conoscere la propria posizione all'interno dell'ambiente attrezzato; GUIDA: possibilità di predisporre molteplici percorsi lungo i quali il soggetto può essere accompagnato automaticamente.

Può essere facilmente utilizzato da qualunque tipologia di soggetti, ad esempio soggetti non vedenti, soggetti vedenti con difficoltà di orientamento spaziale, soggetti normodotati.

È configurabile ed adattabile ad ogni edificio, permettendo di attrezzare diversi ambienti con una installazione estremamente semplice e costi esigui.

*Dispositivo indossabile RF-ID per l'identificazione automatica del paziente e del personale in ospedale*

È costituito da un badge con tecnologia RF-ID che può essere utilizzato all'interno delle strutture ospedaliere. Il sistema è stato integrato con il software di gestione documenti clinici in uso in Istituto, introducendo miglioramenti anche nel campo della sicurezza: per esempio si mascherano i dati sensibili quando l'operatore si allontana dalla postazione di lavoro e si riattiva l'accesso al suo ritorno.

La sperimentazione di modelli e tecnologie per la gestione di dati di pazienti ha portato alla messa in funzione in Istituto di un sistema completo di gestione documentale del paziente, Clinsuite, che supporta l'attività quotidiana del personale nella pianificazione dei percorsi di trattamento, nella produzione dei referti, nella distribuzione delle informazioni.

Integrato con Clinsuite è stato anche rilasciato il sistema Meals, che acquisisce le richieste di alimentazione dei pazienti e le trasmette alla cucina per l'opportuna lavorazione.

## PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Reni G, Molteni M, Arlotti S, Pinciroli F.: CHIEF MEDICAL OFFICER ACTIONS ON INFORMATION SECURITY IN AN ITALIAN REHABILITATION CENTRE. *Int. Journ. of Medical Informatics*, 73: 271-279, 2004

Reni G, Cavalleri M.: SISTEMI INFORMATIVI IN SANITÀ. *Saggi*, n. 31, Vol. 4, p. 11-19, 2005

Cavalleri M, Morstabilini R, Reni G.: INTEGRATING TELEMONITORING WITH CLINICAL INFORMATION SYSTEMS: A CASE STUDY. *Proc. 27th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, Shanghai, China, September 1-4, 2005

Cavalleri M, Morstabilini R, Reni G.: A WEARABLE DEVICE FOR A FULLY AUTOMATED IN-HOSPITAL STAFF AND PATIENT RECOGNITION. *Proc. 26th Annu. Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc.*, San Francisco, USA, September 1-5, 2004

## LINEA DI RICERCA N. 7 BIOINFORMATICA

### RESPONSABILI:

**UBERTO POZZOLI**  
**MANUELA SIRONI**

### UBERTO POZZOLI

nato a Lecco il 12.10.1965



#### Istruzione

1994 Laurea in ingegneria ad indirizzo Bioingegneria, Politecnico di Milano

#### Esperienze Professionali

- 1995-2002 Consulenze presso ospedali, università e aziende
- 1995-oggi: Ricercatore presso l'Istituto di Bioingegneria dell'IRCCS "E. Medea"

#### Estratto delle pubblicazioni

- Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U.: ANALYSIS OF INTRONIC CONSERVED ELEMENTS INDICATES THAT FUNCTIONAL COMPLEXITY MIGHT REPRESENT A MAJOR SOURCE OF NEGATIVE SELECTION ON NON-CODING SEQUENCES. *Hum Mol Genet.* 2005 Sep 1;14(17):2533-46. *Epub* 2005 Jul 21
- Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Bresolin N, Cagliani R, Pozzoli U.: FIXATION OF CONSERVED SEQUENCES SHAPES HUMAN INTRON SIZE AND INFLUENCES TRANSCRIPTION-INSERTION DYNAMICS. *Trends Genet.* 2005 Sep;21(9):484-8
- Battaglia M, Ogliari A, Zanoni A, Citterio A, Pozzoli U, Giorda R, Maffei C, Marino C.:

INFLUENCE OF THE SEROTONIN TRANSPORTER PROMOTER GENE AND SHYNESS ON CHILDREN'S CEREBRAL RESPONSES TO FACIAL EXPRESSIONS. *Arch Gen Psychiatry.* 2005 Jan;62(1):85-94

- Pozzoli U, Elgar G, Cagliani R, Riva L, Comi GP, Bresolin N, Bardoni A, Sironi M.: COMPARATIVE ANALYSIS OF VERTEBRATE DYSTROPHIN LOCI INDICATE INTRON GIGANTISM AS A COMMON FEATURE. *Genome Res.* 2003 May;13(5):764-72
- Sironi M, Cagliani R, Pozzoli U, Bardoni A, Comi GP, Giorda R, Bresolin N.: THE DYSTROPHIN GENE IS ALTERNATIVELY SPLICED THROUGHOUT ITS CODING SEQUENCE. *FEBS Lett.* 2002 Apr 24;517(1-3):163-6

### MANUELA SIRONI

nata a Como il 30.11.1971



#### Istruzione

- 1995 Laurea in Scienze Biologiche, Università degli Studi di Milano
- 2001 Specializzazione in Genetica Applicata, Università degli Studi di Milano

#### Esperienze professionali

- 1996-1998: Borsa di studio presso la Clinica Neurologica dell'Ospedale Maggiore Policlinico, Milano. Campo d'interesse: miopatie mitocondriali, genetica delle distrofie muscolari
- 1998-oggi: biologa presso l'IRCCS "E. Medea", Associazione La Nostra Famiglia, laboratorio di bioinformatica.

### Estratto delle pubblicazioni

- Bardoni A, Sironi M, Felisari G, Comi GP, Bresolin N.: ABSENCE OF BRAIN DP140 ISOFORM AND COGNITIVE IMPAIRMENT IN BECKER MUSCULAR DYSTROPHY. *Lancet*. 1999 Mar 13;353(9156):897-8
- Pozzoli U, Elgar G, Cagliani R, Riva L, Comi GP, Bresolin N, Bardoni A, Sironi M.: COMPARATIVE ANALYSIS OF VERTEBRATE DYSTROPHIN LOCI INDICATE INTRON GIGANTISM AS A COMMON FEATURE. *Genome Res*. 2003 May;13(5):764-72
- Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Bresolin N, Cagliani R, Pozzoli U.: FIXATION OF CONSERVED SEQUENCES SHAPES HUMAN INTRON SIZE AND INFLUENCES TRANSPON-INSERTION DYNAMICS. *Trends Genet*. 2005 Sep;21(9):484-8
- Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U.: ANALYSIS OF INTRONIC CONSERVED ELEMENTS INDICATES THAT FUNCTIONAL COMPLEXITY MIGHT REPRESENT A MAJOR SOURCE OF NEGATIVE SELECTION ON NON-CODING SEQUENCES. *Hum Mol Genet*. 2005 Sep 1;14(17):2533-46. Epub 2005 Jul 21
- Sironi M, Pozzoli U, Comi GP, Riva S, Bardoni A, Bresolin N, Nag DK.: A REGION IN THE DYSTROPHIN GENE MAJOR HOT SPOT HARBORS A CLUSTER OF DELETION BREAKPOINTS AND GENERATES DOUBLE-STRAND BREAKS IN YEAST. *FASEB J*. 2006 Aug 4;20(11):1910-1912

### COLLABORATORI

Rachele Cagliani – Biologa

Giorgia Menozzi – Matematica

Stefania Riva – Tecnica di laboratorio

Matteo Cereda - Bioingegnere

### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

Il completamento del progetto genoma ha indicato che i geni umani sono molti meno di quanto ci si aspettasse e che la porzione genomica codificante rappresenta meno del 2%. Inoltre, la disponibilità delle sequenze genomiche di altri organismi ha consentito di confrontarle con quella umana identificando un grande numero di sequenze conservate non codificanti e con funzione ignota. Studi recenti hanno inoltre dimostrato che circa il 60% del nostro genoma è trascritto e che

molti trascritti rappresentano categorie molecolari "nuove" come, ad esempio, RNA antisenso o microRNA con probabile funzione regolatoria. Infine, alcuni lavori recenti hanno dimostrato che mutazioni in sequenze conservate non codificanti rappresentano la causa di patologie genetiche umane. Risulta evidente che lo studio delle regioni non codificanti del genoma umano rappresenta una delle sfide della genetica moderna.

Un obiettivo fondamentale della linea di ricerca in bioinformatica è proprio lo studio di tali sequenze con particolare attenzione alla loro evoluzione e caratterizzazione funzionale.

Inerente a queste tematiche è lo studio dei meccanismi che regolano i fenomeni di splicing alternativo in cui le regioni non codificanti (e probabilmente anche i trascritti anti-senso) svolgono un ruolo importante. In particolare sequenze conservate introniche spesso rappresentano regolatori dell'efficienza di splicing dell'esone fiancheggiante. Analisi computazionali di sequenze conservate introniche hanno consentito di identificare nuovi elementi regolatori di splicing tessuto-specifici. Ma anche questo campo è aperto a nuove indagini, sia riguardo all'identificazione di regolatori in cis, sia per quanto concerne l'analisi di possibili trans-regolatori quali RNA-antisenso.

Un altro aspetto importante dell'attività di ricerca in bioinformatica riguarda lo studio di elementi genomici non codificanti nella regolazione di geni muscolo-specifici e l'identificazione di nuovi trascritti non-coding a funzione regolatoria con espressione muscolare. Ciò consente una migliore comprensione degli eventi molecolari coinvolti nei processi di differenziamento, crescita e apoptosi delle cellule muscolari e, auspicabilmente, l'identificazione di nuovi target mutazionali o loci modificatori.

Un altro indirizzo della linea di ricerca in bioinformatica riguarda lo studio degli eventi di ricombinazione legittima e illegittima nel genoma umano con particolare attenzione ai meccanismi molecolari responsabili di aberrazioni cromosomiche e delezioni intrageniche. In questo ambito l'utilizzo di metodiche statistiche e computazionali rappresenta un utile strumento per l'identificazione di elementi strutturali o di sequenza che abbiano un ruolo nell'origine degli eventi di ricombinazione. Infine l'esperienza maturata nell'impiego e nella messa a punto di strumenti di calcolo specifici e nella gestione dei database biologici ha consentito di evidenziare una serie di problematiche relative alla condivisione dei dati e dei formati per un efficiente impiego mediante diversi software

comunemente impiegati nel campo. Per questa ragione è stato sviluppato un sistema software in grado di integrare in maniera semplice e rapida diverse risorse di calcolo e sorgenti di dati rendendone al contempo la fruizione semplice e immediata anche da parte di un pubblico non specialistico attraverso semplici e intuitive interfacce web.

## REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2006

### Ricerca Ministeriale Corrente 2006:

- Analisi molecolare e bioinformatica della ricombinazione meiotica umana
- Identificazione, analisi e caratterizzazione funzionale di SNPs, MCS e elementi trasponibili nel genoma umano: le potenzialità dell'uso combinato di divergenza interspecifica e variabilità intraspecifica

### VALUTAZIONE RICADUTE CLINICHE (ASPETTO "TRASLAZIONALE" DELLE RICERCHE CONDOTTE)

Il completo sequenziamento del genoma umano, così come di altre specie, va considerato più un punto di partenza che di arrivo. La sfida che questa grande mole di dati pone oggi è quella di comprenderne il funzionamento a tutti i livelli. È ormai superato l'approccio gene/proteina che ha pur dato risultati importantissimi in passato ma che oggi mostra tutti i suoi limiti nel fornire strumenti per la comprensione dei meccanismi patogenetici. Si sa che i nostri (relativamente pochi) geni interagiscono in modi complessi non solo a livello dei loro prodotti (le proteine) ma anche a livello genomico. La regolazione dell'espressione, l'editing post-trascrizionale, l'esistenza di forme alternative di splicing e, in generale, i fenomeni epigenetici sono meccanismi fondamentali e complessi per la cui comprensione abbiamo ancora moltissima strada da fare. Chiarirne il funzionamento è importante non solo da un punto di vista conoscitivo, ha implicazioni fondamentali nell'impiego di approcci innovativi alla cura e alla riabilitazione. Terapia genica, farmacogenomica, impiego di cellule staminali sono approcci nuovi e promettenti che necessitano di queste conoscenze per esprimere tutto il loro potenziale. Lo studio dei meccanismi che operano a vari livelli nel genoma umano ha dunque delle ricadute cliniche fondamentali, dalle più dirette, come ad esempio l'individuazione di target diagnostici finora ignoti, a quelle più sottili, ma non per questo meno

importanti, che la disponibilità di conoscenze di questo tipo può indurre tra i clinici che hanno in tal modo a disposizione strumenti conoscitivi nuovi e in grado di affrontare problematiche difficili anche solo da immaginare fino a pochissimo tempo fa. Il nostro scopo è quello di rendere condivisi e fruibili i risultati ottenuti dall'attività di ricerca, anche attraverso lo sviluppo di appositi strumenti e interfacce informatiche.

### PUBBLICAZIONI PRODOTTE

Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Bresolin N, Cagliani R, Pozzoli U.: FIXATION OF CONSERVED SEQUENCES SHAPES HUMAN INTRON SIZE AND INFLUENCES TRANSPOSON-INSERTION DYNAMICS. *Trends Genet.* 2005 Sep;21(9):484-8

Sironi M, Menozzi G, Comi GP, Cagliani R, Bresolin N, Pozzoli U.: ANALYSIS OF INTRONIC CONSERVED ELEMENTS INDICATES THAT FUNCTIONAL COMPLEXITY MIGHT REPRESENT A MAJOR SOURCE OF NEGATIVE SELECTION ON NON-CODING SEQUENCES. *Hum Mol Genet.* 2005 Sep 1;14(17):2533-46. Epub 2005 Jul 21

Sironi M, Pozzoli U, Comi GP, Riva S, Bordoni A, Bresolin N, Nag DK.: A REGION IN THE DYSTROPHIN GENE MAJOR HOT SPOT HARBORS A CLUSTER OF DELETION BREAKPOINTS AND GENERATES DOUBLE-STRAND BREAKS IN YEAST. *FASEB J.* 2006 Aug 4;20(11):1910-1912

# LINEA DI RICERCA N. 8

## ORGANIZZAZIONE DEI SERVIZI SANITARI

Il Team operativo è in via di ridefinizione.

### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

L'indirizzo generale della ricerca che l'Istituto sviluppa nel settore dedicato alla organizzazione dei servizi sanitari espressamente riferiti alla cura delle disabilità in età evolutiva, tiene anzitutto conto del fatto che i trattamenti riabilitativi stanno attraversando una fase di rapida evoluzione, a sua volta connessa ad una più precisa conoscenza dell'etiologia e della patogenesi delle malattie di base e degli esiti invalidanti che ne conseguono.

Per lo più tale sviluppo deriva dalle nuove acquisizioni conoscitive consentite da studi di carattere genetico.

L'Istituto ha inteso affrontare alcuni profili di indagine che vengono suggeriti da problematiche nuove che derivano da tale quadro, il quale evoca, anzitutto, la necessità di ripuntualizzare strumenti affidabili ed efficaci al fine di definire il profilo funzionale del paziente.

L'acquisizione di nuove ipotesi patogenetiche e la maturazione di nuovi modelli neurofisiologici che determinano, a loro volta, l'introduzione di innovative modalità di presa in carico del soggetto, tendono a scomporre il quadro di una uniforme applicazione di protocolli, per cui diventa importante verificare, attraverso una ricognizione degli approcci riabilitativi nelle disabilità neuropsichiche complesse, come si distribuiscono nelle nostre Regioni e tra diversi Paesi europei, i punti di contatto e quelli di divergenza, in vista di una ricomposizione di linee di intervento convalidate e condivise.

Tale percorso di ragionata omogeneizzazione dei percorsi terapeutico-riabilitativi ha, ovviamente, bisogno di rapportarsi a strumenti attendibili di misurazione dell'efficacia del trattamento che diano conto della "qualità della vita associata allo stato di salute", cioè di un parametro in cui confluiscono elementi oggettivi e percezioni soggettive.

In un contesto che evolve rapidamente sotto il profilo tecnico e da tradurre, secondo una connotazione operativo-professionale di larga inter-

disciplinarietà, in una fattuale e concreta presenza di strutture ad hoc che permettano idealmente una uniforme facoltà di accesso ai servizi, diventa evidentemente di estremo interesse studiare, in stretta connessione al territorio, dove si presentino eventuali colli di bottiglia che, al contrario, limitino o rendano diseguale, per diversi raggruppamenti di cittadini, l'esercizio del proprio diritto alla salute e l'effettiva fruizione delle nuove potenzialità offerte dallo sviluppo della ricerca scientifica.

### REPORT ATTIVITÀ SCIENTIFICA 2005

#### Ricerca Ministeriale Corrente 2005:

- Individuazione di strumenti diagnostici clinico-funzionali e di strategie di intervento basati su protocolli internazionali condivisi nella riabilitazione delle disabilità neuropsichiche complesse dell'età evolutiva.

### PUBBLICAZIONI

- Guarisco S, Molteni A, Zacchi S.: IL SISTEMA INFORMATIVO OSPEDALIERO A SUPPORTO DEL SISTEMA QUALITÀ. Saggi - Child Development & Disabilities 2005; XXXI,4:69-75
- Leonardi M, Bickenbach J, Raggi A, Sala M, Guzzon P, Valsecchi MR, Fusaro G, Russo E, Francescutti C, Nocentini U, Martinuzzi A.: TRAINING ON THE INTERNATIONAL CLASSIFICATION OF FUNCTIONING, DISABILITY AND HEALTH (ICF): THE ICF-DIN BASIC AND THE ICF-DIN ADVANCED COURSE DEVELOPED BY THE DISABILITY ITALIAN NETWORK. Journal of Headache and Pain (The) 2005;6,3:159-164
- Pellegrini A.: IL VALORE DEL LIMITE, LE FRONTIERE TECNOLOGICHE E LA PROSPETTIVA UMANA. Panorama Sanità 2005;44:14
- Reni G, Cavalleri M, Guarisco S, Magni C, Molteni A.: IL SISTEMA CLINSUITE: UN CLINICAL PATIENT RECORD DALLA RICERCA ALLA PRATICA CLINICA. Saggi - Child Development & Disabilities 2005; XXXI,4:39-49

## LINEA DI RICERCA N. 9

### BIOETICA

#### RESPONSABILE:

#### CLAUDIA CORSOLINI

Nata il 07/08/1966 a Milano



#### Istruzione

- Nov. 1985 – marzo 1991 - Università di Milano – Facoltà di Giurisprudenza - Corso di Laurea in giurisprudenza - Tesi di Laurea "I diritti delle persone disabili nel diritto comunitario" - Dottore in Giurisprudenza
- Sett. 1997 – marzo 2001 - Università degli Studi di Padova – Scuola di specializzazione in Istituzioni e tecniche di tutela dei diritti umani - Tesi di specialità "Bioetica, diritti umani e disabilità" - Specialista in Istituzioni e tecniche di tutela dei diritti umani

#### Esperienze professionali

- maggio 1990- dicembre 1991 - Collaboratore part time OVCI (Organismo di volontariato per la Cooperazione Internazionale) La Nostra Famiglia - Responsabile della segreteria Lombardia con mansioni di coordinamento delle attività di educazione allo sviluppo
- gennaio 1992 – agosto 1998 - Impiegata nella Direzione Generale Associazione La Nostra Famiglia  
Parziale distacco presso OVCI con incarico di segretaria nazionale e responsabile del settore Italia
- Settembre 1998 – settembre 2006 - Impiegata nella Direzione Generale Associazione La Nostra Famiglia

- settembre 2006 – oggi - Montecatone Rehabilitation Institute Spa - Imola (BO) - Ospedale per lesionati midollari, gestito da una Spa che vede in compartecipazione enti pubblici e privati - Coordinatore Dipartimento Reinserimento
- componente del Comitato etico dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico "Eugenio Medea" (fino al 2004 compreso)

#### Attività Didattica

- Sett. 1998 – 2003 - docente di diritto pubblico e politica sociale presso la Scuola per Educatori professionali
- 1999 - 2000 - docente di diritto sanitario presso la Scuola per Terapisti della riabilitazione
- Sett. 2001 – oggi - Università Cattolica del Sacro Cuore – Milano - Docente a contratto presso il Corso di Laurea in servizio sociale – sede di Bosisio Parini: Corso di Diritto Pubblico e Organizzazione dello Stato; Corso di Legislazione sociale
- Sett. 2003 – Gennaio 2004 - Pontificia Università Cattolica dell'Ecuador – sede di Esmeraldas - Docente con borsa di studio internazionale: Corso di Marco Legal Internacional de las Personas en Riesgo

#### Estratto delle pubblicazioni

Tesi di specializzazione pubblicata con il titolo "Bioetica, diritti umani e disabilità" (numero speciale della rivista scientifica "Saggi" dell'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico Medea 2/2002)

#### INDIRIZZI STRATEGICI GENERALI

La linea di ricerca espressamente dedicata alla bioetica è stata organicamente contemplata nel quadro programmatico dell'attività scientifica dell'Istituto solo dallo scorso anno e non sono, pertanto, disponibili ad oggi report e pubblicazioni che vi afferiscano.

È attualmente in corso di elaborazione un progetto inerente l'esito dei processi di inserimento lavorativo di giovani disabili affetti da ritardo

mentale lieve, in funzione dei percorsi agibili secondo la legislazione vigente.

La valutazione in chiave etico-sociale dei profili economico-finanziari ed organizzativo-gestionali della legislazione e delle politiche sanitarie ed assistenziali dirette ai soggetti disabili rappresenta, infatti, uno dei versanti che rientrano negli obiettivi programmatici della linea di ricerca.

In una fase in cui è necessario, anche in ambito riabilitativo, attuare un contenimento delle risorse e conservare nel contempo lo standard qualitativo delle prestazioni erogate, è importante rimodulare i programmi personalizzati di trattamento alla luce del maggiore o minor successo, documentato nel tempo, dell'inserimento sociale e lavorativo fin qui ottenuto.

Dal momento che l'out - come in medicina riabilitativa rappresenta un punto di riferimento da mantenere costante, ci si propone - analizzando un significativo gruppo di giovani disabili che, attraverso un percorso riabilitativo prolungato, hanno sviluppato buone abilità sul piano lavorativo - di verificare quali indicatori positivi e negativi debbano essere tenuti presenti nella fase di studio ed elaborazione dei progetti personalizzati.

Le finalità che l'Istituto intende perseguire, adottando una specifica linea di ricerca in campo bioetico, sono, peraltro, di più ampio raggio.

In modo particolare, proprio nell'infanzia, nell'adolescenza e nell'età giovane-adulta, i trattamenti di carattere neuroriabilitativo - soprattutto quando coinvolgono le funzioni superiori e la sfera emozionale ed affettiva - suscitano frequenti e complessi quesiti di ordine etico.

Altri versanti altrettanto impegnativi e di quotidiana frequentazione in una realtà qual è quella del nostro Istituto sono rappresentati dalle modalità di consenso informato, dalla comunicazione della prognosi alla coppia parentale soprattutto quando sono implicati aspetti di consiglio genetico, dalla corretta gestione di informazioni genetiche, talvolta anche di carattere predittivo e comunque riferite al contesto familiare.

Sempre più spesso interrogativi di carattere etico sorgono anche in relazione ai criteri e modalità di approccio ad una utenza ormai di natura multi-etnica.

Inoltre, in termini più generali, dal momento che qualunque attività di ricerca è inevitabilmente inscritta in una determinata cornice culturale e rinvia comunque ad una riflessione "metascientifica", il nostro Istituto è vivamente interessato ad approfondire le implicanze antropologiche

degli sviluppi conoscitivi in campo biomedico e biotecnologico.

A tale proposito ed al fine di creare un "ambiente etico condiviso" - come fattore, del resto, non indifferente anche in funzione dell'eccellenza tecnica delle prestazioni - è stato avviato un lavoro comune di condivisione dell'analisi e della elaborazione di tematiche da porre prioritariamente allo studio, tra Comitato di Etica, Comitato Tecnico-Scientifico e Consiglio di Gestione dell'Istituto.

**RICERCHE  
MINISTERIALI  
CORRENTI 2005**

**RISULTATI**

## SCREENING AD ALTA RISOLUZIONE MEDIANTE CGH-ARRAY (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) IN SOGGETTI CON QUADRO MALFORMATIVO COMPLESSO

**DR. RENATO BORGATTI**

e-mail: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

In questa primo anno sono stati selezionati 30 soggetti con RM medio/grave associato ad anomalie multiple congenite dei quali le precedenti analisi del cariotipo e delle regioni subtelomeriche erano risultate negative e 5 pazienti con un quadro sindromico associato a riarrangiamenti cromosomici.

L'applicazione della metodica array-CGH nei casi con riarrangiamenti noti ha permesso di testare l'efficacia del metodo e la messa a punto del protocollo di esecuzione dell'analisi. In particolare i risultati hanno permesso di caratterizzare velocemente a livello molecolare sbilanci cromosomici e di chiarirne la loro natura.

Nello specifico:

- 1) caso 46,XY, del(12)(p11.2p12.1): ha confermato la presenza di una delezione interstiziale sul cromosoma 12p definendone l'estensione di circa 10 Mb.
- 2) 46,XY. ish del(3)(q29)(3qtel-): è stata confermata, dopo precedenti approfondimenti di citogenetica molecolare mediante fish con cloni di BACs relativi alla regione cromosomica 3q29, la presenza di una delezione interstiziale.
- 3) 46,XY, t(8;18)(q21.2;q21.2): l'analisi mediante array-CGH ha dimostrato che la traslocazione t(8;18) era bilanciata. Due delezioni a carico di 14q32.33 (105 Mb dal telomero del braccio corto) e 15q11.2 (19 Mb dal telomero del braccio corto),

quest'ultima presente anche nel padre, sono polimorfismi noti.

- 4) 46,XX. ish der(19)t(19;21)(q13.4;q22.3)(Tel19q+,Tel21q+) pat. Poiché il riarrangiamento subtelomerico era familiare, presente nel padre e nonno paterno sani, è stata eseguita l'analisi mediante l'array - CGH per ricercare eventuali sbilanci genomici causativi del fenotipo della probanda. In questo caso non sono stati riscontrati sbilanci cromosomici mediante array-CGH, confermando che il riarrangiamento subtelomerico rappresenta un polimorfismo privo di significato patologico. La conferma definitiva si è avuta dal fatto che è stata trovata una mutazione puntiforme nel gene UB3A.
- 5) 46,XY. ish del(6)(q27q27)(6qtel-): in questo caso l'analisi mediante array-CGH ha permesso di confermare la presenza di una delezione terminale pura a carico del cromosoma 6q27 e di caratterizzare velocemente l'estensione della delezione risultata pari a circa 4 MB.
- 6) 46,XX del 8q23.4. In questo caso l'analisi mediante array-CGH ha permesso di individuare una delezione pari a 0.5 Mb, in un paziente negativo alle precedenti indagini. Sono in corso ulteriori indagini sui genitori per escludere che si tratti di un polimorfismo privo di significato patologico.

Nel corso del secondo anno, oltre a completare lo studio del caso n. 6 verranno portate a termine le analisi mediante array-CGH dei rimanenti 15 casi già selezionati.

## LEUCOENCEFALOPATIE GENETICHE: STUDIO CLINICO- NEURORADIOLOGICO E GENETICO

### DR. RENATO BORGATTI

e-mail: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

#### Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

#### Tipo di Ricerca

Corrente

#### Periodo di svolgimento

2005

#### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

Mutazioni del gene MBP, codificante per la proteina basica della Mielina ("MBP Myelin basic protein") provocano nel topo uno specifico quadro neuroradiologico e clinico, caratterizzato da severa dismielinizzazione del SNC, tremori nei primi 10-12 giorni di vita, atassia progressiva, paralisi agli arti ed epilessia (topi "Long Evans Shaker"). Nell'uomo mutazioni a carico dello stesso gene non sono mai state segnalate.

Abbiamo rivalutato, dal punto di vista clinico e neuroradiologico, tutti i soggetti afferiti al nostro Istituto nel periodo 2000/2005 e sottoposti ad indagine neuroradiologica, al fine di identificare gruppi omogenei di pazienti e famiglie informative in cui procedere con ulteriori indagini biochimiche e molecolari. Nel corso del lavoro effettuato durante il 2004 sono stati così inizialmente individuati 79 soggetti (54 maschi di età compresa tra 1 e 23 anni e 25 femmine di età compresa tra 2 e 24 anni) con quadro neuroradiologico di leucoencefalopatia. Di essi, ulteriori approfondimenti clinici hanno permesso di selezionare 32 soggetti con caratteristiche cliniche e neuroradiologiche suggestive per il coinvolgimento del gene MBP.

L'analisi molecolare del gene MBP è stata effettuata in 14 soggetti. In nessun caso analizzato sono state evidenziate mutazioni a carico di MBP. In tre casi le indagini citogenetiche eseguite (cariotipo ad alta risoluzione e ricerca dei riarrangiamenti cromosomici subtelomerici) hanno messo in evidenza alterazioni coinvolgenti la regione cromosomica 18q23, contenente il gene MBP. Si tratta di un soggetto con sindrome 18q- e due con riarrangiamenti subtelomerici sbilanciati per traslocazioni (5;18) e (1;18) e con-

seguente monosomia 18q23. In tutti questi casi il quadro clinico e neuroradiologico è in buona parte sovrapponibile a quello descritto nei topi "Long Evans Shaker". In conclusione il presente studio, attraverso l'individuazione di tre nuovi casi con riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione 18q23, ha consentito di confermare l'ipotesi che vede il gene MBP implicato nel determinismo di alcune forme di leucoencefalopatia. Al momento attuale manca ancora la conferma attraverso l'individuazione di soggetti portatori di una mutazione puntiforme del gene. È nostra intenzione proseguire lo studio di genetica molecolare nei casi non ancora analizzati e proseguire con il reclutamento di altri soggetti che presentino un fenotipo neuroradiologico simile.

## STUDIO DELLA QUALITÀ DELLE CURE, DEI LIVELLI DI STIMOLAZIONE E DEI PROCESSI DI REGOLAZIONE PRECOCE DEL BAMBINO PRETERMINE COME FATTORI PREDITTIVI DELLA QUALITÀ DELLA RELAZIONE MADRE-BAMBINO

**DR. RENATO BORGATTI**

e-mail: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 1**

Neuropatologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2005

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

**Background.** È stato documentato che i fattori di rischio connessi alla nascita pretermine possono influire sulla crescita dei bambini prematuri, contribuendo a ritardarne o ad ostacolarne lo sviluppo. Sebbene i disturbi spesso insorgano solo in età prescolare e scolare, recenti studi ne individuano l'origine nelle difficoltà di regolazione neonatali. Nel valutare le capacità di regolazione dei pretermine, inoltre, occorre tenere in considerazione l'influenza delle stimolazioni precoci (sia fisiche che sociali) e delle cure ricevute dal bambino nel corso del ricovero nel reparto di Terapia Intensiva, nonché la qualità della relazione instaurata con il caregiver. Per quanto a noi noto, nessuno studio ha indagato il rapporto tra questi fattori precoci, qualità della relazione madre-bambino e la qualità della vita dei bambini pretermine in età prescolare. In collaborazione con i Reparti di Patologia Neonatale e Terapia Intensiva degli Ospedali "Manzoni" di Lecco e "Circolo - Fondazioni Macchi" di Varese, quindi, è stato progettato uno studio longitudinale multicentrico della durata di tre anni con l'obiettivo generale di analizzare il rapporto tra qualità delle cure, qualità della relazione primaria e qualità della vita.

**Obiettivi.** La natura longitudinale dello studio ha implicato per l'anno 2005 il conseguimento di obiettivi intermedi quali: 1. dal punto di vista metodologico la messa a punto e l'adattamento italiano di alcuni strumenti (traduzione in lingua

italiana di alcuni questionari e validazione di procedure di osservazione della relazione madre-bambino); 2. dal punto di vista organizzativo, invece, si è provveduto a prendere contatti con alcuni Centri di Patologia Neonatale e di Terapia Intensiva Neonatale della Lombardia.

### Metodo e procedura

Per quanto riguarda gli obiettivi metodologici sono stati realizzati quattro studi pilota. *Studio 1.* Il primo è stato condotto al fine di analizzare le rappresentazioni materne attraverso la somministrazione di un'intervista semistrutturata appositamente realizzata. L'intervista è stata somministrata a 35 madri quando i loro bambini avevano un'età compresa tra 7 e 12 mesi. Di queste, 16 erano madri di bambini pretermine (età gestazionale  $\leq 37$  settimane e peso alla nascita  $\leq 2500$  gr.) e 19 di bambini nati a termine. Le interviste sono state codificate effettuando un'analisi del contenuto delle rappresentazioni e un'analisi dei predicati utilizzati. I rimanenti tre studi sono stati condotti su bambini nati a termine in modo da validare procedure di osservazione della relazione madre-bambino appositamente messe a punto per bambini di 30 mesi. *Studio 2.* 28 coppie madre-bambino hanno portato a termine la procedura Still-Face, la cui codifica è stata effettuata in base al sistema CCMR. *Studio 3 e 4.* 20 diadi hanno partecipato anche alle procedure Clean-up ed Empatia, la cui codifica si è basata sul sistema RAP-CRSS (Tronick, 2003) e, per il paradigma Empatia, anche sul sistema ESGCS (Buchsbaum e Emde, in Lindahl, 1988). Per sopperire alla carenza di strumenti in lingua italiana finalizzati a valutare la qualità della vita dei bambini in età prescolare e scolare, si è proceduto a tradurre il questionario TAPQOL, sviluppato dal Leiden Center for Child Health and Pediatrics. Sono state effettuate due traduzioni della versione inglese e due back-translation ed è stata ricavata un'unica versione adattata alla lingua italiana. Inoltre, sono stati tradotti e adattati all'italiano due questionari relativi al grado di stress e di supporto sperimentato dai genitori durante il ricovero del bambino nella TIN: il PSS: NICU e il NPST di M. Miles. Per tutti e tre gli strumenti il processo di traduzione ed adattamento è stato concordato con gli Autori che ne hanno poi autorizzato l'uso riconoscendo queste versioni come quelle ufficiali per la lingua italiana. È stata messa a punto una scheda di rilevazione del tipo di cure e di stimolazioni ambientali fornite al neonato durante il ricovero

nella TIN. Infine, è stato avviato un percorso formativo volto ad acquisire specifiche competenze nella somministrazione di una scala di valutazione delle capacità di regolazione del neonato applicabile anche con bambini nati pretermine: la NNNS (Lester e Tronick, 2004). Dal punto di vista organizzativo, 9 Centri di Patologia Neonatale e di Terapia Intensiva Neonatale operanti in Lombardia sono stati invitati a partecipare allo studio sottoponendo il protocollo di ricerca alle rispettive Amministrazioni e Comitati Etici.

### Risultati e discussione

Per quanto riguarda gli studi pilota: *Studio 1*. Si è riscontrata una sostanziale omogeneità tra le risposte delle madri dei due gruppi, suggerendo che alcuni mesi dopo il parto le mamme dei pretermine hanno potuto elaborare il disagio iniziale e ridefinire le proprie rappresentazioni. *Studio 2*. In linea con i risultati della letteratura internazionale nel corso dello Still-Face si osservano reazioni emotive e comportamentali che segnalano la capacità del bambino di autoregolarsi in una situazione di stress controllato. *Studio 3 e 4*. I comportamenti osservati durante le procedure Empatia e Clean-up confermano questo risultato e mettono in luce il ruolo del contesto socio-ambientale, e soprattutto della relazione con la madre, nello sviluppo delle competenze socio-emozionali in età prescolare. I risultati ottenuti in questi studi preliminari contribuiscono a dimostrare la validità dell'intervista messa a punto e l'applicabilità dei paradigmi sperimentali anche in ambito italiano. La traduzione dei questionari, la messa a punto della scheda di valutazione dell'ambiente della TIN e l'avvio del training per la somministrazione della scala NNNS hanno permesso di colmare le carenze in ambito italiano rispetto a queste aree di indagine. Infine, tutti i Centri contattati hanno fornito la loro adesione a partecipare al progetto di ricerca. Globalmente, quindi, il raggiungimento degli obiettivi preliminari di tipo metodologico e organizzativo che la RC 2005 si era proposta ha permesso di definire e completare il protocollo di ricerca e di predisporre le condizioni essenziali per avviare un progetto longitudinale e multicentrico.

## DISTURBI VISUOPERCETTIVI COMPLESSI IN QUADRI DISFUNZIONALI IN ETÀ EVOLUTIVA: LA DISLESSIA E LA SINDROME DI WILLIAMS

**DR. RENATO BORGATTI**

e-mail: RENATO.BORGATTI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 1**

Neuropatologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2005

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: approfondimento neuropsicologico e socio-cognitivo sulle modalità percettive nella Sindrome di Williams (Resp. Dr.ssa Chiara Gagliardi)

La sindrome di Williams costituisce un modello per lo studio delle relazioni genotipo/fenotipo molto utilizzato a livello internazionale. Considerata la rarità della sindrome (incidenza 1/20000 nati) e la relativa sua recente identificazione (si calcoli che solo nel 1994 si è verificata la sua eziologia genetica), vi sono ancora molti aspetti inesplorati.

Nel primo anno di ricerca (2004) era stato messo a punto un nuovo test sperimentale mirato all'approfondimento del comportamento ipersociale e della sua eventuale correlazione con una anomala modalità percettiva dell'approachability determinata sulle espressioni facciali (risultati del lavoro pubblicato su *Neuropsychologia*).

Sono stati inoltre messi a punto altri due disegni sperimentali: il primo studio mira a valutare una caratteristica del pattern di interpretazione dell'immagine visiva proveniente dall'osservazione del volto umano, attraverso la valutazione delle caratteristiche percettive dell'elaborazione di volti noti. Il secondo, invece, punta ad approfondire l'eventuale influenza della componente ansiosa sulle caratteristiche percettive dei soggetti con SW. È stato condotto un primo test pilota con i due nuovi disegni sperimentali, che ha dato risultati positivi. Data comunque la richiesta di attenzione visiva sostenuta sufficiente per la durata del compito, alla luce anche delle esperienze pregresse nei test sperimentali percettivi sulla

casistica, si è ritenuto necessario approfondire e meglio definire le capacità attentive visive del campione selezionato, per permettere una maggiore affidabilità dei dati raccolti.

Si è pertanto modificato il disegno della ricerca, sottoponendo i pazienti SW dapprima al CPT (Continuous Performance Test, Conners 92). Per una migliore definizione del pattern neurologico, in vista degli studi di correlazione struttura funzione neurofunzionali, è stato inoltre condotto uno studio trasversale sulla casistica e uno retrospettivo per consentire un confronto diacronico tra i soggetti, alla ricerca di segni neurologici minori. Questa modificazione del disegno di ricerca ha causato uno slittamento dei tempi, per cui i dati relativi ai test sperimentali percettivi sono fino ad ora stati raccolti in totalità per i soggetti SW e solo parzialmente per i controlli; tali dati non possono essere elaborati però in assenza di un matching accurato, per ora non possibile.

Si sono documentate le difficoltà attentive presenti nella popolazione SW, che non risultano sostanzialmente correlate né con QI né con Età mentale né con Età cronologica, e che quindi potrebbero essere parte integrante del fenotipo cognitivo, deponendo per la presenza di un impairment delle funzioni esecutive che sarebbe correlato con problematiche di tipo frontale.

Lo studio neurologico ha fornito dati inattesi e non riportati in letteratura (submitted): si è infatti rilevata la presenza di segni neurologici minori con elevata incidenza in tutto il campione: in particolare i segni cerebellari minori sono frequenti su tutte le fasce di età, in apparente assenza di modificazione diacronica. I segni extrapiramidali, invece, hanno un andamento funzione dell'età, che risulta fortemente suggestivo di una progressione nel tempo o di una maggiore sensibilità a processi di invecchiamento precoce.

I due progetti di ricerca suggeriscono quindi, con percorsi differenti, il coinvolgimento di strutture analoghe e più specificamente dei circuiti dopaminergici fronto striatali nel determinismo del fenotipo SW e risultano evocativi del possibile ruolo della syntaxina. Questi dati consentiranno quindi di indirizzare in modo più specifico lo studio neuroradiologico funzionale.

**Sottoprogetto n. 2: valutazione del campo visivo in soggetti con dislessia evolutiva tramite stimolazione selettiva della via parvocellulare e magnocellulare (Resp. Dr. Paolo Cecchini)**

La dislessia evolutiva, o disturbo specifico della lettura, è definito come un disturbo nello svilup-

po delle abilità di lettura in presenza di un adeguato livello intellettivo, adeguate opportunità di apprendimento e in assenza di deficit neurosensoriali. Alcuni lavori hanno ipotizzato che la via Magnocellulare (via M) o sistema transiente possa essere coinvolta nella dislessia, sebbene altri studi, utilizzando i potenziali evocati visivi, non depongono per un interessamento della via M. L'obiettivo del presente studio è di valutare il campo visivo in bambini affetti da dislessia evolutiva, mediante l'utilizzo della perimetria High-Pass Resolution Perimetry, che elicitava l'attivazione della via Parvocellulare, e della Frequency Doubling Perimetry, che stimola l'attività neuronale della via M, correlando i dati con i diversi sottotipi di dislessia. Il campione finale che è stato esaminato è costituito da 19 soggetti dislessici e 27 normolettori con una età media rispettivamente di 126.8 mesi e 126.74 mesi. Tutti i bambini presentavano una intelligenza nella media. Il gruppo dei bambini dislessici è stato ulteriormente suddiviso in due sottogruppi: 8 dislessici fonologici e 11 dislessici non fonologici. Dal confronto dei valori dei parametri di sensibilità ottenuti mediante le due perimetrie è emersa una differenza statisticamente significativa a carico della via M nel gruppo dei bambini dislessici rispetto al gruppo dei bambini normolettori. Non vi sarebbe invece evidenza di un interessamento della via parvocellulare. Inoltre la caduta nella via transiente sarebbe in gran parte a carico dei bambini con dislessia fonologica in quanto questi ultimi presentano una sensibilità statisticamente differente rispetto ai bambini normolettori. Tale differenza non è emersa dal confronto dei bambini con dislessia non fonologica e bambini normolettori.

## APPLICAZIONI DI MATERIALI A MEMORIA DI FORMA PER ORTESI IN NEURORIABILITAZIONE

**DR.SSA ANNA CARLA TURCONI**

e-mail: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

La ricerca prosegue la linea del progetto dello scorso anno, per la progettazione, la sperimentazione e l'uso di ortesi progettate e costruite con materiali a memoria di forma.

L'utilizzo di materiali innovativi a memoria di forma di varia natura è una prospettiva estremamente interessante di innovazione applicativa perché va a soddisfare – ad esempio - una sentita esigenza di dinamicità delle ortesi per il piede; infatti la pseudoelasticità e/o il recupero di forma di questi nuovi materiali consentirebbe di restituire capacità di controllo in fase di oscillazione, associata a reale funzionale facilitazione della progressione e propulsione in fase di appoggio. Altrettanto e forse ancor più rilevante è la necessità di ortesi innovative per difetti di funzione attiva della mano: in questo caso ci si trova di fronte ad ortesi che hanno caratteristiche di assoluta staticità strutturale e quindi sono poco efficaci anche per mantenere la mobilità passiva di un sistema multisegmentario ad elasticità variabile qual è la mano.

Durante l'anno 2005 lo studio è proseguito secondo due direzioni:

- completamento del reclutamento della casistica
- completamento della progettazione dei due prototipi per arto inferiore e superiore

In fase di valutazione clinica preliminare, benché lo studio prevedesse il reclutamento di 20 pazienti, sono stati ritenuti idonei alla sperimentazione 16 pazienti: 8 adulti e 8 bambini con disabilità elettive a carico dell'arto superiore o dell'arto (o arti) inferiori e difficoltà nel cammino (pazienti emiplegici).

Sono stati evidenziati i risultati relativi alle valutazioni clinico-funzionali relativi all'intera popolazione studiata. Le valutazioni funzionali sono state eseguite utilizzando delle ortesi tradizionali in attività della vita quotidiana che implicano l'utilizzo degli arti inferiori o delle mani (cammino, alimentazione, presa); le scale utilizzate per le valutazioni funzionali e di autonomia sono diversificate a seconda della fascia d'età dei pazienti.

Per i pazienti in fascia d'età evolutiva con disabilità elettive all'arto inferiore tali valutazioni sono: esame articolare e test lunghezza muscolare flessione dorsale del piede e gastrocnemio, Scala di Ashworth plantiflessori T/T, WeeFim, GMFM cammino.

Per quanto riguarda le valutazioni mirate all'arto superiore, esse comprendono: Ashworth polso e dita, es. articolare polso e dita, Scala Jebsen-Taylor, funzione protettiva della cute ed entità del dolore.

Per i pazienti in fascia d'età adulta, le valutazioni mirate all'arto inferiore sono: esame articolare e test lunghezza muscolare flessione dorsale del piede e gastrocnemio, Scala di Ashworth flessori e adduttori anca, flessoestensori ginocchio, plantiflessori T/T, Motricity Index, test funzionale del cammino.

Le valutazioni mirate all'arto superiore, sempre per la stessa tipologia di pazienti, sono: esame articolare gomito-polso e lunghezza muscolare dita, esame muscolare gomito-polso, funzione protettiva della cute ed entità del dolore, scala di Ashworth gomito-avambraccio-polso-dita.

Durante l'anno 2005 i lavori di progettazione di ortesi innovative sono state effettuate contemporaneamente su due linee:

- Ortesi tibio-tarsica con materiali a memoria di forma
- Ortesi attiva per la mano con attuatori a memoria di forma

Per quanto riguarda l'ortesi per il piede, è stato effettuato uno studio dettagliato della meccanica del piede umano durante il cammino di soggetti sani al fine di individuare quei parametri da correggere in pazienti con piede flaccido. Dati di gait analysis su una coorte di bambini sani sono stati utilizzati per definire più rigorosamente la condizione di normalità a cui far riferimento nel progetto. Contemporaneamente allo studio della biomeccanica del piede umano abbiamo progettato un dispositivo da utilizzare in un'ortesi attiva AFO (ankle foot orthosis) impiegante fili a memoria di forma (SMA). Questo dispositivo

consiste in una cartuccia contenente un sistema di minipulegge, disposte in due file parallele, sulle quali viene avvolto il filo SMA. L'attuazione di questo filo consente di produrre lavoro meccanico e quindi può essere utilizzato per dorsiflettere il piede in pazienti con piede flaccido. Per quanto riguarda l'ortesi per la mano, è stato realizzato il primo prototipo con tecniche di prototipazione rapida in materiale poliammidico ed attuato con molle NiTiCu10; esso è in grado di promuovere l'estensione completa del dito indice della mano ed il ritorno a completa flessione. La progettazione di tale prototipo è basata su di un accurato studio biomeccanico (cinematica e dinamica articolare e caratterizzazione viscoelastica dell'articolazione metacarpo-falangea) e tecnologico (scelta della lega, trattamento termico, modellazione matematica della trasformazione di fase e trasferimento di potenza).

La fase di progettazione dei prototipi si è rivelata molto complessa e indagiosa dovendosi mettere a punto delle ortesi assolutamente innovative.

Questa fase che peraltro si è svolta contemporaneamente alla fase clinica di valutazione dei pazienti, ha richiesto molto tempo e ha assorbito l'intero spazio temporale dell'anno 2005.

Gli aggiustamenti dei prototipi sono stati molteplici per motivi sia tecnici, sia biomeccanici sia di adattamento alle caratteristiche cliniche dei pazienti. Rimane ancora da effettuare il training e l'adattamento specifico direttamente sui pazienti. La ricerca pertanto dovrà necessariamente proseguire nel prossimo anno per la fase conclusiva che prevede la sperimentazione clinica dell'efficacia delle ortesi innovative e la valutazione funzionale e strumentale dei risultati.

## VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI FUNZIONALI INDOTTE NELL'AMBITO DEL PROCESSO RIABILITATIVO

**DR. ANDREA MARTINUZZI**

e-mail: ANDREA.MARTINUZZI@CN.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Conegliano

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: plasticità corticale e recupero funzionale nell'afasia. Studio con misure di potenziali evocati cognitivi degli effetti della riabilitazione – (Resp. Dr. Andrea Martinuzzi)

Il lavoro di ricerca è completo nelle basi teoriche e nello sviluppo di procedure atte alla misurazione tramite EEG delle modifiche corticali a seguito di riabilitazione in pazienti che hanno subito ictus e affetti da afasia non fluente. Sono stati raccolti dati su 3 soggetti, rispetto al minimo di 10 previsti. I motivi di tale ristrettezza nel numero di soggetti riguarda non solo i criteri di inclusione, ma anche le complicazioni che normalmente questa tipologia di pazienti ha dal punto di vista motorio, cognitivo e propriamente afasico. Le elaborazioni statistiche su 3 soggetti non permettono di concludere niente di significativo: il gruppo di ricerca proseguirà, anche a ricerca corrente formalmente conclusa, in quanto l'investimento di conoscenze, strumenti e procedure definite attualmente è minimo. Si attende pertanto di completare il numero minimo di soggetti.

Sottoprogetto n. 2: pattern di attivazione cerebrale alla Risonanza Magnetica Funzionale (fRMN) in pazienti affetti da distrofia muscolare: possibile ruolo della distrofina cerebrale nei processi cognitivi (Resp. Dr.ssa Alessandra Bardoni e Dr.ssa Maria Grazia D'Angelo)

Come dimostrato da diversi lavori riportati in letteratura, circa il 30% dei bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne presentano, oltre al severo e progressivo deficit muscolare, anche un modesto ritardo cognitivo. L'assenza di di-

strofina alla base dell'instabilità della membrana muscolare, potrebbe avere un ruolo anche nello sviluppo del sistema nervoso centrale (come ipotizzato da diversi studi sulle isoforme cerebrali della distrofina Dp71 – Dp140).

Molti studi, condotti anche presso il nostro Istituto, hanno evidenziato una correlazione tra il ritardo mentale e le delezioni distali nel gene della distrofina. Il deficit cognitivo coinvolge prevalentemente l'area linguistica ed implica dei disturbi di apprendimento del bambino, coinvolgenti la sfera della lettura.

Più recentemente, sono stati eseguiti studi di imaging funzionale per valutare l'eventualità della presenza di un'alterazione metabolica in aree cerebrali specifiche. Lee e Coll (2002) hanno dimostrato un ipometabolismo del glucosio nel giro temporale mediale, nell'uncus e nel cervelletto (aree in cui l'espressione di distrofina è elevata) in un gruppo di bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne con funzioni cognitive borderline.

La fMRI è una recente metodica di neuroimaging che permette di visualizzare e localizzare le aree di attivazione cerebrale in seguito ad appropriati compiti (task) ed è per questo motivo uno degli strumenti privilegiati nello studio *in vivo* dell'organizzazione cerebrale.

In realtà essa non misura direttamente l'attivazione cerebrale ma, grazie all'effetto BOLD, è in grado di identificare le variazioni di segnale legate alle modificazioni del flusso ematico cerebrale che l'attivazione neuronale determina.

Proprio a partire dalle conoscenze neuropatologiche (alcune aree cerebrali risultano più ricche in distrofina di altre) e di metabolismo funzionale già dimostrate in soggetti affetti da distrofia muscolare, ci proponiamo di identificare le aree di attivazione cerebrale alla RMN funzionale durante l'esecuzione di compiti cognitivi specifici e di chiarire pertanto il reale ruolo della distrofina cerebrale nei processi cognitivi.

**Sottoprogetto n. 3: plasticità neuronale nei soggetti con cerebrolesioni acquisite: pattern di attivazione cerebrale alla Risonanza Magnetica Funzionale in pazienti con differente outcome cognitivo dopo trauma cranico (Resp. Dr.ssa Alessandra Bardoni)**

Scopo di questo studio è identificare, utilizzando la Risonanza Magnetica Funzionale (fMRI), le aree cerebrali attivate durante un compito di attenzione sostenuta in un gruppo di soggetti affetti da trauma cranico grave con quadro di

danno assonale diffuso in fase acuta, che abbiano recuperato i deficit cognitivi conseguenti al trauma stesso, e in un gruppo di volontari sani comparabili per età e scolarità.

L'attenzione sostenuta, intesa come la capacità di mantenere un livello elevato di vigilanza per un periodo prolungato, è una funzione cognitiva di base dalla quale dipendono molte altre abilità del soggetto (apprendimento, memoria...), e che frequentemente viene compromessa in seguito ad un trauma cranico.

Il trauma cranico, infatti, spesso determina un quadro di danno assonale diffuso che interessa le aree cerebrali deputate al controllo delle funzioni cognitive superiori come la memoria, l'apprendimento e appunto l'attenzione.

La fMRI costituisce un nuovo strumento di indagine non invasivo che permette di valutare, direttamente in vivo, quali siano le aree cerebrali che si attivano durante uno specifico compito che il soggetto esegue.

Mediante questa metodica è stato possibile valutare come si sia riorganizzata la rete neuronale che presiede ai processi attentivi nei soggetti con tc che abbiano recuperato i propri deficit grazie a meccanismi di plasticità neuronale.

Da un gruppo di 150 pazienti afferiti all'unità di Neuroriabilitazione delle Cerebrolesioni Acquisite dell'Istituto IRCCS Eugenio Medea, sono stati selezionati 6 pazienti con esiti di trauma cranico grave, danno assonale diffuso e deficit cognitivi e attentivi in fase acuta, successivamente recuperati grazie a trattamenti riabilitativi o in maniera autonoma.

Sono stati sottoposti ad indagine fMRI presso l'unità operativa di Neuroradiologia diagnostica e interventistica dell'Ospedale Maggiore di Milano mentre eseguivano uno specifico test neuropsicologico per la valutazione dell'attenzione sostenuta (CPT - Conners' Continuous Performance Test). Sono state così ottenute immagini RM che mostrano le aree cerebrali attivate durante il test. Tali immagini sono state confrontate con un gruppo di 8 volontari sani, sottoposti alla medesima indagine.

Da tale confronto è stato possibile identificare come, grazie a meccanismi di plasticità neuronale, si modifichi il pattern ed il profilo temporale delle attivazioni nei soggetti con trauma cranico, rispetto ai soggetti sani.

**Sottoprogetto n. 4: valutazione e riabilitazione delle funzioni esecutive in giovani adulti con trauma cranico. Studio sulla generalizzazione**

di un training cognitivo specifico (Resp. Dr. Alec Vestri)

Al momento sono stati ottenuti i dati raccolti su 60 soggetti per la parte di ricerca mirata all'adattamento italiano della versione della NIAF-R. Tale studio è finalizzato anche allo studio di validità dello strumento attualmente in uso presso il settore di terapia occupazionale dell'Unità di Riabilitazione per le Turbe Neuropsicologiche Acquisite. Il grado di correlazione globale tra FIM e NIAF-R allo stato attuale dei dati è da considerarsi moderato: sono in atto le ulteriori statistiche con campioni uniformi per patologia e distanza dalla lesione. È stato somministrato anche lo strumento di terapia occupazionale a tutti i 60 soggetti. Si attendono le analisi. Per quanto riguarda la parte di studio sul training delle funzioni esecutive e le valutazioni sulla generalizzazione, sono stati completati i percorsi di soli 3 soggetti. I criteri di inclusione ai trial sperimentali sono particolarmente selettivi. Tuttavia le indicazioni per ora sono buone per la parte strettamente cognitiva (buon miglioramento nello shifting dell'attenzione con diminuzione discreta degli errori fino al 30% in un caso). Mancano ancora soggetti per poter affermare qualcosa circa la generalizzazione in compiti di tipo occupazionale e nella qualità di vita.

## DISFAGIA E PROBLEMI CORRELATI IN BAMBINI CON PATOLOGIA NEUROLOGICA: DELINEAZIONE DI PROTOCOLLI DI VALUTAZIONE E TRATTAMENTO

**DR. ANDREA MARTINUZZI**

e-mail: ANDREA.MARTINUZZI@CN.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Conegliano

### RIASSUNTO

Nel corso del 2005 è stata elaborata una scheda per lo studio della disfagia per l'età evolutiva dopo una attenta valutazione dei protocolli già esistenti presso i Centri de La Nostra Famiglia.

Questa scheda ha lo scopo di essere uno strumento facile da utilizzare ed in grado di registrare dati che pur provenendo da professionalità diverse consentono di delineare un profilo comune sul grado di gravità e di compromissione causato dalla disfagia.

Vengono valutati: l'evoluzione alimentare del bambino; le caratteristiche della deglutizione durante il pasto (postura, ausili, tipologia di cibo, tempo e sintomatologia); la morfologia e la funzione del distretto orofaringeo; le valutazioni strumentali effettuate e la terapia medica, chirurgica, dietetica e riabilitativa in atto.

Il protocollo è suddiviso in 3 schede (T0 – T6 – T12) corrispondenti a tempi diversi di rilevazione (ogni 6 mesi) al fine di consentire controlli longitudinali dei dati.

La scala di riferimento per l'inquadramento diagnostico è la LOGEMANN.

Il reclutamento dei casi da osservare è avvenuto presso i Centri della Nostra Famiglia del Veneto e per i casi al di fuori del nostro circuito dall'U.O. di Chirurgia Pediatrica dell'ospedale di Treviso coordinato dal dr. M. Marzaro ([www.ulss.tv.it/chirurgiapediatrica](http://www.ulss.tv.it/chirurgiapediatrica)).

Nel corso del 2006 l'intento è stato quello di giungere alla completamento della raccolta delle tre schede ai tempi T0 – T6 -T12 e all'analisi dei dati raccolti.

## INTEGRAZIONE FUNZIONALE TRA L'ASSESSMENT NEUROPSICOLOGICO, LE MISURE DI UN SIMULATORE DI GUIDA E IL TEST DRIVE. STUDIO PER LA VALUTAZIONE DELLE CAPACITÀ DI GUIDA SU PERSONE CON CEREBROLESIONE ACQUISITA

**DR. ANDREA MARTINUZZI**

e-mail: ANDREA.MARTINUZZI@CN.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Conegliano

## RIASSUNTO

La ricerca condotta finora ha permesso di perfezionare il sistema di valutazione per l'idoneità alla guida: alcuni test neuropsicologici sono stati adattati allo stato attuale delle conoscenze in merito all'idoneità alla guida, le misure di tipo psicofisico effettuate con il simulatore sono state definite meglio con un protocollo standard valido in tutte le condizioni di menomazione, il protocollo di valutazione per test drive è stato costruito ex-novo sulla base degli scambi con i gruppi di studio europei. I dati raccolti finora sulla popolazione afferita al Centro di Mobilità di Pieve di Soligo (N=83) permettono di indicare nel test drive la fonte di maggiore sicurezza sia da parte del Centro che da parte delle Commissioni Mediche Locali per le Patenti nel concedere la patente. Le persone intervistate (N=63) a distanza di tempo, riferiscono situazioni varie e interessanti circa la guida effettiva. La concessione della patente di guida da parte delle Commissioni non implica che le persone guidino né che si sentano sicure nella guida: solo il 51% guida con tranquillità. La ricerca ha permesso di entrare in contatto costante con i principali referenti italiani ed europei nel campo della valutazione di idoneità alla guida per le persone con disabilità. Gli sviluppi della ricerca avrebbero dovuto comportare la misura effettiva con 100 persone di gruppi clinici (traumi cranici e lesioni cerebrovascolari) e 100 soggetti di controllo. Attualmente sono stati raccolti i dati di 31 persone dei gruppi clinici e 20 del gruppo di controllo.

## INDUZIONE DELL'ATTIVITÀ OSTEOLASTICA IN VITRO ED IN VIVO DI SOGGETTI CON OSTEONEGENESI IMPERFETTA CON FRATTURE COMPLESSE O PSEUDOARTROSI MEDIANTE L'UTILIZZO DI MATRICI DI SUPPORTO A BASE DI PCL ED ACIDO HYALURONICO

**DR.SSA ANNA CARLA TURCONI**

e-mail: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

## RIASSUNTO

L'attività osteoblastica è riferita normale nell'osteogenesi imperfetta (O.I.) ma la matrice connettivale prodotta è quantitativamente o qualitativamente deficitaria. I tempi di consolidazione per fratture composte non appaiono diversi dalla norma nel bambino, ma frequentemente sono presenti consolidazioni viziose e rischio di fratture subentranti sullo stesso livello.

Allo stato attuale l'unica terapia che ha mostrato una relativa efficacia è quella con i bisfosfonati che migliorano la densità ossea.

Fratture ripetute nella stessa sede richiedono la correzione delle ossa lunghe con mezzi di sintesi metallici intramidollari che devono essere lasciati in sede e sostituiti con l'accrescimento.

Fratture ripetute nella stessa sede, riduzione del carico e deficit tissutali locali possono portare a consolidazioni viziose e a quadri di pseudoartrosi, ovvero alla formazione di tessuto fibroso anziché osseo sui monconi di frattura con conseguente instabilità funzionale, questo dato è particolarmente evidente dopo l'adolescenza mentre è di rara osservazione nel bambino più piccolo.

Il trattamento con difosfonati aumenta la coesione tra l'osso ed il mezzo di sintesi con maggiore difficoltà nella rimozione e sostituzione dei chiodi nei bambini operati, quando necessaria per accrescimento scheletrico; per altro tale maggiore

coesione può essere auspicabile per soggetti a fine crescita in cui, come nelle artroprotesi d'anca dell'adulto, il rischio maggiore è dato proprio dal riassorbimento osseo periprotetico.

Nell'ambito di tale patologia abbiamo ipotizzato le seguenti applicazioni dell'ingegneria tissutale:

- Uso di scaffold biodegradabili scheletrati e non scheletrati per supporto a cellule ossee in caso di situazioni di perdita significativa di tessuto osseo nel bambino e nell'adulto.

- Uso di biomateriali in calcio fosfonato che associno il rilascio di farmaci contro il riassorbimento osseo, quali i difosfonati, applicati sul mezzo di sintesi senza un trattamento generale con gli stessi farmaci che in corso di fratture complesse dell'adulto con O.I. tendono a rallentare i processi di riparazione ossea con rischio di pseudoartrosi.

Sono stati selezionati 4 pazienti con osteogenesi imperfetta con ricorrenza di frattura delle ossa lunghe degli arti inferiori di età compresa tra i 13 e i 25 anni, 2 con deficit qualitativo del collagene e 2 con deficit quantitativo con anamnesi di trattamento con difosfonati da almeno 36 mesi.

I pazienti 1 e 4 presentavano un deficit qualitativo del collagene di tipo I (tipo III), gli altri di tipo quantitativo severo (forma IV).

Nel primo paziente in rapporto allo sviluppo somatoscheletrico vi è stata una progressiva accentuazione della flessione dell'anca e del ginocchio con varizzazione femorale e fuoriuscita del chiodo telescopico.

Si è programmata una correzione chirurgica del varismo del collo femorale con posizionamento di fili metallici-K e sostituzione del chiodo che verrà rivestito con un composto a base di calcio fosfonato e neridronato.

Nella seconda paziente, con O.I. tipo I si è verificata una frattura nel tratto distale di una tibia, conseguentemente alla crescita ossea e all'incurvamento del tratto di osso non tutelato dall'infibulo. È stata effettuata sostituzione parziale dell'infibulo ma a distanza di 7 mesi dall'intervento la consolidazione ossea era inefficace. Si è pertanto programmata revisione parziale dei monconi di frattura con applicazione di sostituto osseo di banca su substrato di PLC.

La paziente 3 presenta una forma severa di O.I. tipo III ha presentato frattura femorale sinistra, le dimensioni del femore erano estremamente ridotte con impossibilità all'utilizzo di chiodi telescopici. In questo caso la consolidazione della frattura è stata buona ma vi è stata una parziale mobilizzazione del chiodo. In rapporto all'accre-

simento quasi completo si programma sostituzione del chiodo con un altro con rivestimento in fosfato di calcio e neridronato.

Nel paziente 4 si è verificata una frattura complessa del femore trattata chirurgicamente con chiodi elastici tipo Nancy nel 2002, a distanza di 3 anni persisteva incompleta consolidazione dei monconi di frattura, si è sospesa la somministrazione di difosfonati nel 2003, si è proceduto ad una revisione chirurgica dei monconi di frattura con cruentazione locale e applicazione locale di sostituto osseo di banca con supporto in PCL. A distanza di 3 mesi si osservava comparsa di significativo callo osseo e attualmente a distanza di 6 mesi dopo progressivo training riabilitativo il paziente ha ripreso la deambulazione autonoma per lunghi tratti con l'aiuto di canadesi.

I primi risultati appaiono incoraggianti: l'integrazione di tecniche chirurgiche, biomateriali, farmacologia mirata ed un attento programma riabilitativo possono portare ad un significativo incremento dell'autonomia nei pazienti affetti da osteogenesi imperfetta, modificando il trend delle autonomie motorie da noi studiate in questi anni su tale patologia.

## BASI GENETICHE DELL'AUTISMO

### DR. MASSIMO MOLteni

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

#### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo,  
del linguaggio e dell'apprendimento

#### Tipo di Ricerca

Corrente

#### Periodo di svolgimento

2005

#### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: analisi molecolare del gene SHANK3 in pazienti con sindrome neurogenetica da delezione cromosomica 22q13.3 (MIM 606232) e soggetti non deleti con fenotipo caratteristico (Resp. Dr.ssa Clara Bonaglia)

La sindrome da delezione 22q13 (MIM 606232) è caratterizzata da ipotonia neonatale, ritardo globale dello sviluppo, assenza o ritardo di linguaggio, ritardo mentale lieve, comportamenti di tipo autistico e lievi segni dismorfici. Questa malattia genetica rimane sotto-diagnosticata, per la difficoltà a rilevare la microdelezione della porzione terminale del cromosoma 22 con una analisi cromosomica di routine e di riconoscere le sue caratteristiche cliniche.

L'obiettivo di questo progetto è quello di approfondire i meccanismi molecolari che determinano la sindrome da delezione 22q13.3 mediante l'analisi citogenetica molecolare mediante FISH (ibridazione in situ fluorescente), Array-CGH (ibridazione genomica comparata mediante array) in soggetti con riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione 22q13 e fenotipo da sindrome 22q13, per permettere una migliore correlazione genotipo/fenotipo e definire gli elementi strutturali che determinano il verificarsi di tali riarrangiamenti. In questo anno di lavoro abbiamo caratterizzato mediante tecniche molecolari due casi non correlati con sindrome da delezione 22q13.3 associati ad una microdelezione eterozigote di 100Kb. I risultati ottenuti dimostrano che entrambi i casi con sindrome da delezione 22q13.3 mostrano un identico punto di rottura localizzato in una unità ripetuta di 15 paia di basi suggerendo l'esistenza di un breakpoint ricorrente nel gene SHANK3. (Bonaglia et al, 2005).

Sottoprogetto n. 2: basi genetiche dell'Autismo e

correlazione con la dimensione clinico-funzionale: approfondimento degli aspetti senso-motori e ampliamento della casistica (Resp. Dr.ssa Maria Nobile)

La presente relazione ministeriale descrive gli obiettivi raggiunti a circa 24 mesi dall'inizio della Ricerca Corrente 2004 "Basi genetiche dell'autismo e correlazione con la dimensione clinico-funzionale".

Sino ad oggi, sono state complessivamente contattate per la ricerca 140 famiglie di bambini ricoverati presso l'IRCCS "E. Medea" in tempo pieno o in day hospital. Tra di esse, 133 famiglie (95%) hanno deciso di prendere parte alla ricerca. La diagnosi più frequente tra i pazienti coinvolti nello studio è quella di Disturbo Autistico (86,5%), seguita dalla diagnosi di Disturbo Generalizzato dello Sviluppo Non Altrimenti Specificato (9,8%) e dalla diagnosi di Disturbo di Asperger (3,7%).

Come da protocollo, tutti i partecipanti sono stati sottoposti ad una valutazione psichiatrica, ad una valutazione cognitiva e, infine, ad una valutazione psicoeducativa. Vengono riportati i risultati delle analisi descrittive effettuate su queste prime valutazioni. Inoltre, grazie alla raccolta dell'albero genealogico familiare dei soggetti partecipanti allo studio, viene descritta la loro familiarità rispetto ad alcuni importanti disturbi.

Per quanto riguarda più specificamente l'indagine genetica, tutti i soggetti partecipanti -probandi e coppia genitoriale- sono stati sottoposti a prelievo ematico o di saliva: il campione è attualmente costituito da 101 triplette complete e da 32 triplette non complete. Tra i partecipanti, sono state individuate 6 famiglie con più di un soggetto affetto (MULTIPLEX); in due casi, i soggetti affetti sono gemelli. Le indagini genetiche verranno svolte nel corso del prossimo anno.

Nel corso dell'ultimo anno, inoltre, 13 pazienti sono stati coinvolti in una valutazione standardizzata della stabilità posturale e del cammino ('gait analysis') attraverso una valutazione cinetica e cinematica con sistema ELITE a 8 telecamere ad infrarossi a due piattaforme di forza modello Kistler. Al fine di analizzare il pattern locomotorio dei soggetti, sono state valutate alcune classi di parametri (temporali, di distanza, di velocità e parametri cinematici relativi alle articolazioni degli arti inferiori) ed è stato utilizzato un indice sintetico in grado di riassumere le informazioni relative a tutti i parametri sopra indicati. Lo studio della significatività statistica, condotto applicando test parametrici e non parametrici, viene dettagliatamente descritto nella relazione.

## DISTURBI NEUROPSICOLOGICI COMPLESSI: CORRELATI NEUROFISIOLOGICI E GENETICI

### DR. MASSIMO MOLTENI

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

#### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo,  
del linguaggio e dell'apprendimento

#### Tipo di Ricerca

Corrente

#### Periodo di svolgimento

2005

#### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: l'attenzione selettiva visiva e uditiva nella dislessia evolutiva: uno studio neurofisiologico (Resp. Dr. Massimo Molteni e Dr. Andrea Facoetti)

La dislessia evolutiva (DE) è definita come disturbo specifico della lettura in bambini con quoziente intellettivo nella norma, adeguate opportunità educative o scolastiche e assenza di deficit sensoriali (American Psychiatric Association, 1994). Il normale sviluppo della lettura viene spiegato mediante il modello a due vie (Coltheart e coll., 1993). Sulla base di questo modello cognitivo, è possibile distinguere i soggetti con dislessia evolutiva (DE) di tipo di fonologico (i.e. difetto della via sub-lessicale, evidenziata da una specifica difficoltà nella lettura di nonparole) e di tipo superficiale (i.e. difetto della via lessicale, evidenziata da una specifica difficoltà nella lettura di parole conosciute) (e.g. Coltheart e coll., 1993).

I modelli cognitivi evidenziano la natura puramente fonologica di tale via (i.e. corrispondenza grafema-fonema, memoria fonologica e metafonologia), mentre viene trascurata la natura visuo-percettiva della via sub-lessicale. L'efficienza dei processi fonologici è infatti subordinata alla veloce "segregazione grafemica" (SG) della stringa di lettere che compone la nonparola o la parola nuova da leggere.

Sembrerebbe che il processo di assemblaggio fonologico proprio della via sub-lessicale implichi un efficiente ancoraggio dell'attenzione visiva spaziale (e.g., Brannan & Williams, 1987; Facoetti e coll., 2001, 2005a; Hari & Renvall, 2001), oltre ad abilità fonologiche specifiche (e.g., Goswami, 2000; Snowling, 2000; Ramus,

2003). In letteratura non ci sono tuttavia evidenze definitive che chiariscano il legame causale tra la competenza fonologica e l'apprendimento della lettura (per una rassegna si veda Castles & Coltheart, 2004). I dati finora raccolti mostrano come i bambini con DE abbiano un deficit di selezione spaziale sia visivo (orientamento attenzionale visuo-spaziale) che uditivo (orientamento attenzionale uditivo-spaziale), supportando l'idea che un'ampia varietà di sintomi della dislessia potrebbe essere ricondotta a un deficit della selezione multi-modale dell'informazione (Facoetti e coll. 2003; 2005). Il nostro studio si propone di indagare direttamente la relazione tra la cattura automatica dell'attenzione visiva e uditiva e la funzionalità della via sub-lessicale (i.e., lettura di nonparole). Secondo la nostra ipotesi un deficit della selezione multi-modale (i.e., uditiva e visiva) dell'informazione (i.e., attenzione spaziale automatica) in cattivi lettori di nonparole (i.e., DE fonologici) fornisce una più chiara spiegazione rispetto all'idea di un difetto di elaborazione basato su un canale o solo visivo o solo uditivo. Considerando che il primo processo della via sub-lessicale è la segregazione grafemica, risulta chiaro che l'assemblaggio fonologico implica precise e rapide abilità di orientamento e focalizzazione dell'attenzione visiva spaziale e non solo appropriate abilità puramente fonologiche. Si può ipotizzare quindi che in soggetti con DE fonologica vi possa essere uno specifico rallentamento dell'attenzione spaziale visiva e uditiva. Nel presente studio è stato misurato il decorso temporale dell'attenzione spaziale automatica uditiva (Esperimento 1) e visiva (Esperimento 2) in 15 dislessici fonologici, 6 non-fonologici e 27 soggetti normolettori, mediante la tipica procedura sperimentale dell'indizio spaziale, che implica uno spostamento dell'attenzione nelle diverse posizioni dello spazio, ma indipendente dal movimento oculare.

In accordo con l'ipotesi sperimentale, è emerso dai risultati che nei dislessici fonologici vi è un effetto dell'indizio spaziale a intervalli più lunghi rispetto ai brevi intervalli (i.e. rallentamento dell'attenzione spaziale automatica), contrariamente ai bambini normolettori e non-fonologici che hanno evidenziato l'orientamento dell'attenzione si evidenzierà a brevi intervalli indizio-bersaglio. Inoltre attraverso lo studio della regressione lineare, controllando l'età, il QI, le abilità fonologiche e spaziali dei bambini con DE, siamo riusciti a spiegare una quota significativa della varianza delle abilità di lettura di nonparole, partendo dalla pura abilità di

orientamento automatico dell'attenzione spaziale. Questi risultati hanno permesso di confermare l'ipotesi secondo cui esiste uno stretto legame tra il funzionamento della via sub-lessicale (lettura di nonparole) e l'abilità di orientare efficacemente l'attenzione nello spazio (ancoraggio automatico a stimoli uditi e visivi). In conclusione, i nostri dati supportano l'ipotesi secondo la quale una compromissione dell'elaborazione percettiva nella dislessia potrebbe essere la conseguenza di una selezione spaziale multi-modale rallentata, suggerendo che un deficit di base nell'orientamento visivo e uditivo dell'attenzione possa spiegare un'ampia varietà dei disturbi mostrati dai bambini e dagli adulti dislessici fonologici.

Il passo successivo della nostra ricerca consisterà nella registrazione dei potenziali evocati (PE) da uno stimolo preceduto da un indizio valido o invalido (manipolazione attentiva) sia nella modalità visiva che in quella uditiva (componente multi-modale).

#### Sottoprogetto n. 2: correlati neurofisiologici nel disturbo specifico del linguaggio (Resp. Dr.ssa Maria Luisa Lorusso)

Secondo l'ipotesi di Tallal, le difficoltà di codifica del linguaggio parlato nei disturbi specifici del linguaggio (DSL) avrebbero origine da deficit nel processamento di transizioni rapide nell'input acustico; a conferma di tale ipotesi si osserva come in particolare i bambini con DSL incontrino maggiori difficoltà, rispetto ai controlli, nel discriminare stimoli acustici molto brevi (con una durata inferiore ai 50 ms.) o separati da intervalli particolarmente ridotti. Sulla base di tali osservazioni, Tallal e coll. hanno proposto una metodologia innovativa per il trattamento dei DSL, fondato proprio sulla modificazione delle componenti temporali dello stimolo acustico.

Negli ultimi anni, sono apparsi numerosi studi che utilizzano anche tecniche di tipo psicofisiologico per rilevare differenze nell'elaborazione centrale del segnale. In particolare, sono state osservate modificazioni nella latenza e nell'ampiezza di una specifica componente dei potenziali evocati (ERP), chiamata Mismatch Negativity (MMN).

Sulla base delle considerazioni precedenti, il presente studio che si propone di:

(a) verificare se un gruppo di bambini con DSL mostra una risposta di MMN alla comparsa di uno stimolo raro che si discosta dallo stimolo frequente per una parte dello spettro acustico di durata molto breve (50 ms.).

(b) verificare se e come cambi la componente MMN in seguito ad un training di discriminazione a analisi fonologica di stimoli verbali modificati con particolari algoritmi informatici

(c) Studiare le relazioni e correlazioni tra la MMN, le abilità linguistiche nelle diverse componenti e le prove comportamentali (psicofisiche e neuropsicologiche) per la valutazione del processamento uditivo.

#### Metodologia

**Soggetti:** Si prevede, entro la fine della ricerca, di testare 40 bambini di età compresa tra i 4 anni e 6 mesi ed i 7 anni, di cui 30 con diagnosi di DSL (criteri diagnostici ICD-10) e 10 con normale sviluppo del linguaggio.

**Test Psicofisiologici:** Misurazione della componente ERP "Mismatch Negativity".

Compito uditivo passivo, oddball paradigm (80% stimoli standard, 20% stimoli modificati). Uso di stimoli sintetizzati con un programma di elaborazione di stimoli verbali.

**Valutazione psicofisica/neuropsicologica:** È prevista per tutti i gruppi la somministrazione di test sperimentali di tipo psicofisico. Questi test permettono di verificare: a) in assoluto, la presenza di differenze lungo diversi stadi dell'elaborazione dell'informazione uditiva, tra bambini con e senza DSL; b) l'effetto del training fonologico con rallentamento dell'eloquio in bambini con DSL in diverse misure psicofisiche che rappresentano diverse componenti dell'elaborazione uditiva.

**Trattamento:** Verranno confrontati i risultati di 3 gruppi di trattamento. Ogni gruppo sarà formato da 10 bambini con diagnosi di DSL. I bambini nei diversi gruppi verranno sottoposti a trattamenti intensivi (5-6 trattamenti settimanali della durata di 45 minuti, per un totale di 48 sedute), con

- 1) training fonologico computerizzato con rallentamento dell'eloquio;
- 2) training fonologico computerizzato senza rallentamento dell'eloquio;
- 3) trattamento logopedico tradizionale.

Prima dell'inizio e subito dopo la fine del trattamento, i bambini dei tre gruppi vengono sottoposti a valutazione delle competenze linguistiche e alla batteria di valutazione sperimentale. I risultati dei tre gruppi verranno confrontati con un gruppo di controllo formato da bambini con DSL in attesa di trattamento, per isolare negli effetti ottenuti quelli conseguenti al trattamento da quelli dovuti a fattori aspecifici (maturazione, ecc.). I dati raccolti al pre-test con i tre gruppi di bambini con DSL verranno poi confrontati con un gruppo di

bambini, di pari numerosità e caratteristiche, con un normale sviluppo del linguaggio.

### Obiettivi conseguiti

Nel corso di questo primo anno di lavoro, sono stati raggiunti i seguenti obiettivi:

a) Definizione dei protocolli di valutazione linguistica; b) Definizione del protocollo di valutazione neurofisiologica; c) Messa a punto delle prove sperimentali comportamentali; d) Definizione dei tre programmi di trattamento; e) Raccolta dei primi dati pre- e post-trattamento.

*Descrizione del campione raccolto entro dicembre 2005, in base all'assegnazione al gruppo di trattamento:*

Fonologico rallentato: 7 soggetti (6m e 1f); età media 5,39, QI medio 95,29;

Fonologico non rallentato: 4 soggetti (3m e 1f); età media 5,33, QI medio 106,75;

Trattamento tradizionale: 6 soggetti (5m e 1f); età media 5,86, QI medio 99,00;

Nessun trattamento: 6 soggetti (4m e 2f); età media 6,14, QI medio 99,67;

Controlli: 4 soggetti (2m e 2f); età media 6,48, QI medio 102,37.

### Discussione e conclusioni

La definizione di tutti i protocolli di valutazione (linguistica, neurofisiologica, neuropsicologica e psicofisica) è stato un primo obiettivo fondamentale raggiunto in questo primo anno di lavoro. In particolare per quanto riguarda le prove psicofisiche e neuropsicologiche, è stato necessario un laborioso intervento di adattamento delle prove alle possibilità di comprensione ed esecuzione di bambini in età prescolare. È stato inoltre necessario effettuare una serie di studi pilota per individuare le transizioni acustiche (e le coppie minime che ne esprimano le variazioni fonemiche) critiche per la lingua italiana.

Per quanto il numero di registrazioni elettrofisiologiche compiute non consenta ancora di effettuare confronti tra gruppi, in tutti i tracciati dei tracciati Grand Average (medi nei gruppi) si può rilevare una deflessione negativa intorno ai 200-250 ms dalla presentazione dello stimolo deviante, che corrisponde alla MMN. Ad un'ispezione visiva dei tracciati, si rileva che, nel gruppo che ha seguito il trattamento fonologico con rallentamento dell'eloquio, la MMN appare lievemente più marcata e caratterizzata da una latenza lievemente più grande al post-test rispetto al pre-test. Questa modificazione, che potrebbe riflettere un effetto del trattamento, è più evidente nelle zone

di registrazione temporali e parietali, mentre nelle altre zone si nota sì una deflessione, ma comune ad entrambi i tipi di stimoli, standard e deviante, e dunque con diverso significato neurofisiologico. Nel gruppo di bambini non trattati, invece, la MMN appare più evidente già al pre-test (probabilmente per variazioni casuali legate alla scarsa numerosità), ma anche in questi tracciati sembra evidenziarsi una tendenza a latenze più lunghe al post-test, ad indicare forse un processo legato alla maturazione del SNC (significative modificazioni negli ERP nel corso dell'infanzia, in particolare intorno ai 5-6 anni di età, sono descritte in letteratura). È inoltre possibile osservare, nei tracciati dei bambini trattati con training fonologico e rallentamento dell'eloquio, la comparsa (soprattutto nelle aree frontali) di componenti tardive (dopo gli 800 ms), di segno positivo, in risposta agli stimoli devianti, non evidenziabile al pre-test e nettamente meno marcata nei bambini non trattati. Questa componente potrebbe essere legata ad un'elaborazione di tipo maggiormente consapevole, della differenza rilevata tra gli stimoli (una competenza stimolata dal training).

Analizzando le differenze tra le prestazioni prima e dopo il trattamento nei diversi gruppi, è possibile osservare una lieve tendenza al miglioramento per tutti i soggetti in quasi tutte le prove, sia neuropsicologiche e psicofisiche che linguistiche. Nella prova di backward masking, si rileva un abbassamento generalizzato delle soglie, sia assolute che in condizioni di mascheramento.

In sintesi, le prove messe a punto hanno fornito risultati preliminari abbastanza conformi a quanto atteso in base alle ipotesi sperimentali, pur con differenze tra i gruppi poco accentuate. Per poter avere una miglior descrizione delle caratteristiche della popolazione con DSL e dei miglioramenti prodotti con trattamenti diversi nelle competenze linguistiche, nelle funzioni neuropsicologiche e nelle risposte neurofisiologiche, sarà necessario attendere i dati raccolti su un campione più numeroso.

**Sottoprogetto n. 3: disturbo dell'attenzione spaziale nella dislessia evolutiva: un'ipotesi colinergica (Resp. Dr.ssa Cecilia Marino)**

La Dislessia Evolutiva (DE) è definita come disturbo specifico della lettura in bambini con quoziente intellettuale nella norma, adeguate opportunità educative o scolastiche e assenza di deficit sensoriali (American Psychiatric Association, 1994).

La DE è ereditabile ed i meccanismi di trasmissione sono di tipo complesso, verosimilmente si tratta di un disturbo multifattoriale poligenico. Attualmente sono state identificate delle aree su diversi cromosomi (i.e 1, 2p, 3p, 3q, 6p, 6q, 15q, e 18p) dove verosimilmente sono presenti geni che conferiscono ciascuno un piccolo rischio additivo per lo sviluppo della DE.

Sebbene molti studi abbiano fornito prove a favore di un deficit fonologico alla base della dislessia (Bradley e Bryant, 1983) la maggior parte di bambini con DE mostra anche alterazioni visive, deficit nell'elaborazione di stimoli tattili, difficoltà nel mantenere l'equilibrio e nel controllo dei movimenti (Stein e Walsh, 1997), disturbi difficilmente spiegabili da un'ipotesi puramente fonologica, mentre potrebbero essere riconducibili ad un deficit nella selezione percettiva multi-modale dovuto ad una rallentata cattura automatica dell'attenzione (Hari e Renvall, 2001).

Alla difficoltà di lettura, tipica della dislessia evolutiva, è comunemente associato un disturbo del calcolo. Il calcolo costituisce una funzione cognitiva complessa dove diverse funzioni primarie possono essere implicate: la percezione, la memoria, il linguaggio, così come le funzioni esecutive ed il ragionamento. L'abilità di calcolo, nelle sue componenti elementari, dovrebbe anche comprendere la stima numerica, l'"immediatizzazione" (subitizing: l'enumerazione immediata da 1 a 4 elementi) e il conteggio (l'enumerazione di 4-5 o più elementi). Queste abilità "elementari" del calcolo potrebbero essere in relazione con l'orientamento dell'attenzione visiva spaziale. Infatti, alcune ricerche hanno dimostrato che il subitizing avviene in condizioni di attenzione diffusa, mentre il conteggio richiede l'intervento dell'attenzione focale (e.g., Sathian et al., 1999).

### Ipotesi e obiettivi dello studio

Lo scopo delle nostre ricerche è quello di testare l'ipotesi secondo cui un disturbo dell'attenzione spaziale focalizzata possa alterare l'elaborazione del segnale percettivo, sia nella modalità visiva che in quella *uditiva*, causando le tipiche difficoltà di lettura che caratterizzano la DE. Tale ipotesi viene testata misurando l'attenzione spaziale sia uditiva che visiva in bambini con DE e in bambini con normali abilità di lettura e confrontandone il preciso decorso temporale.

Un altro scopo della ricerca è quello di indagare la relazione tra alcuni processi aritmetici fondamentali e l'attenzione visiva spaziale in bambini con DE, con e senza difficoltà di calcolo. Si ipo-

tizza che non vi siano differenze tra i due gruppi di dislessici nelle prove di subitizing, mentre dovrebbe essere presente un selettivo deficit nelle capacità di conteggio nel gruppo con difficoltà di calcolo. Si suppone che alla base delle difficoltà nel conteggio vi sia un deficit nel meccanismo di focalizzazione dell'attenzione visiva. Il disturbo della focalizzazione dell'attenzione spiegherebbe anche una ricerca visiva seriale deficitaria (e.g., Iles et al., 2000).

Per quanto concerne gli aspetti genetici, la ricerca si propone di ridurre l'area di linkage disequilibrium (l.d.) sul cromosoma 15 per la dislessia e i fenotipi fonologici correlati; di verificare se il segnale di l.d. è associato alla funzione di attenzione selettiva spaziale, specificamente alterata nei dislessici; di identificare geni candidati nelle aree di l.d. che possano essere di interesse in relazione alla teoria eziologica attentiva per la DE; di verificare l'associazione genetica tra geni candidati del sistema colinergico e la DE, utilizzando i classici fenotipi fonologici, quelli neuropsicologici ed i fenotipi attentivi correlati alla DE.

### Materiali e metodi

#### *Reclutamento del campione*

Allo studio hanno preso parte bambini di età compresa tra gli 8 e i 16 anni, affetti presso l'Istituto Scientifico "E. Medea" per difficoltà di apprendimento ed i loro fratelli. I bambini sono stati diagnosticati come dislessici sulla base di criteri di esclusione del DSM-IV (American Psychiatric Association, 1994).

Sono stati somministrati test neuropsicologici di lettura, memoria e calcolo ed una batteria sperimentale, al fine di studiare le capacità di orientamento attenzionale nelle due modalità visiva e uditiva.

### Analisi

#### *Caratteristiche del Campione*

Il campione include probandi affetti, non affetti, e probandi cattivi lettori (che cioè soddisfano un criterio meno restrittivo di dislessia) e la stessa suddivisione è stata fatta per i fratelli.

#### *Batteria neuropsicologica*

Sono state condotte le analisi descrittive (medie e deviazioni standard) del campione per tutte le variabili neuropsicologiche disponibili.

#### *Analisi genetiche*

Verrà condotto uno studio familiare in cui verrà esplorata la possibilità di un'associazione genetica (e quindi della trasmissione allelica all'interno

di famiglie nucleari) attraverso l'analisi TDT (Transmission Disequilibrium Test) per fattori quali presenza/assenza di malattia; attraverso l'analisi del QTDT (Quantitative Transmission Disequilibrium Test) per le variabili neuropsicologiche continue.

### Risultati preliminari

Sono state condotte le analisi per singolo marker fra gli SNPs del gene DYX1C1 – 3 G/A, 1249 G>T, 1259C>G, sia per la categoria diagnostica (presenza/assenza di dislessia) che per i fenotipi (le variabili neuropsicologiche) con il software FBAT. L'analisi preliminare dei dati evidenzia un'assenza di associazione dei marcatori con la categoria diagnostica dislessia. È invece riscontrabile, nel nostro campione di dislessici, un'associazione fra due variabili neuropsicologiche (velocità nella lettura di un brano e span di lettere in avanti) e i due SNPs – 3 G/A, 1249 G>T.

È stato costruito un database di dati genetici, clinici e neuropsicologici. La struttura del database è identica a quella di un database già esistente di famiglie di dislessici (rc2001). I casi dei due database verranno accorpati; le variabili dei due campioni sono per circa l'80% sovrapponibili; questo permetterà di attuare un set di analisi su un campione congiunto (rc2001+rc2004-5), in particolare questo sarà possibile per il fenotipo dislessico e per i tratti fonologici correlati al processo di lettura. Le analisi di l.d. che contempleranno i fenotipi attentivi correlati alla lettura invece potranno essere effettuati solo sul campione rc2004-rc2005.

## REATTIVITÀ ADRENOCORTICALE E VULNERABILITÀ GENETICA IN FUNZIONE DELLA RELAZIONE DI ATTACCAMENTO MADRE-BAMBINO IN UN CAMPIONE AD ALTO RISCHIO

**DR. MASSIMO MOLteni**

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

La presente relazione descrive i risultati ottenuti quest'anno in merito al progetto di ricerca centrato sui fattori genetici e i correlati psicofisiologici dei patterns di attaccamento in campioni ad alto rischio psicosociale. La ricerca, iniziata lo scorso anno, ha previsto il reclutamento e l'assessment di un campione di bambini maltrattati (N = 10) e di un gruppo di bambini di controllo (N = 45) di età compresa tra i 12 e i 18 mesi. Tutti i bambini hanno effettuato, insieme alle loro madri, la Strange Situation (SS) per definire il pattern di attaccamento, la quasi totalità di loro ha fornito un campione di saliva subito prima, 20 minuti e 40 minuti dopo la SS ed ha effettuato, alla fine della sessione di valutazione, un prelievo di cellule della mucosa orale per l'estrazione del DNA; tutte le madri dei due gruppi hanno compilato due questionari per la valutazione del temperamento (Toddler Temperament Scale) e dei problemi emotivo-comportamentali (Infant Toddler Social and Emotional Assessment) dei bambini.

I dati raccolti finora consentono – considerata la bassa numerosità campionaria (soprattutto del campione di bambini abusati) – riflessioni solo parziali; di seguito, si riassumono quelle più interessanti: 1) come atteso una percentuale piuttosto elevata (oltre il 70%) di bambini abusati presenta un pattern di attaccamento insicuro (A – C – D – U); tra questi il 50% ha un attaccamento disorganizzato o non classificabile (D – U); 2) i bambini con un attaccamento ansioso-resistente hanno maggiori difficoltà nella regolazione di

alcune funzioni biologiche (sonno e alimentazione) e nella gestione degli stati emotivi negativi mentre non sono emerse associazioni statisticamente significative tra gli stili di attaccamento e i tratti temperamentali, a conferma di quanto riportato in letteratura; 3) non è emersa nessuna associazione statisticamente significativa tra la presenza del genotipo a rischio e l'attaccamento insicuro per nessuno dei due polimorfismi indagati (DRD4 e 5HTTL-PR); 4) non è emerso un alterato funzionamento del sistema ipotalamo-ipofisi-surrene (aumento dei livelli di cortisolo post SS) nei bambini con un attaccamento insicuro. I dati relativi all'attivazione del sistema simpato-adrenomidollare risultano invece maggiormente significativi a questo proposito: oltre l'80 per cento dei bambini con un attaccamento insicuro mostra un incremento nei livelli di alpha amylase salivare post Strange Situation superiore a quelli riscontrati prima della procedura (utilizzando un incremento superiore al 10% dei valori ottenuti nella misurazione pre SS come criterio di cambiamento tra prima-dopo). Occorre tuttavia sottolineare come una buona percentuale di bambini con un attaccamento sicuro (sebbene inferiore ai bambini con un attaccamento insicuro) mostra una risposta simile.

Il reclutamento, nel corso del prossimo anno, di un maggior numero di casi nei due gruppi consentirà di comprendere meglio il ruolo giocato dallo stile di attaccamento nella risposta dell'organismo allo stress e quello dei fattori genetici implicati nella formazione del legame di attaccamento disorganizzato.

## **DISTURBI DEL DISCORSO E DELLA PRAGMATICA NEI BAMBINI. STRUMENTI PER LA VALUTAZIONE E LA RIABILITAZIONE**

**PROF. FRANCO FABBRO**

e-mail: [FABBRO@SV.LNF.IT](mailto:FABBRO@SV.LNF.IT)

### **Linea di Ricerca n. 3**

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### **Tipo di Ricerca**

Corrente

### **Periodo di svolgimento**

2005

### **Polo Scientifico**

San Vito al Tagliamento

## **RIASSUNTO**

**Sottoprogetto n. 1: l'analisi del discorso nei bambini con disturbi del linguaggio (Resp. Prof. Franco Fabbro)**

Nella fase iniziale del progetto, l'attenzione è stata rivolta principalmente a due popolazioni di pazienti in età evolutiva: pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD) e pazienti diagnosticati con Disturbo Specifico del Linguaggio (DSL).

Nello studio "Valutazione delle competenze narrative e linguistiche in pazienti diagnosticati con distrofia muscolare di Duchenne" sono stati valutati il livello intellettuale, le competenze cognitive e linguistiche di un gruppo di pazienti con DMD. I pazienti avevano un QI lievemente al di sotto della media e presentavano lievi carenze in compiti di attenzione visiva e di memoria a breve termine. L'analisi delle competenze linguistiche non ha evidenziato problemi nella comprensione o produzione verbale. Tuttavia, i campioni di linguaggio ottenuti in un compito di descrizione di vignette erano qualitativamente inferiori rispetto a quelli forniti da un gruppo di bambini con normale sviluppo cognitivo. In particolare, le loro produzioni erano caratterizzate da specifiche difficoltà morfosintattiche e lessicali (ridotta produzione dei verbi con conseguente ridotta produzione di frasi grammaticalmente ben costruite). I risultati di questo studio hanno portato alla stesura dell'articolo "Evaluation of narrative abilities in patients suffering from Duchenne Muscular Dystrophy" inviato a *Brain and Language* ed al momento in fase di review.

La seconda parte del progetto, tutt'ora in corso, è stata invece dedicata alla "Valutazione delle competenze narrative e linguistiche in pazienti diagnosticati con Disturbo Specifico del Linguaggio (DSL)". In questo secondo studio le prestazioni di un gruppo di pazienti DSL sono state confrontate con quelle di un gruppo di soggetti di controllo in un compito di descrizione di vignette. Allo stato attuale della ricerca i campioni di linguaggio dei due gruppi di soggetti sono stati registrati, trascritti ed analizzati. Per quanto riguarda le abilità linguistiche e narrative fornite dai pazienti con DSL l'analisi è ancora nelle prime fasi e pertanto non è possibile trarre conclusioni specifiche.

Sottoprogetto n. 2: validazione di una batteria di pragmatica verbale per bambini dai 4 ai 12 anni (Resp. Dr. Alessandro Tavano)

### Razionale

Lo studio delle abilità pragmatiche si serve di strumenti prevalentemente qualitativi (scale di giudizio rispetto alle diverse abilità, Bishop 1998) che non permettono una valutazione quantitativa che individui indici predittivi di difficoltà o disturbo (Botting e Conti-Ramsden 2003). La ricerca che si è svolta ha compreso la somministrazione di un protocollo sperimentale di valutazione quantitativa dell'evoluzione della pragmatica nei bambini dai 4 ai 10 anni (Tavano 2004, 2005) a una popolazione di soggetti con difficoltà pragmatiche. Il protocollo è composto di 9 prove: INTERAZIONE (3 prove): 1) conversazione semistrutturata; 2) prosodia linguistica (comprensione e produzione); 3) prosodia emotiva (comprensione e produzione); COMUNICAZIONE IMPLICITA (6 prove): 1) similitudini; 2) metafore; 3) idiomi; 4) presupposizioni; 5) implicature; 6) atti linguistici indiretti.

### Obiettivi

1. Validare il protocollo delle abilità pragmatiche verbali nei bambini dai 4 ai 10 anni su un campione di bambini con patologie che includono disturbi della sfera pragmatica.
2. Continuare la raccolta di dati normativi sui soggetti con sviluppo tipico.

### Soggetti

1. Il campione analizzato fino a questo punto consiste di 10 soggetti patologici: 5 soggetti con Sindrome di Down, 5 soggetti con Sindrome di Asperger, confrontati con i risultati di 6 soggetti normali.

### Risultati

In generale, il profilo che si evince dalle prove somministrate mostra che a una generale compromissione nel caso della sindrome di Down si oppone una conservazione dei principali processi inferenziali espliciti nel caso della sindrome di Asperger. I bambini appartenenti a questo secondo gruppo mostrano però di avere tre tipi di difficoltà selettive: 1) nella ricezione e produzione di contorni prosodici, compensate solo in parte; 2) nella comprensione di idiomi, un processo che richiede un alto grado di comprensione dell'associazione arbitraria tra un significato letterale e un significato idiomatico, non ricavabile da un'analisi dei possibili confronti fra i termini in questione, come nel caso delle metafore; 3) nella comprensione di inferenze legate all'azione di un agente.

### Bibliografia

- Bishop DVM.: DEVELOPMENT OF THE CHILDREN'S COMMUNICATION CHECKLIST (CCC): A METHOD FOR ASSESSING QUALITATIVE ASPECTS OF COMMUNICATIVE IMPAIRMENT IN CHILDREN. JOURNAL OF CHILD. Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines 1998; 39,879-891.
- Botting N, Conti-Ramsden G.: AUTISM, PRIMARY PRAGMATIC DIFFICULTIES, AND SPECIFIC LANGUAGE IMPAIRMENT: CAN WE DISTINGUISH THEM USING PSYCHOLINGUISTIC MARKERS? Developmental Medicine and Child Neurology 2003; 45,515-524.
- Tavano A.: IL PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELLA COMUNICAZIONE VERBALE NEI BAMBINI (PAPV-PAPB). 2004/2005; IRCCS "E.Medea", Polo Regionale di San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato.

## UTILIZZO DEL NITROSSIDO COME MEZZO FARMACOLOGICO PER OTTIMIZZARE LE TERAPIE CELLULARI DELLE DISTROFIE MUSCOLARI

**PROF. EMILIO CLEMENTI**

e-mail: EMILIO.CLEMENTI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2005

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### RIASSUNTO

Il nitrossido (NO) svolge un ruolo importante nella regolazione dei processi di riparo e rigenerazione del muscolo scheletrico, al punto che nella distrofia muscolare di Duchenne, parte del danno origina da una ridotta funzione della NO sintasi muscolo-specifica dovuto alla sua localizzazione ectopica dell'enzima. L'obiettivo di questa ricerca corrente era il valutare la possibilità di utilizzare l'NO come farmaco, o co-farmaco, in grado di migliorare la funzionalità muscolare in modelli animali di distrofia, e di approfondire gli eventi molecolari sottostanti all'azione di NO. I risultati ottenuti mostrano che l'NO è un mediatore fisiologico della funzionalità muscolare, in grado di aumentare il trofismo e la capacità di generare energia del muscolo. Inoltre, NO aumenta la capacità fusogena, sia di cellule satelliti che di mesoangioblasti agendo con un meccanismo follistatina-dipendente. Gli studi in vivo, infine, hanno mostrato che, almeno nel topo distrofico, l'NO ha proprietà farmacologiche importanti che possono migliorare il quadro patologico, ed agire in sinergia terapeutica con le cellule staminali.

## VALUTAZIONE CLINICA, MODELLI CELLULARI E APPROCCIO TERAPEUTICO IN DIVERSE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE E NEUROMOTORIE

**DR.SSA MARIA TERESA BASSI**

e-mail: MARIATERESA.BASSI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2005

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### PREMESSE

In questa proposta di ricerca corrente si è affrontato lo studio di diverse patologie neurodegenerative e/o neuromotorie sotto diversi aspetti, clinico, strumentale, genetico e funzionale.

Le patologie prese in considerazione coinvolgono un ampio spettro della casistica di pazienti afferenti a questo Istituto: 1) Paraparesi spastiche, 2) ceroidolipofuscinosi, 3) forme familiari di SLA (ad esordio precoce), atassie (forme episodiche e progressive). Per ciascuna di queste patologie sono stati studiati aspetti diversi (come meglio specificato nelle sezioni successive) in base alle patologie specifiche, alle casistiche a disposizione per ciascuna di esse ed ai dati preliminari disponibili.

I risultati ottenuti sono quindi presentati suddivisi in 3 sottoprogetti:

- 1) Paraparesi spastiche
- 2) Ceroidolipofuscinosi
- 3) Modelli cellulari e animali di patologie neurodegenerative, SLA e Atassie

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: paraparesi spastiche (Resp. Dr.ssa Maria Grazia D'Angelo)

Le paraparesi spastiche ereditarie sono un gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da spasticità progressiva agli arti inferiori associata ad ipostenia, disturbi vescicali e modesta riduzione della sensibilità vibratoria. Nel primo anno di attività del progetto è stata raccolta un'ampia casistica di 129 pazienti in collaborazione con altri centri da tempo coinvolti nella diagnosi e

nella cura delle patologie neurodegenerative, in particolare sia Poli de La Nostra Famiglia, quali la sezione di Conegliano e di Ostuni, sia centri esterni quali il Dip. di Neuroscienze dell'Università di Milano presso l'IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, l'Istituto Policlinico S. Donato, il Dip. di Neuroscienze dell'Università di Messina e il Dip. di Neurologia dell'Università di Padova. Su questa casistica selezionata in base ai criteri di seguito dettagliati sono stati condotti studi di tipo clinico-funzionale-strumentale sia di tipo genetico molecolare. I dati preliminari ottenuti su 12 pazienti per la parte funzionale-strumentale in particolare l'esame del cammino, Gait analysis (Elite Biomech), ha evidenziato dei pattern tipici di iperestensione di ginocchio in mid-terminal stance di durata ed entità maggiore rispetto al pattern di diparesi (da esiti di sofferenza neonatale) e non legato ad aumento coppia plantiflessione/estensione ginocchio. In alcuni dei soggetti era documentabile un aumento dell'area della base di appoggio a supporto della presenza di segni di coinvolgimento cerebellare. Parallelamente i dati ottenuti per la parte genetico molecolare su una più ampia casistica hanno permesso l'individuazione di 12 mutazioni nel gene SPG4 di cui 8 nuove, 3 mutazioni in SPG7 di cui due ancora in fase di caratterizzazione e una mutazione già nota in SPG17. È in corso il completamento dell'analisi della casistica già esistente per gli altri geni già noti, parallelamente all'analisi di nuovi casi che verranno selezionati durante il prossimo anno di attività.

#### Sottoprogetto n. 2: ceroidolipofuscinosi (Resp. Dr.ssa Maria Teresa Bassi e Prof. Emilio Clementi)

Questo sottoprogetto è focalizzato all'analisi genetica di pazienti con forme note e non, di ceroidolipofuscinosi ed allo studio del ruolo dei geni per le ceroidolipofuscinosi (CLN) nel differenziamento neuronale. In tale ambito l'attività si è indirizzata da un lato all'analisi genetica di pazienti con diagnosi clinica di ceroidolipofuscinosi ma privi di diagnosi molecolare e dall'altro allo studio di una linea cellulare neuronale di topo, P19 che in presenza di acido retinoico può differenziare in neuroni e glia.

L'analisi dei livelli di espressione di vari marker neuronali ha permesso di caratterizzare morfologicamente il differenziamento delle P19 e di individuare diverse fasi: la fase di crescita del neurite, una fase in cui i neuroni diventano postmitotici seguita da dendritogenesi e sinaptogenesi. Que-

st'analisi ci permette di valutare eventuali alterazioni in assenza dei geni CLN. È stato riscontrato che i livelli di espressione dei geni CLN variano durante il differenziamento delle P19 e che i diversi geni sono espressi con intensità diversa in fasi diverse del differenziamento. Questo suggerisce che questi geni non solo potrebbero avere un ruolo nel differenziamento ma che potrebbero essere diversamente coinvolti nelle diverse fasi. Per valutarne il ruolo nel differenziamento neuronale i geni CLN sono stati silenziati usando specifici RNA interference in un sistema inducibile regolato dalla tetraciclina. Le sequenze di RNA interference sono state validate transfettando le P19 e analizzando i livelli di espressione dei geni CLN per Real Time. Le P19 sono state transfettate stabilmente con il vettore che codifica per il tet repressor e determina l'inducibilità. Il clone con i livelli più alti di tet repressor è stato in seguito transfettato con la sequenza avente attività interference maggiore per ogni gene. L'efficienza delle sequenze interference nei cloni ottenuti è stata valutata attivando l'interference con la tetraciclina. I cloni selezionati presentano una diminuzione dei livelli di espressione dei geni CLN del 60-70% e ci permetteranno di valutare l'effetto di tale riduzione sul differenziamento.

Il progetto proposto si proponeva di affrontare lo studio di questo gruppo eterogeneo di patologie le ceroidolipofuscinosi, sotto due aspetti, A) analisi genetica della casistica già disponibile e B) analisi biochimico-funzionale dei prodotti dei geni CLN noti.

#### Sottoprogetto n. 3: modelli cellulari e animali di patologie neurodegenerative, SLA e atassie (Dr.ssa Maria Teresa Bassi)

Il sottoprogetto in esame nel primo anno di attività ha portato alla caratterizzazione biochimica e funzionale di una nuova mutazione nel gene ALS2 codificante per una proteina detta alsina. Tale mutazione identificata in un paziente con sclerosi laterale primaria ad esordio giovanile (JPLS) rappresenta la prima mutazione missenso identificata in tale gene e meritevole quindi di una caratterizzazione biochimico funzionale. Tali studi hanno portato alla definizione di un ruolo chiaramente antiapoptotico della proteina normale; al contrario la presenza di una mutazione puntiforme conferisce alla proteina una attività pro-apoptotica probabilmente responsabile dei fenomeni neurodegenerativi cellulari riscontrabili nei pazienti affetti da questa patologia. Parallelamente sempre nell'ambito dello studio delle forme familiari di

SLA ad esordio giovanile è stata identificata una nuova mutazione puntiforme nel gene della senataxina (ALS4) in una famiglia con una forma dominante di SLA ad esordio leggermente più tardivo. Viene di seguito riportata la descrizione clinica della probanda e una descrizione ancora parziale della famiglia non essendo stata completata la raccolta di tutti i membri della stessa.

Parimenti nell'ambito delle atassie è stato analizzato un paziente affetto da atassia spinocerebellare progressiva ad esordio molto precoce e portatore di una mutazione puntiforme nel gene della subunità A1 del canale del Ca di tipo P/Q CACNA1A. Anche in questo caso il tipo di mutazione associato alla particolarità del fenotipo del paziente rendono il caso meritevole di nota.

## **STRESS OSSIDATIVO, DIFESE ANTIOSSIDANTI E RUOLO DI RECETTORI DI MEMBRANA IN PAZIENTI CON SINDROME DI DOWN E MALATTIA DI ALZHEIMER: STUDIO IN CELLULE PERIFERICHE DA PAZIENTI, MODELLI NEURONALI E MUSCOLARI**

**PROF. CARLO FERRARESE**

e-mail: CARLO.FERRARESE@UNIMIB.IT

### **Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

### **Tipo di Ricerca**

Corrente

### **Periodo di svolgimento**

2005

### **Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### **RIASSUNTO**

Sottoprogetto n. 1: stress ossidativo e fibroblasti di pazienti Alzheimer e Down (Resp. Prof. Carlo Ferrarese)

Come previsto dagli obiettivi della ricerca, abbiamo messo a punto le tecniche e le condizioni per il dosaggio delle MAP kinasi nelle SH-SY5Y e in colture primarie di fibroblasti. In fibroblasti provenienti da soggetti sani, concentrazioni subletali e per tempi brevi di beta-amiloide e glutammato sono in grado di aumentare la fosforilazione di p38 e JNK, come abbiamo osservato nei pazienti. Questi trattamenti sono anche in grado di modulare l'attivazione di ERK, come abbiamo osservato nelle fasi iniziali di malattia di Alzheimer mentre una sua down regolazione nelle fasi più severe. Anche i dati ottenuti per l'uptake di glutammato mimano l'andamento osservato nei pazienti, suggerendo che i fibroblasti sono un utile modello per studiare i meccanismi patogenetici dell'AD.

I fibroblasti di pazienti AD e DS hanno mostrato, inoltre, una maggior suscettibilità ad agenti proossidanti quali HNE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e paraquat rispetto ai controlli. Tali agenti determinavano una significativa riduzione del trasporto di glutammato e l'alterazione dell'attività mitocondriale con concentrazioni inferiori rispetto a quelle necessarie a produrre gli stessi effetti nei controlli. Il trattamento con glutatione (GSH) era in grado di prevenire parzialmente l'effetto di paraquat, HNE e

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, indicando che questo antiossidante è in grado di svolgere un'azione protettiva. Poiché nessuna alterazione significativa è stata osservata sia a carico della GSH perossidasi sia della GSH reduttasi, abbiamo analizzato la cinetica dei trasportatori di cistina negli stessi pazienti indagando una possibile alterazione nella sintesi del GSH. E' stata osservata un'alterazione del trasporto di cistina sia nei pazienti AD sia DS rispetto ai relativi controlli. Tuttavia il reclutamento di una maggior casistica sarebbe necessaria per chiarire la significatività del dato ottenuto.

Abbiamo inoltre indagato l'effetto dell'NGF sull'uptake di glutammato in fibroblasti di soggetti controllo e di pazienti AD, paragonandoli al modello centrale di neuroblastoma umano SH-SY5Y. I primi esperimenti sono stati effettuati per definire le concentrazioni e i tempi di esposizione e stiamo anche indagando l'effetto di stimoli combinati (Abeta e NGF) rispetto alla singola somministrazione. Necessiterebbe poter continuare lo studio per indagare ulteriormente l'effetto dell'NGF e del suo recettore p75 nel modello periferico dei fibroblasti studiato in questo progetto.

**Sottoprogetto n. 2: ruolo di recettori di membrana, p75NTR nella trasduzione del segnale e sua interazione con AB nel corso di patologie neurodegenerative e/o muscolari (Resp. Dr.ssa Maria Teresa Bassi)**

Scopo del progetto di ricerca era valutare le vie di trasduzione del segnale attivate da p75NTR, il recettore a bassa affinità per le neurotrofine, e del recettore di p55kDa per il TNF- $\alpha$  (TNF-RI) importanti nelle forme proinfiammatorie e degenerative del muscolo e del sistema nervoso centrale. I risultati ottenuti da questo studio forniscono una caratterizzazione molecolare della via di segnale di questi recettori rivelando il legame tra recettori, sfingomielinasi acida e neutra ed attivazione delle nitrossido sintasi neuronale ed endoteliale. Chiariscono il ruolo della via degli sfingolipidi e delle NO sintasi nel promuovere e regolare il segnale apoptogeno generato da p75NTR e TNF-RI. Rivelano infine il ruolo degli sfingolipidi e dell'NO nel regolare il segnale proinfiammatorio generato dal TNF- $\alpha$ .

## **ANALISI DI BREAK POINT IN RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI – IMPLEMENTAZIONE DI ALGORITMI SUPPORT VECTOR MACHINES – CINETICHE DI RIMOZIONE DEGLI INTRONI DEL GENE DMD**

**DR.SSA MANUELA SIRONI**

e-mail: MANUELA.SIRONI@BP.LNF.IT

### **Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

### **Tipo di Ricerca**

Corrente

### **Periodo di svolgimento**

2005

### **Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### **RIASSUNTO**

Sottoprogetto n. 1: analisi di breakpoint in riarrangiamenti cromosomici ricorrenti e non: studio citogenetico, molecolare, bioinformatico e verifica sperimentale attraverso l'uso di organismi modello (Resp. Dr. Roberto Giorda)

I riarrangiamenti cromosomici (delezioni, duplicazioni, traslocazioni) sono cause frequenti di tumori e malattie ereditarie. Abbiamo raccolto e analizzato informazioni sui punti di rottura di una casistica di traslocazioni ricorrenti e non, scoperte durante l'iter diagnostico di soggetti afferenti al nostro Istituto, insieme ad altri casi inviati da laboratori esterni. In particolare, è stato individuato un punto di rottura ricorrente in soggetti con sindrome da delezione 22q13 contenente una sequenza ripetuta strutturalmente complessa che sarà utilizzata per esperimenti in un modello di lievito. L'analisi dei motivi strutturali coinvolti nei riarrangiamenti non ricorrenti è tuttora in corso.

Per quanto riguarda l'utilizzo di sistemi modello, abbiamo messo a punto un sistema sperimentale basato sull'uso di cellule di lievito per lo studio delle sequenze coinvolte nella formazione di rotture a doppio filamento (double strand breaks, DSB) nel gene umano della distrofina. Abbiamo concentrato la nostra analisi su 8 regioni dell'introne 47 più una regione di controllo (proveniente dall'introne 71). Gli 8 frammenti analizzati nell'introne 47 coprono una regione in cui avevamo precedentemente identificato la presenza di 3 breakpoint di delezione estremamente ravvicinati. L'analisi fisica del DNA meiotico di lievito ci ha

consentito di stabilire che un inserto proveniente dall'introne 47 è in grado di generare DSB.

Abbiamo quindi approfondito le analisi sulla regione dell'introne 47 coinvolta nei DSB; applicando metodi statistici (kernel density estimates) abbiamo riscontrato la presenza nell'introne di due cluster, il primo dei quali mappa esattamente nella regione in grado di generare DSB. Abbiamo quindi intrapreso la mappatura dei breakpoint di delezione in una popolazione indipendente di pazienti BMD/DMD: la frequenza di breakpoints in questa regione è risultata 3 volte maggiore di quella attesa nell'ipotesi di una distribuzione casuale dei breakpoints.

Questi dati indicano che esiste una regione dell'introne 47 che va incontro a DSB durante la meiosi di lievito; tale regione presenta una frequenza di breakpoint di delezione estremamente elevata suggerendo che la formazione di DSB sia responsabile del verificarsi degli eventi deletivi.

#### Sottoprogetto n. 2: implementazione di algoritmi SVM per la predizione dell'effetto patologico di mutazioni puntiformi (Resp. Ing. Uberto Pozzoli)

Abbiamo deciso di concentrare la nostra attenzione sulle mutazioni puntiformi e gli SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) che possano causare alterazioni nei processi di splicing. Abbiamo estratto dai database pubblici tutti gli SNP che mappino su esoni noti di geni umani. Attraverso l'allineamento con la sequenza genomica di Scimpanzé abbiamo poi inferito quale allele rappresentasse la forma ancestrale. Attraverso l'uso di matrici consenso per enhancer di splicing esonici (ESE) abbiamo poi determinato l'effetto di ogni SNP sulla presenza di ESE. Infatti un allele SNP può determinare la perdita di un ESE, può variare il tipo di proteina legata dall'ESE stesso, può creare un nuovo ESE o essere neutro rispetto alla presenza di ESE. Il senso della variazione viene stabilito in base all'allele ancestrale. Abbiamo quindi creato un database di ESE creati, ESE modificati, ESE distrutti. Stiamo ora studiano la distribuzione relativa (in base al tessuto di espressione, al livello di espressione, alla presenza di splicing alternativi) di ciascun tipo di evento.

Lo scopo di questo lavoro è quello di mettere a punto un sistema di predizione di SNPs funzionali che, localizzati in geni responsabili di patologie genetiche (o malattie complesse), potrebbero agire come modificatori del fenotipo clinico o come fattori di predisposizione. Stiamo infatti selezionando sistemi SNPs/ESE per lo studio in

vitro (attraverso l'uso di cellule HeLa e l'analisi, tramite Real Time PCR, dell'efficienza di splicing) al fine di validare le predizioni ottenute attraverso le analisi *in silico*.

#### Sottoprogetto n.3: cinetiche di rimozione degli introni del gene DMD: rilevanza per meccanismi fisiologici e patologici di splicing (Resp. Dr.ssa Manuela Sironi)

Numerosi studi di genomica comparativa hanno indicato come le sequenze introniche aumentino in numero e dimensione con l'aumentare della complessità degli organismi viventi, indicando che le sequenze non codificanti debbano avere un ruolo, forse regolatorio, nello svolgimento di alcuni processi cellulari.

Al fine di approfondire tali ipotesi abbiamo costruito un database di sequenze introniche umane provenienti da circa 6000 geni. Sono poi state calcolate la densità di sequenze conservate in multiple specie (MCS) e di elementi trasponibili (TE). Le analisi effettuate ci hanno consentito di dimostrare che la frequenza e la lunghezza medie di MCS aumentano all'aumentare della lunghezza intronica, mentre la frequenza di TE ha un andamento opposto. Inoltre, analizzando introni singoli si osserva una correlazione positiva e significativa tra densità di MCS e lunghezza della sequenza intronica unica (purificata dai TE); si osserva invece una correlazione negativa tra densità di MCS e frequenza di TE. Per quanto riguarda la localizzazione di MCS e TE rispetto ai siti di splicing, abbiamo dimostrato come le regioni vicine ai siti di splicing abbiano una maggiore frequenza relativa di MCS e una minore densità relativa di TE. Inoltre tali zone altamente conservate e con poche sequenze ripetute si estendono per una lunghezza via via maggiore all'aumentare della lunghezza intronica fino a raggiungere 3 kb a valle del sito di splicing in 5' nel caso di introni estremamente lunghi.

Abbiamo inoltre identificato, attraverso l'analisi sistematica della letteratura, le sequenze di 45 elementi funzionali intronici. La metà di tali elementi mappa con una sequenza conservata e in molti casi rappresenta un regolatore di splicing. Queste analisi indicano che le sequenze conservate introniche giocano un ruolo importante nella regolazione dello splicing (specialmente in geni, come quello della distrofina, caratterizzati da sequenze introniche estremamente lunghe) e devono quindi essere prese in considerazione qualora si voglia costruire un modello comprensivo che descriva le cinetiche di splicing. Infatti,

la presenza di numerose sequenze conservate lungo tutta la lunghezza intronica suggerisce che alcune di tali sequenze, anche se lontane dai siti di splicing, potrebbero contribuire alla rimozione dell'introne.

Per quanto riguarda l'approccio sperimentale, al fine di valutare la cinetica di rimozione degli introni della regione centrale del rod-domain nel gene umano della distrofina e degli introni 7 e 76 dello stesso gene, abbiamo messo a punto un protocollo che prevede l'utilizzo della Real Time PCR per effettuare una analisi di tipo quantitativo per stabilire la proporzione di molecole rimosse nel tempo per ciascun introne.

I risultati fino ad oggi ottenuti con la Real Time PCR indicano che l'introne 44 viene rimosso durante il processamento del RNA più lentamente rispetto agli altri introni analizzati. Questo potrebbe essere correlato alle enormi dimensioni dell'introne stesso (248 Kb). Non abbiamo invece osservato alcuna variazione significativa nella velocità di rimozione degli altri introni del rod-domain considerati, pur essendo di lunghezze diverse. Ad oggi tale analisi è stata effettuata su due tempi: tempo 0 e tempo 1h dalla somministrazione di actinomicina D. L'analisi della velocità di rimozione di questi stessi introni in tempi diversi (5, 10, 20 minuti) dall'aggiunta di actinomicina fornirà dati ulteriori per confermare i dati ottenuti al tempo 1h per l'introne 47 e per verificare se nelle nuove condizioni sperimentali sia possibile osservare differenze nella velocità di rimozione degli altri introni analizzati e stabilire eventualmente se esiste una correlazione tra la cinetica di rimozione degli introni e la lunghezza degli introni stessi.

## SVILUPPO DI UN MODELLO DI EPILESSIA MIOCLONICA GIOVANILE IN DROSOPHILA

**DR. ANDREA MARTINUZZI**

e-mail: ANDREA.MARTINUZZI@CN.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Conegliano

Nel corso del 2005 abbiamo ottenuto i seguenti risultati:

1. abbiamo eseguito esperimenti di ibridizzazione in situ per i geni CG8959 e CG11048 e abbiamo dimostrato che i corrispondenti messaggeri sono espressi soprattutto nel tessuto nervoso
2. abbiamo generato anticorpi policlonali contro le proteine codificate dai geni CG8959 e CG11048 allo scopo di eseguire studi di immunostochimica ed abbiamo verificato che essi riconoscano le proteine corrette eseguendo esperimenti di immunocitochimica su cellule di Drosophila trasfettate con costrutti per l'espressione di CG8959 e CG11048
3. abbiamo creato linee transgeniche per knockdown mediato da RNA interference dei geni CG8959 e CG11048 allo scopo di determinare i fenotipi causati dalla perdita di funzione di tali geni. Purtroppo le nostre analisi hanno dimostrato che questi costrutti non producono l'effetto desiderato
4. abbiamo generato costrutti per creare individui knock-out per entrambi i geni
5. abbiamo generato animali transgenici per la sovraespressione dei geni CG8959 e CG11048. A questi transgeni è stato fuso un tag HA in 3' per l'identificazione della proteina transgenica
6. abbiamo generato linee transgeniche per l'espressione di versioni mutanti di CG8959 e CG11048 per iniziare a stabilire la Drosophila come modello per la JME. A questo scopo abbiamo scelto una mutazione patologica che riguarda un residuo aminoacidico conservato nelle proteine umana e di Drosophila.

## **TECNOLOGIE PER IL TELEMONITORAGGIO DOMICILIARE DI PARAMETRI QUANTITATIVI IN PAZIENTI CON PATOLOGIE CRITICHE**

**ING. GIANLUIGI RENI**

e-mail: GIANLUIGI.RENI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 6**

Bioingegneria

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2005

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### **RIASSUNTO**

La Telemedicina prevede l'applicazione delle tecnologie informatiche e delle telecomunicazioni alla scienza medica, muovendo dati al posto di pazienti.

La nostra ricerca si orienta principalmente verso le applicazioni di telemonitoraggio, con lo scopo di supervisionare lo stato di salute del paziente presso il suo domicilio e ridurre ed ottimizzare i follow-up presso la struttura sanitaria.

Nel corso del primo anno si erano analizzate le interazioni medico-paziente durante lo svolgimento di alcuni protocolli terapeutici (terapia OS, pompa di Baclofen, terapia con tossina botulinica, pazienti post-chirurgici); erano state valutate e messe a confronto le tecnologie potenzialmente più indicate per effettuare il telemonitoraggio, decidendo di utilizzare un computer palmare dotato di telecamera, per l'acquisizione di immagini e filmati, e di connettività attraverso ordinari operatori di telefonia mobile; infine si era realizzato il software per la trasmissione dei dati dal palmare e quello per la raccolta e l'archiviazione delle informazioni trasmesse in un apposito database.

Il secondo anno di ricerca è stato dedicato alla definizione di dettaglio dei protocolli di valutazione domiciliare e alle prime sperimentazioni del sistema di telemonitoraggio, sia con pazienti ospedalizzati, che con pazienti al proprio domicilio. I dati provenienti dalla sperimentazione hanno poi orientato il lavoro allo sviluppo di un sensore per il rilevamento di angoli, al fine di ottenere misure più precise e paragonabili tra loro. Sono state esaminate e comparate le tecnologie disponibili e idonee per la quantificazione

di dorsiflessione e plantiflessione del piede ed estensione del ginocchio: si è scelto di lavorare con sensori di tipo inerziale. È stata sviluppata la parte matematica di supporto alle misure effettuate dai sensori ed è stato costruito un primo circuito sperimentale, attualmente in fase di test in laboratorio.

È stata anche prodotta la documentazione necessaria per l'installazione del sistema di telemonitoraggio e per un corretto utilizzo del palmare da parte dell'utente ed il manuale di riferimento per l'integrazione del sistema di telemonitoraggio con il Clinical Information System dell'Istituto.

## INDIVIDUAZIONE DI STRUMENTI DIAGNOSTICI CLINICO-FUNZIONALI E DI STRATEGIE DI INTERVENTO BASATI SU PROTOCOLLI INTERNAZIONALI CONDIVISI NELLA RIABILITAZIONE DELLE DISABILITÀ NEUROPSICHICHE COMPLESSE DELL'ETÀ EVOLUTIVA

**DR. ANGELO MASSAGLI**

e-mail: ANGELO.MASSAGLI@OS.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 7

Organizzazione dei servizi

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2005

### Polo Scientifico

Ostuni

### RIASSUNTO

Sottoprogetto n. 1: individuazione e applicazione di strumenti di assessment mappabili sulle diverse dimensioni dell'ICF, con particolare riguardo all'età evolutiva (Resp. Dr. Andrea Martinuzzi)

Il progetto oggetto di questa ricerca avviato in continuità con il precedente progetto RC2004 si è articolato nelle seguenti aree:

*Sperimentazione e applicazione clinica dei questionari ICF-CY nel setting ospedaliero ed extra-ospedaliero del Polo di Conegliano.*

Dopo la formazione di circa 90 operatori di tutti i Centri del Veneto di varie professionalità mediante un corso base, un corso avanzato (primavera 2005) e un periodo di Formazione a distanza (giugno-luglio 2005), all'interno del setting ospedaliero ed extra-ospedaliero del Polo di Conegliano si è iniziato ad utilizzare i questionari ICF-CY età-specifici, tradotti in italiano, in versione informatica ad uso interno.

*Mappatura di strumenti di assessment sui domini ICF.*

Al fine di dimostrare che l'ICF risulta uno strumento affidabile ed efficace per offrire un profilo funzionale del bambino, si è deciso di mappare una serie di strumenti di assessment iniziando dall'area motoria. Per questo alcuni codici dei domini dell'ICF (componente funzioni corporee, attività e partecipazione) sono stati correlati con

strumenti validati e standardizzati a livello internazionale, quali: Gross Motor Function Measure, F.I.M., esame articolare e scala di Ashworth, usati dai fisioterapisti del nostro Centro.

Dalla ricerca svolta su un campione di 20 soggetti di età compresa tra 0 e 18 anni è risultato che l'esame articolare e la scala di Ashworth non possono essere usati con il questionario ICF-CY; è emersa invece una correlazione positiva con la scala F.I.M e con la scala G.M.F.M. Sarebbe interessante valutare la misura di associazione con altre scale di valutazione usate in riabilitazione, anche in altre aree come quella educativa, pedagogica e sociale.

Sottoprogetto n. 2: creazione di strategie di intervento e di protocolli internazionali comuni nella riabilitazione delle Disabilità Neuropsichiche complesse dell'Età Evolutiva (Resp. Dr. Angelo Massagli)

### Razionale

La riabilitazione delle disabilità neuropsichiche complesse dell'età evolutiva ha attraversato negli ultimi decenni una rapida evoluzione. Questi cambiamenti sono stati favoriti oltre che dalla fisiologica maturazione della giovane disciplina anche dall'evoluzione delle conoscenze scientifiche, in particolare nel campo della genetica. Nonostante questa evoluzione, essa è ancora lungi dall'essere una materia univoca e universalmente condivisa.

### Obiettivi

Effettuare una ricognizione sugli approcci riabilitativi nelle disabilità neuropsichiche complesse dell'età evolutiva nelle varie regioni italiane e nei Paesi europei, definirne i punti di contatto e quelli di divergenza, individuare possibili linee di intervento comuni e condivise.

### Metodologia

Articolazione biennale (inizialmente triennale), individuazione casistica con separazione dei diversi tipi di patologie (Paralisi Cerebrali Infantili e Disturbi Pervasivi dello Sviluppo), individuazione degli Istituti e/o delle Università nei vari Paesi europei, elaborazione interviste e questionari da sottoporre ai responsabili dei suddetti Istituti, invio di questi ai destinatari, visite ad alcuni dei suddetti Istituti, studio dei dati rilevati con le interviste e con le visite, raffronto delle diverse modalità di approccio, individuazione degli elementi comuni.

## Risultati e Discussione

L'approccio diagnostico-terapeutico-riabilitativo alle Paralisi Cerebrali Infantili (PCI) è più uniforme rispetto a quello dei Disturbi Pervasivi dello Sviluppo (DPS). Questo può essere dovuto al fatto che in una patologia organica come le PCI, sia pure complessa, si sono individuati già da anni dei percorsi definiti, condivisi dalla comunità clinico-scientifica. Ciò però non toglie che chi in Centri di riabilitazione non inseriti nei suddetti circuiti la strada seguita non sia la stessa. I DPS vedono invece un approccio decisamente più eterogeneo da un lato a causa della maggiore dispersività di base della problematica clinica, dall'altro per la scarsa e irregolare adesione della comunità clinico-scientifica alle linee guida italiane sull'autismo del 2004. I dati provenienti dai centri più importanti hanno comunque una uniformità di base, sia pure discostandosi per alcuni aspetti procedurali. Quelli degli altri denotano impostazioni a volte contraddittorie, sicuramente confusive per i pazienti e le loro famiglie.

## Conclusioni

La ricerca ha da un lato confermato alcuni presupposti teorici della stessa presenti nel razionale, ma ha anche fornito alcune risposte diverse rispetto alle attese. In linea di massima è più uniforme l'approccio alle PCI. Nei DPS l'approccio è invece più variegato. Quest'ultimo dato rende ragione delle difficoltà che spesso le famiglie dei bambini autistici hanno nell'individuare delle modalità d'approccio omogenee fra i vari centri, istituti e professionisti consultati.

Al riguardo sembra essere opportuna una riflessione comune fra coloro che si occupano di questa patologia sull'utilizzo delle linee guida, sulla possibilità di dare messaggi chiari alle famiglie e sulla possibilità di intervenire al meglio nei bambini con questa patologia.

**Sottoprogetto n. 3: intervento riabilitativo e qualità della vita in bambini con disabilità neurologiche (Resp. Dr. Antonio Trabacca e Dr. Paolo Profice)**

Negli ultimi anni, sia negli studi clinici che nella pratica clinica ha assunto un ruolo sempre più importante un nuovo parametro di valutazione dello stato di salute, la qualità della vita (QoL). Con il termine "qualità della vita" o più correttamente "qualità della vita associata allo stato di salute" (HRQoL dal termine inglese Health Related Quality of Life) ci riferiamo quindi ad

un complesso di stati oggettivi e di percezioni soggettive della salute che si riferiscono al dominio fisico, psicologico e sociale, inteso come attività di vita quotidiana e di relazioni sociali, (Donegan and Potts; 1988), ma anche agli aspetti culturali così come ai bisogni individuali, ai desideri, alle aspirazioni e alle aspettative di ciascuno (Leiper and Roberts; 1993).

Il nostro studio si propone di valutare la qualità di vita in bambini con disabilità neurologiche al fine di individuare le variabili che più di altre condizionano negativamente la qualità di vita degli stessi bambini e delle loro famiglie. Il campione in studio è costituito da un gruppo di bambini affetti da paralisi cerebrale infantile (PCI) che rappresentano la più comune causa di disabilità in ambito neurologico in età evolutiva. La popolazione presa in esame è costituita da 50 pazienti consecutivamente inviati per valutazione clinico-funzionale presso l'Unità Operativa di Neuroriabilitazione I dell'IRCCS "E. Medea" di Ostuni. La raccolta dati è stata avviata l'1 febbraio 2005 e si è conclusa il 30 novembre 2005. Il tipo di PCI è stato individuato in base alla classificazione di Hagberg (1975) mentre la gravità del profilo funzionale è stato valutato tramite la sottoscala motoria della Wee-FIM (2004). Sono state quindi valutate le variabili relative alle caratteristiche dell'epilessia, alle condizioni familiari e socio-economiche, alle eventuali altre patologie associate. La qualità della vita (HRQoL) dei soggetti reclutati è stata valutata dai caregivers attraverso il questionario Impact of Childhood Neurologic Disability Scale e il Caregivers Questionnaire, somministrato da un operatore sanitario esperto. Il nostro studio evidenzia una significativa compromissione della qualità di vita nei soggetti con PCI nel giudizio espresso dai familiari dei pazienti reclutati nello studio. Emerge una correlazione netta tra gravità della disabilità motoria e impatto negativo sulla qualità di vita, soprattutto negli ambiti relativi alla cura della persona (vestirsi/svestirsi; igiene personale; alimentazione; trasferimento da e su ausili), che comportano maggior carico assistenziale per le famiglie e maggiore condizionamento delle attività familiari. Per le forme di PCI meno severe, l'impatto della disabilità motoria risulta minimo o nullo sugli ambiti relativi alla cura della persona. Per ogni tipologia di PCI, la maggior parte dei genitori ritiene invece che la presenza di dolore cronico o un cattivo stato di salute condizionano negativamente la qualità di vita, che appare difatti nettamente peg-

giore nei soggetti portatori di deficit sensoriali o problemi internistici di una certa gravità. Tranne che per le forme di PCI più severe, i genitori esprimono comunque un giudizio soddisfacente circa i miglioramenti ottenuti dal proprio figlio negli ambiti della cura personale e nella possibilità di attuare o di collaborare nei trasferimenti. La presenza in comorbidità di disturbi cognitivi e/o comportamentali sembra condizionare negativamente più dei disturbi neurologici (motori e/o sensoriali) la vita di relazione del bambino, le possibilità di inserimento sociale e scolastico, le aspettative di vita del bambino e dell'intera famiglia. Nello specifico la presenza di disturbi cognitivi e/o comportamentali, influenza negativamente la relazione tra genitore e bambino rispettivamente per il 50% e il 58% dei genitori intervistati, contro il 38% dei genitori che ritengono molto disturbante la presenza di disturbi motori e/o sensoriali. La presenza in comorbidità di disturbi cognitivi e/o comportamentali va ad inficiare con più facilità rispetto ai disturbi motori la relazione tra il bambino disabile e i fratelli (specie per i disturbi comportamentali), mentre la relazione con i pari sembrerebbe essere condizionata negativamente allo stesso modo dalla presenza di disturbi motori, cognitivi e comportamentali. I disturbi comportamentali più di altri influenzano negativamente la vita della coppia genitoriale, così come soprattutto i disturbi cognitivi e comportamentali sembrano influenzare negativamente le aspettative di vita del bambino e dell'intera famiglia e le possibilità di inserimento sociale. Secondo i genitori, inoltre, i disturbi cognitivi condizionano più di altri i risultati scolastici e determinano scarsa stima di sé nel bambino. I caregivers dei bambini affetti da PCI ed epilessia esprimono un giudizio complessivo sulla qualità della vita dei propri figli significativamente inferiore rispetto al giudizio riportato dai caregivers dei bambini affetti da PCI ma non da epilessia. L'impatto dell'epilessia sulla qualità della vita appare maggiore nei soggetti con scarso controllo della sintomatologia critica, condizionando soprattutto l'inserimento sociale del bambino e le sue aspettative per il futuro, meno le relazioni e le dinamiche intrafamiliari.

Nel complesso, la maggior parte dei genitori (74% del totale) giudica da ottima a discreta la qualità di vita dei propri figli, mentre una minoranza la ritiene scarsa ed insufficiente.

Il nostro studio chiaramente dimostra l'impatto negativo della disabilità neurologica sulla qua-

lità di vita del bambino e dell'intera famiglia, impatto che è maggiore quanto più grave è la disabilità motoria. Emerge inoltre la necessità di una presa in carico riabilitativa globale che non miri solo al trattamento delle disabilità motorie, ma che tenga in conto i disturbi spesso associati in comorbidità, specie i disturbi cognitivi e comportamentali, che più di altri sembrano condizionare, nell'esperienza dei genitori, gli aspetti relazionali e sociali e alle aspettative di vita futura.

**RICERCHE  
MINISTERIALI  
CORRENTI 2006**

---

**RAZIONALI**

## SCREENING AD ALTA RISOLUZIONE MEDIANTE CGH-ARRAY (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) IN SOGGETTI CON QUADRO MALFORMATIVO COMPLESSO

**DR.SSA RITA GRASSO**

e-mail: RITA.GRASSO@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### DESCRIZIONE

Recenti dati epidemiologici indicano che circa 1/154 soggetti nati è portatore di un'anomalia cromosomica, spesso responsabile di fenotipi specifici e complessi. L'identificazione di sbilanci cromosomici rappresenta, quindi, una componente importante nella genetica clinica poiché, di fatto, molte sindromi sono dovute a delezioni e/o duplicazioni di segmenti cromosomici.

La condensazione dei cromosomi presente in un cariotipo alta risoluzione (400-550 bande) permette l'identificazione di delezioni e/o duplicazioni >10 Mb. Alterazioni più piccole (< alle 10 Mb) sono identificabili solo mediante tecniche di ibridazione in situ fluorescente (FISH) e altre metodiche molecolari. Recentemente, l'ibridazione genomica comparativa (CGH), un metodo che compara direttamente due DNA genomici per differenza di copie di DNA, è stata applicata a microarrays genomici (Array-CGH). L'Array-CGH si basa sostanzialmente sullo stesso principio della tradizionale CGH, ma il target di ibridazione è rappresentato da segmenti clonati di DNA (es BAC) e non più dalle metafasi.

Array-CGH ha molti vantaggi rispetto alle tecniche oggi disponibili perché offre un metodo rapido di analisi del genoma totale ad alta risoluzione e le informazioni ottenute sono direttamente rapportabili alle mappe genetiche e fisiche del genoma umano. L'unico svantaggio è l'impossibilità di rilevare riarrangiamenti bilanciati (traslocazioni reciproche bilanciate, in-

versioni). La recente letteratura dimostra il successo di questa metodica sia nell'analisi dei tumori, sia nella definizione di riarrangiamenti cromosomici costituzionali.

### Risultati e prodotti conseguiti nel 1° anno di ricerca

Sono stati selezionati 30 soggetti con RM medio/grave associato ad anomalie multiple congenite dei quali le precedenti analisi del cariotipo e delle regioni subtelomeriche erano risultate negative e 5 pazienti con un quadro sindromico associato a riarrangiamenti cromosomici.

L'applicazione della metodica array-CGH nei casi con riarrangiamenti noti ha permesso di testare l'efficacia del metodo e la messa a punto del protocollo di esecuzione dell'analisi. In particolare i risultati hanno permesso di caratterizzare velocemente a livello molecolare sbilanci cromosomi e di chiarirne la loro natura. Nello specifico:

- 1) caso 46,XY,del(12)(p11.2p12.1): ha confermato la presenza di una delezione interstiziale sul cromosoma 12p definendone l'estensione di circa 10 Mb.
- 2) 46,XY, .ish del(3)(q29)(3qtel-): è stata confermata, dopo precedenti approfondimenti di citogenetica molecolare mediante fish con cloni di BACs relativi alla regione cromosomica 3q29, la presenza di una delezione interstiziale.
- 3) 46,XY, t(8;18)(q21.2;q21.2): l'analisi mediante array-CGH ha dimostrato che la traslocazione t(8;18) era bilanciata. Due delezioni a carico di 14q32.33 (105 Mb dal telomero del braccio corto) e 15q11.2 (19 Mb dal telomero del braccio corto), quest'ultima presente anche nel padre, sono polimorfismi noti.
- 4) 46,XX, .ish der(19)t(19;21)(q13.4;q22.3)(Tel19q+,Tel21q+) pat. Poiché il riarrangiamento subtelomerico era familiare, presente nel padre e nonno paterno sani, è stata eseguita l'analisi mediante l'array-CGH per ricercare eventuali sbilanci genomici causativi del fenotipo della probanda. In questo caso non sono stati riscontrati sbilanci cromosomici mediante array-CGH, confermando che il riarrangiamento subtelomerico rappresenta un polimorfismo privo di significato patologico. La conferma definitiva si è avuta dal fatto che è stata trovata una mutazione puntiforme nel gene UB3A.
- 5) 46,XY, .ish del(6)(q27q27)(6qtel-): in questo caso l'analisi mediante array-CGH ha permesso di confermare la presenza di una delezione terminale pura a carico del cromosoma 6q27 e

di caratterizzare velocemente l'estensione della delezione risultata pari a circa 4 MB.

6) 46,XX del 8q23.4. In questo caso l'analisi mediante array-CGH ha permesso di individuare una delezione pari a 0.5 Mb, in un paziente negativo alle precedenti indagini. Sono in corso ulteriori indagini sui genitori per escludere che si tratti di un polimorfismo privo di significato patologico.

### Attività previste

La metodica array-CGH su soggetti con ritardo mentale e malformazioni multiple non associate ad alterazioni citogenetiche note è stata applicata, per ora, in 5 casi.

In un soggetto (soggetto n.6) è stata evidenziata una delezione interstiziale in 8q23.4 pari a 0.5 Mb. Sono tuttora in corso indagini sui genitori per escludere che si tratti di un polimorfismo privo di significato patologico.

Oltre ai 5 casi già analizzati, è stato preparato il DNA genomico di altri 10 soggetti con caratteristiche simili (RM e malformazioni in assenza di alterazioni citogenetiche note) per i quali le indagini con array-CGH sono ancora in corso.

Nel corso del secondo anno, oltre a completare lo studio del caso n. 6 verranno portate a termine le analisi mediante array-CGH dei rimanenti 15 casi già selezionati.

## STUDIO DELLA QUALITÀ DELLE CURE, DEI LIVELLI DI STIMOLAZIONE E DEI PROCESSI DI REGOLAZIONE PRECOCE DEL BAMBINO PRETERMINE COME FATTORI PREDITTIVI DELLA QUALITÀ DELLA RELAZIONE MADRE-BAMBINO

### DR. ROSARIO MONTIROSSO

e-mail: ROSARIO.MONTIROSSO@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Reparto di Patologia Neonatale e Terapia Intensiva dell'Ospedale "Manzoni" di Lecco

Reparto di Patologia Neonatale e Terapia Intensiva "Circolo – Fondazioni Macchi" di Varese

Ospedale Carlo Poma di Mantova U.O. Patologia Neonatale

Ospedale Vittore Buzzi di Milano TIN NIDO

Osp. Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena di Milano U.O. Neonatologia e TIN

Ospedale San Gerardo di Monza Neonatologia TIN

### DESCRIZIONE

Il presente progetto intende indagare il nesso tra la qualità delle cure messe in atto fin dalle primissime fasi di assistenza al bambino e la qualità della vita in età prescolare, tenendo in debito conto il ruolo esercitato dalla relazione affettiva con le figure primarie. È stato documentato che i fattori di rischio connessi alla nascita pretermine possono influire sulla crescita dei bambini prematuri, contribuendo a ritardarne o ad ostacolarne lo sviluppo. Sebbene i disturbi spesso insorgano solo in età prescolare e scolare, recenti studi ne individuano l'origine nelle difficoltà di regolazione emozionale precoce. Nel valutare le capacità di regolazione dei pretermine, inoltre, occorre tenere in considerazione l'influenza delle stimolazioni precoci (sia fisiche che sociali) e delle cure ricevute dal bambino nel corso del ricovero nel re-

parto di Terapia Intensiva, nonché la qualità della relazione instaurata con il caregiver. I principali obiettivi dello studio sono:

1. analizzare le capacità di regolazione precoce tramite l'utilizzo di una specifica scala di valutazione neuro-comportamentale (NNNS, Lester e Tronick, 2004);
2. analizzare il comportamento socio-emozionale e le caratteristiche interattive dei bambini nati pretermine e delle loro madri a 6 e a 30 mesi d'età corretta ( $\pm$  due settimane);
3. valutare gli effetti della nascita pretermine sullo sviluppo della capacità di auto-regolazione e delle strategie di coping adottate dal bambino in situazioni di frustrazione a 30 mesi di età;
4. valutare le differenze eventualmente esistenti tra qualità di vita in bambini nati pretermine sani Vs bambini nati a termine a 30 mesi di età.

### Risultati e prodotti conseguiti nel primo anno di ricerca

La natura longitudinale dello studio ha implicato per l'anno 2005 il conseguimento di obiettivi intermedi quali: dal punto di vista metodologico la messa a punto e l'adattamento italiano di alcuni strumenti (traduzione in lingua italiana di alcuni questionari e validazione di procedure di osservazione della relazione madre-bambino); dal punto di vista organizzativo, invece, si è provveduto a prendere contatti con alcuni Centri di Patologia Neonatale e di Terapia Intensiva Neonatale della Lombardia.

Rispetto al primo punto i risultati ottenuti da quattro studi pilota hanno dimostrato la validità degli strumenti selezionati e l'applicabilità dei paradigmi sperimentali anche in ambito italiano. La traduzione dei questionari, la messa a punto della scheda di valutazione dell'ambiente della TIN e l'avvio del training per la somministrazione di una scala di valutazione neurocomportamentale (NNNS, Lester e Tronick, 2004) hanno permesso di colmare le carenze in ambito italiano rispetto a queste aree di indagine.

Rispetto al secondo punto, tutti i Centri contattati hanno fornito la loro adesione a partecipare al progetto di ricerca.

Al momento attuale il raggiungimento degli obiettivi preliminari di tipo metodologico e organizzativo che la RC 2005 si era proposta ha permesso di definire e completare il protocollo di ricerca e di

predisporre le condizioni essenziali per avviare un progetto longitudinale e multicentrico.

### Attività previste

Nel corso della RC 2006 è previsto l'arruolamento dei bambini e dei loro genitori. Nel periodo di arruolamento concordato (6 mesi), saranno arruolati consecutivamente tutti i bambini nati pretermine afferenti ai Centri Specialistici e che soddisfino alla 36-sima settimana post-concezionale i criteri di inclusione. Successivamente per ogni bambino pre-termine dovrà essere arruolato alla 40-sima settimana del punto nascita del pre-termine ( $\pm$ 2 settimane) il corrispondente neonato a termine che soddisfi i criteri di inclusione previsti dal protocollo dello studio.

A tutti i bambini arruolati sarà somministrata la scala di valutazione neuro-comportamentale NNNS, mentre ai genitori sarà richiesto di compilare alcuni questionari. Ai medici dei Reparti coinvolti saranno richieste informazioni relative al profilo dell'unità operativa. Queste informazioni riguarderanno nello specifico le modalità di assistenza clinica, le procedure per il controllo delle stimolazioni ambientali, le pratiche relative alla cura e al controllo del dolore del bambino, nonché le modalità con cui vengono coinvolti i genitori (ad esempio, la possibilità della canguro terapia).

## DEFICIT VISUOCOGNITIVI E DISTURBI DELLA OCULOMOZIONE NEI QUADRI DI PCI-DIPARESI: FREQUENZA, DISTRIBUZIONE, TIPOLOGIA E CORRELAZIONI PER L'INQUADRAMENTO DIAGNOSTICO ED IL PROGETTO RIABILITATIVO

**DR.SSA CHIARA GAGLIARDI**

e-mail: CHIARA.GAGLIARDI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 1

Neuropatologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### DESCRIZIONE

Nell'ambito dei quadri con danno congenito, le Paralisi Cerebrali Infantili (PCI) possono costituire un modello per la complessa interazione ed integrazione percettivo motoria; pochi studi sono centrati sulle diverse funzioni cognitive e neuropsicologiche in questa vasta classe di patologie, accomunate da una definizione clinica e spesso diverse invece per meccanismo eziopatogenetico. La complessità è elevata, la variabilità costante così come l'interferenza del pattern neuromotorio in tutte le prestazioni. La compromissione delle funzioni superiori nelle PCI è variegata e dipendente dalla localizzazione del danno, dalla sua estensione e dai successivi processi di riarrangiamento. Alcuni elementi però, pur nella differenza dei singoli casi e delle caratteristiche del danno neuromotorio, sono frequentemente riscontrabili e configurano un pattern suggestivo sia in fase diagnostica che riabilitativa. In particolare i quadri di diparesi spastica costituiscono un gruppo di relativa maggiore omogeneità, o almeno di minore disomogeneità: il meccanismo eziopatogenetico del danno è relativamente comune, l'insorgenza del danno è prevalentemente prenatale e l'esito della sofferenza è nella maggior parte dei casi un quadro di leucomalacia periventricolare di diversa entità. Il quadro clinico presenta la concomitanza di un danno neuromotorio di variabile entità a maggiore espressione agli arti inferiori e di disturbi neurovisivi e visuocognitivi: la va-

riabilità della compromissione nei singoli casi è elevata.

La presenza di turbe neurovisive (CVI, CVD) condiziona un deficit di integrazione percettiva e spaziale che, a sua volta, co-determina una caduta di integrazione prassica aldilà del deficit motorio, più evidente a livello costruttivo. La compromissione della memoria procedurale, presente in una significativa percentuale dei soggetti ma non in tutti, costituisce una variabile rilevante per l'apprendimento e per i percorsi riabilitativi.

Di fatto da sempre la riabilitazione tiene in diversi gradi di considerazione la indissolubilità percezione/motricità e fonda troppo spesso sulla ripetizione la possibilità di impostazione/preservazione di schemi nuovi e più adattivo/funzionali. Uno sforzo per una maggiore comprensione dell'apporto delle singole componenti al quadro complessivo potrebbe consentire sia una espansione delle conoscenze che un avanzamento della qualità del processo riabilitativo.

La possibilità di inquadramento più preciso dei diversi livelli di compromissione, ricercati in fase precoce, consente di mirare ed integrare gli interventi. L'individuazione di pattern ricorrenti può consentire la stesura di linee guida mirate agli aspetti cognitivi in una patologia che viene tuttora classificata in base alle sue caratteristiche di deficit motorio ma il cui outcome, anche in termini di qualità della vita, è strettamente correlato alla integrazione percettivo-motoria e alle possibilità di compenso.

Ci si propone pertanto di reclutare una casistica di pazienti diparetici seguiti presso l'Istituto per consentire:

- Stesura di un protocollo integrato (clinico, multispecialistico, neuroradiologico, neurovisivo e visuocognitivo)
- Raccolta dei dati (clinici, neuroradiologici, neurovisivi, neurocognitivi)
- Correlazione tra i dati
- Individuazione di indicatori precoci sia clinici che riabilitativi
- Stesura di un protocollo (clinico e riabilitativo) alla luce dei dati ottenuti

### Attività previste

Stesura protocollo raccolta dati

- Somministrazione protocollo
- Raccolta ed elaborazione dei dati
- Stesura protocollo integrato alla luce dei dati emersi e degli eventuali indicatori precoci individuati

## VALUTAZIONE DEL CAMPO VISIVO E DELL'ATTENZIONE SPAZIALE E SOSTENUTA IN SOGGETTI CON DISLESSIA EVOLUTIVA

**DR. PAOLO CECCHINI**

e-mail: PAOLO@PP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 1**

Neuropatologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2006

**Polo Scientifico**

Pasian di Prato

### DESCRIZIONE

La dislessia evolutiva è definita come un disturbo specifico di lettura in presenza di un adeguato livello intellettivo, adeguate opportunità di apprendimento e in assenza di deficit neurosensoriali.

Sono state avanzate diverse ipotesi circa l'eziologia della dislessia ma essenzialmente due sono gli approcci che hanno ricevuto maggiore interesse. Il primo approccio sostiene che la dislessia dipende da un disturbo di natura linguistica ipotizzando che il disturbo specifico di lettura abbia origine da un deficit del processamento fonologico e nella memoria (Snowling 2000, Ramus 2003). Recenti ricerche nell'analisi del processo visivo suggeriscono che i soggetti dislessici possano presentare un deficit nella via magnocellulare (Livingstone, Rosen, Drislane e Galaburda, 1991; Lehmkuhle, Garzia, Turner, Hash e Baro, 1993).

La *Via Magnocellulare* ("Via M" o anche definita "sistema transiente"), è deputata al trasporto dell'informazione acromatica per stimoli che sono a bassa luminanza, basso contrasto e ad alta frequenza temporale. Queste cellule rispondono bene a stimoli rappresentati da oggetti di grandi dimensioni e la loro funzione sembra in rapporto all'analisi delle caratteristiche globali degli stimoli e del loro movimento. Sembrerebbe un sistema deputato a fornire risposte su dove si trova un oggetto piuttosto che ad analizzare che cosa esso sia. Lesioni di questo sistema determinano deficit specifici nella percezione del movimento e dei movimenti oculari diretti verso oggetti in movimento.

La *Via Parvocellulare* ("Via P" o anche definita "sistema sostenuto") processa l'informazione cromatica ed è più sensibile alle alte frequenze

spaziali mentre risulta poco sensibile al basso contrasto, a bassi livelli di luminanza e alle alte frequenze temporali. Si ritiene che la loro funzione sia legata all'analisi dei dettagli dell'immagine visiva, alla determinazione delle forme tramite l'analisi dei contorni degli oggetti risultando essenziale per l'osservazione dei particolari degli oggetti immobili. Il sistema sembra deputato in maggior misura a vedere che cosa è un oggetto piuttosto a vedere dove esso si trovi. Lesioni di questo sistema determinano difficoltà nel riconoscimento degli oggetti.

Evidenze a favore di un deficit nel sistema transiente magnocellulare derivano da valutazioni del sistema visivo, sia a livello psicofisico sia elettrofisiologico.

Studi psicofisici che hanno investigato la sensibilità al contrasto (aspetto analizzato dalla Via M) in soggetti con dislessia, sia adulti sia di età compresa tra gli 8 e 14 anni, hanno osservato una ridotta sensibilità per basse frequenze spaziali (Lovegrove et al., 1980; Martin e Lovegrove, 1984; Demb, Boynton, Best e Heeger, 1998). Test psicofisici per valutare la sensibilità al movimento, (aspetto processato dalla Via M) utilizzando punti luminosi in movimento, dimostrano una peggiore percezione del movimento in dislessici sia adulti sia bambini (Cornelissen, 1993). Altri lavori, utilizzando i potenziali evocati visivi (PEV), hanno trovato nei soggetti dislessici una ridotta ampiezza per stimoli a basso contrasto e alta frequenza temporale. Indagini post-mortem in cinque soggetti dislessici hanno evidenziato che i neuroni degli strati magnocellulari del corpo genicolato laterale apparivano essere meno numerosi e disorganizzati (Greatrex JC, Drasdo N, 1995).

Recenti studi non hanno trovato analoghe anomalie nella via visiva magnocellulare in soggetti dislessici adulti valutando le risposte elettrofisiologiche (Poterziali Evocati Visivi - PEV) elicitate da stimoli a basso contrasto e ad alta frequenza temporale (Victor Conte, Burton e Nass, 1993; Johannes et al., 1996).

Una possibile ragione per tali contraddittorie scoperte risiede nel campione di soggetti esaminati. Spesso gli studi, infatti, non tengono conto dei diversi sottotipi di dislessia che possono essere in relazione con differenti correlati elettropsicofisiologici e presentano criteri di inclusione ed esclusione tra loro dissimili (Borsting E. Ridder et al., 1997).

Studi di Facoetti et al. (2000) indicano che la distribuzione delle risorse attenzionali, misurata attraverso i tempi di reazioni nel detenere uno sti-

molo presentato a diverse distanze dalla fovea, differisce in maniera significativa tra i soggetti normolettori e i soggetti dislessici. I bambini dislessici non presentano l'effetto eccentricità dello stimolo come i normali in quanto mostrano una distribuzione diffusa dell'attenzione visiva spaziale all'interno del campo visivo per cui stimoli provenienti dalla periferia intervengono al pari di uno stimolo foveale sulla percezione finale (Facoetti e Molteni, 2001; Facoetti e Turatto, 2000; Facoetti et al., 2000).

La causa di questo disordine selettivo a livello di attenzione spaziale potrebbe dipendere dall'attività del lobo parietale posteriore che rappresenta la principale afferenza del sistema magnocellulare.

Recenti ricerche sull'attenzione visiva hanno determinato che il sistema visivo-attentivo transiente è dominato dalla via M. La componente M del sistema visivo proietta nella corteccia parietale posteriore che è coinvolta nella distribuzione delle risorse attenzionali visive. Durante la lettura di un testo il sistema visivo è bombardato da una quantità di informazioni e compito dell'attenzione visiva spaziale è quello di selezionare le informazioni rilevanti ed escludere gli elementi irrilevanti. Alcuni studi (Auguste et al. 1990; Ackerman et al. 1990) sembrano dimostrare l'esistenza di uno specifico disturbo attentivo nella dislessia. Casco et al. (1998) osservano che bambini con scarsa prestazione in compiti visivi mostravano ridotta velocità e correttezza nella lettura imputabile ad un deficit nell'attenzione visiva selettiva. Geiger e collaboratori (1987; 1994) riportano una difficoltà nei bambini dislessici nel sopprimere l'informazione proveniente dalla periferia del campo visivo che potrebbe causare un deficit nella lettura.

### Risultati e prodotti conseguiti nel 1° anno di ricerca

Il campione analizzato era composto da 19 soggetti dislessici e 27 normolettori, la cui età media era rispettivamente di 126.68 mesi (DS 27.44) e 126.74 mesi (DS 21.78).

Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa nei due campioni per quanto riguarda l'età e l'acuità visiva ( $P > 0.05$ ).

I bambini dislessici presentavano un QI totale di 105,5, QI verbale di 100,14 e QI performance di 110,43. I bambini normolettori avevano un'intelligenza nella media, misurata attraverso tre subtest della WISC-R (Wechsler 1974): Vocabolario (punteggio z: 14), Comprensione (punteggio z: 10,6) e Disegno con cubi (punteggio z: 13,6).

Sono stati calcolati i valori medi e le deviazioni standard della media dei due occhi utilizzando il Frequency Doubling Perimetry. I parametri valutati sono stati i seguenti:

- a. Mean Deviation (MD): difetto medio, espresso in decibel. Fornisce un'indicazione della soglia di sensibilità globale.
- b. Pattern Standard Deviation (PSD): espresso in decibel. Fornisce un'indicazione sui difetti localizzati.

Attraverso l'Ophthimus Hi-Pass Resolution Perimetry o Ring Perimetry sono stati valutati i seguenti parametri:

- a. Global Deviation (GD) difetto medio, espresso in decibel. Fornisce un'indicazione della soglia di sensibilità globale.
- b. Local Deviation (LD) deviazione locale, espressa in decibel. Fornisce indicazione sui difetti localizzati.

I valori medi e le deviazioni standard della media dei due occhi nei due gruppi, valutati con l'Ophthimus High-Pass Resolution Perimetry erano i seguenti: campione dislessici (GD media 0.80, DS 1.44; LD media 0.98, DS 0.21); campione normolettori (GD media 0.92, DS 0.81; LD media 0.88, DS 0.18).

I valori medi e le deviazioni standard della media dei due occhi riscontrati nei due gruppi, valutati con il Frequency Doubling Perimetry, sono stati i seguenti: campione dislessici (MD media -3.55, DS 3.76; PSD media 3.90, DS 0.89); campione normolettori (MD media -0.71, DS 2.49; PSD media 3.15, DS 0.49).

I risultati dell'analisi statistica hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi, totalmente a carico della via magnocellulare. Gli indici perimetrici MD e PSD, espressione della stimolazione elettiva della via magnocellulare, sono risultati statisticamente peggiori nei soggetti dislessici, mentre non si sono osservate differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda l'High Pass Resolution Perimetry, espressione dell'attività della via parvocellulare.

Il campione dei bambini dislessici è stato suddiviso in sottotipi di dislessia utilizzando come parametro l'accuratezza alla prova 5 (lettura non parole) della "Batteria della valutazione della dislessia e della disortografia evolutiva" di Sartori, Job e Tressoldi (1995). Era classificato dislessico fonologico un bambino la cui prestazione alla prova 5, in termini di accuratezza della lettura, era uguale o inferiore a 1.5 DS (Facoetti et al. in press). Il campione è stato così suddiviso: 8 dislessici fo-

nologici, 11 dislessici non fonologici.

Confrontando i valori dell'MD tra dislessici fonologici (media  $-5.02$ , DS  $4.06$ ) e normolettori (media  $-0.71$ , DS  $2.49$ ) si è osservata una differenza significativa ( $p < 0.05$ ) che indica una sensibilità peggiore nei dislessici fonologici rispetto ai normali, differenza che non appare dal confronto tra dislessici non fonologici (media  $-2.48$ , DS  $3.29$ ) e normolettori (media  $-0.71$ , DS  $2.49$ ).

In termini di valori medi dell'MD, si è osservata una performance nettamente peggiore nei bambini con dislessia fonologica (media  $-5.02$ , DS  $4.06$ ) rispetto ai bambini con dislessia non fonologica (media  $-2.48$ , DS  $3.29$ ). All'analisi statistica non sono emerse, tuttavia, differenze statisticamente significative ( $p = 0.08$ ) tra questi due sottogruppi. Dai risultati sopra citati emerge un'ampia variabilità nel campione dei soggetti dislessici per quanto riguarda il valore medio MD. Questa ampia variabilità potrebbe essere imputata ad una difficoltà attentiva che impedirebbe ai soggetti dislessici di mantenere l'attenzione sul target per tutta la durata del test.

Risulta quindi interessante verificare se vi sia una correlazione tra le performance attentive e le prestazioni all'FDT Perimetry. Nell'eventualità di una correlazione positiva, il dato farebbe deporre per un deficit attentivo, in caso contrario si potrebbe propendere per un selettivo deficit della via Magnocellulare.

### Attività previste

#### Materiali e Metodi

Saranno richiamati i soggetti valutati durante la ricerca 2005. In aggiunta verranno selezionati altri bambini dislessici afferenti al Centro La Nostra Famiglia di San Vito al Tagliamento (PN).

I criteri di inclusione dei soggetti del campione normolettori sono i seguenti:

- Livello di funzionamento intellettivo nella norma;
- Visus naturale o corretto  $\geq 1.0$ ;
- Assenza di patologie oculari attuali o pregresse (interventi per strabismo che possono inficiare il valore dei potenziali visivi e dello studio della motilità oculare).

#### Campione

Il campione dei dislessici presenta le seguenti caratteristiche:

- Livello di funzionamento intellettivo superiore a 85;
- Visus naturale o corretto  $\geq 1.0$ ;
- Assenza di diagnosi di deficit attentivo con o senza iperattività;

- Assenza di diagnosi attuale di Disturbo Specifico del Linguaggio.

#### Procedura

L'intero campione verrà sottoposto ad una valutazione dell'attenzione sostenuta e spaziale attraverso il test di orientamento implicito dell'attenzione visiva (Posner, 1980).

Il compito consiste nel rilevare il più velocemente possibile (i.e., tempi di reazione semplici, TR) un segnale bersaglio preceduto da un segnale indizio. Il segnale indizio può essere valido (i.e., indizio nella stessa posizione del bersaglio) oppure invalido (i.e., indizio nella posizione opposta rispetto al bersaglio). La differenza nei TR tra prove invalide vs. valide misura l'effetto di orientamento dell'attenzione spaziale

### Obiettivi della ricerca

Da quanto accennato nella discussione dei risultati preliminari e vista l'ampia dispersione emersa nel campione dei dislessici soprattutto nel FDT Perimetry (via M), si vuole approfondire:

- l'attenzione spaziale e sostenuta in tutto il campione considerato;
- l'esistenza di una correlazione tra attenzione spaziale-sostenuta e attivazione della via M, valutata tramite il Frequency Doubling Perimetry;
- l'esistenza di una correlazione tra diversi sottotipi di dislessia e prestazione alle valutazioni perimetriche/attentive.

### Attività previste

Fasi di reclutamento: all'inizio si provvederà a richiamare i pazienti invitandoli a partecipare alla ricerca.

Fase di raccolta dati: successivamente si testeranno i pazienti con la procedura sopra indicata.

Fase di analisi dei dati: in seguito si codificheranno i dati ottenuti e si analizzeranno dal punto di vista statistico.

Fase finale: nella restante parte dell'anno, si stenderà la relazione finale e ci si dedicherà alla preparazione di manoscritti da sottoporre a pubblicazione su una rivista indicizzata.

## LA PENALIZZAZIONE TERAPEUTICA DELL'ARTO CONSERVATO (CONSTRAINT INDUCED THERAPY)

**DR.SSA ANNA CARLA TURCONI**

e-mail: ANNACARLA.TURCONI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Centri di Riabilitazione La Nostra Famiglia Sedi di: Como, Carate Brianza, Pieve di Soligo, Padova, Treviso, Udine, Pasian di Prato, Vicenza, Ostuni.

### DESCRIZIONE

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

L'utilizzo di tecniche basate sulla penalizzazione dell'arto superiore in pazienti con danno cerebrale acquisito e in particolare in bambini affetti da paralisi cerebrale infantile deriva il suo razionale da ricerche di base sul comportamento dei primati (Taub):

- dopo deafferentazione chirurgica di un arto superiore, la scimmia non può più usare l'arto nelle attività spontanee (Knapp, Mott, Twitchell), ma si può indurla ad usarlo se viene limitato l'uso dell'arto controlaterale sano (Knapp, Taub). Se la restrizione viene conservata e prolungata nel tempo, questa capacità diviene permanente
- molte linee di evidenza suggeriscono che il non uso di un arto deafferentato è un fenomeno che induce un meccanismo condizionato di soppressione del movimento (Taub)
- la fase di non uso è dovuta al concorso di molti fattori quali: la frustrazione nell'uso dell'arto lesa, il rinforzo all'uso dell'arto sano, la riorganizzazione neurologica: questa fase produce una serie di eventi a spirale e viene chiamata apprendimento al non uso (Liepert, Catania)
- non ci sono stati studi appropriati per definire completamente quali di questi meccanismi pos-

sano essere implicati anche nel comportamento umano ma si può presumere che essi siano rilevanti anche in situazioni patologiche come lo stroke o il trauma cranico (Taub). Certamente il meccanismo di apprendimento del non uso è presente (Sterr) e persiste anche quando il paziente recupera un uso parziale dell'arto lesa - tuttavia questo modello deve prevedere per l'uomo delle varianti importanti come i fattori psicosociali e la comorbidità.

L'utilizzo e l'efficacia della CTI nel bambino con Paralisi Cerebrale Infantile sono stati dimostrati in recentissimi studi:

- Taub (2004): 18 ragazzi con emiparesi
- Willis (2002): 12 bambini con emiparesi
- Eliasson (2003): 9 ragazzi con emiparesi

Tutti i risultati depongono per un incremento dell'uso dell'arto lesa ma la metodologia utilizzata è molto variabile sia nei tempi sia nelle proposte di trattamento.

### Attività previste

La costrizione verrà effettuata tramite splint in materiale termoplastico mano-polso-avambraccio (in asse) e fissaggio con bendatura (facile da mettere e togliere anche per la famiglia).

La costrizione verrà mantenuta per 3 ore al giorno per 7 giorni la settimana.

Gli accessi alla terapia (intensiva) ai centri saranno di 3 volte la settimana per 3 ore di cui 1 e 30 di terapia, 1 e 30 di lavoro per la famiglia.

Il periodo complessivo della CTI sarà di 2 mesi.

### Protocollo di valutazione

1. raccolta di dati anamnestici e clinici indicanti, oltre che i principali dati anagrafici, il livello di gravità di compromissione motoria, la presenza di disabilità aggiuntive e/o patologie completanti il quadro di comorbidità complessivo;
2. esame obiettivo e neurologico completo, comprendente anche la valutazione della stereognosi e dello schema corporeo, attraverso il Test della Figura Umana a partire dai 4 anni;
3. valutazione delle abilità motorie globali con la *Gross Motor Function Measure* (GMFM);
4. scala di sviluppo o valutazione di livello con la scala *Griffith24* fino ai 5 anni e successivamente con le scale *Wechsler (Wipps)25* fino a 7 anni e *Wisch-R26* successivamente);
5. valutazione della funzionalità dell'arto superiore attraverso la scala *Quality of Upper Extremity Skills Test* (QUEST) e la scala Besta;
6. scala di stress familiare (*Parenting Stress Index*) e scala delle autonomie redatta dall'Istituto Besta e compilata da parte dei genitori.

Successivamente alla fine del trattamento e a 3, 6, 12 mesi dal suo termine verranno svolte le seguenti valutazioni:

1. esame obiettivo e neurologico completo, comprendente anche la valutazione della stereognosi e dello schema corporeo, attraverso il Test della Figura Umana a partire dai 4 anni;
2. valutazione delle abilità motorie globali con la *Gross Motor Function Measure* (GMFM);
3. a 12 mesi dalla fine del trattamento, scala di sviluppo o valutazione di livello con la scala *Griffith* fino ai 5 anni e successivamente con le scale *Wechsler26*, *Wipps25* fino a 7 anni e *Wisch-R* successivamente;
4. valutazione della funzionalità dell'arto superiore attraverso la scala *Quality of Upper Extremity Skills Test* (QUEST) e la scala Besta;
5. scala delle autonomie redatta dall'Istituto Besta e compilata da parte dei genitori;
6. scala di valutazione del comportamento del bambino (*Child Behavior Checklist*).

## VALUTAZIONE E RIABILITAZIONE DELLE FUNZIONI ESECUTIVE IN GIOVANI ADULTI CON TRAUMI CRANICI. STUDIO SULLA GENERALIZZAZIONE DI UN TRAINING COGNITIVO SPECIFICO

**DR. ALEC VESTRI**

e-mail: ALEC.VESTRI@PS.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Conegliano

### Collaborazioni

Dipartimento di Psicologia Generale – Università di Padova (F. Stablum)

### DESCRIZIONE

Si vuole studiare il cambiamento indotto da un training riabilitativo specifico per una funzione cognitiva di tipo esecutivo. In particolare, sulla base di letteratura esistente, è noto come alterazioni delle funzioni esecutive limitino l'autonomia delle persone anche nelle attività quotidiane: deficit di pianificazione, progettualità e inerzia cognitiva impediscono una piena funzionalità. L'abilità esecutiva in oggetto di studio è la capacità di alternare due compiti distinti senza rallentare troppo i tempi di esecuzione e senza commettere eccessivi errori. Lo scopo è, attraverso un training specifico elaborato ed eseguito al computer, migliorare anche nelle prestazioni di vita quotidiana.

Il software del training riabilitativo al computer è stato elaborato grazie alla professoressa Franca Stablum nei laboratori del Dipartimento di Psicologia Generale: è basato sul paradigma del cambio di compito (per una rassegna si veda Monsell, 2003). Cambiare compito ha un costo cognitivo. Se si stanno svolgendo due compiti (A e B), non contemporaneamente, ma con qualche forma di alternanza, si è più lenti a rispondere ad un item del compito A, se è preceduto da un item del compito B, rispetto a quando è preceduto da un item del compito A. Il paradigma del cambio di compito si basa generalmente su serie alternate: ogni blocco include prove di compiti diversi, disposte in

sequenze di  $n$  item dello stesso compito, e quindi permette di comparare item "di cambio di compito" versus item "che non richiedono un cambio di compito" entro uno stesso blocco di stimoli. La differenza nei tempi di reazione fra il primo ed il secondo stimolo della sequenza è detto "costo del cambio di compito". Si assume che questo costo dipenda da un processo di riconfigurazione del "task-set". Il cambio di compito può essere generato internamente (dipende dalla nostra "volontà") o esternamente (avviene come risposta ad un segnale esterno; ad esempio la comparsa dello stimolo). Il costo del cambio di compito è piccolo quando i soggetti possono prepararsi per il nuovo compito (cambio di compito endogeno), mentre il costo è molto maggiore quando la preparazione non è possibile (cambio di compito esogeno). Una domanda rilevante è la seguente: i pazienti con trauma cranico sono capaci di prepararsi, in modo endogeno, per il cambio di compito? Ricerche precedenti hanno evidenziato che il costo del cambio di compito è maggiore nei pazienti con trauma cranico grave rispetto ai soggetti di controllo, ma si è richiesto solo un cambio di compito endogeno (Stablum et al., 1994; Stablum, Umiltà, Mazzoldi, Pastore, Magon, inviato). Sono state usate serie da 2 e da 10 item. Il cambio di compito nelle serie da 2 può essere generato internamente, mentre nelle serie da 10 deve essere generato esternamente (Monsell, 2003). I pazienti con trauma cranico grave avevano un costo del cambio di compito nelle serie da 2 significativamente maggiore rispetto ai soggetti di controllo, mentre nelle serie da 10 il costo era approssimativamente lo stesso. La ricerca con soggetti non patologici ha dimostrato che se si forniscono informazioni sufficienti sul compito che dovrà essere eseguito e se il tempo permette di prepararsi per il cambio di compito, generalmente si riduce il costo del cambio di compito. La preparazione non elimina completamente il costo. La riduzione del costo sembra raggiungere un asintoto, "costo residuo", dopo 600 millisecondi di preparazione. Pertanto una domanda pertinente è la seguente: i pazienti con trauma cranico grave hanno bisogno di più tempo, rispetto ai controlli, per prepararsi per il cambio di compito? Questa ricerca intende prima di tutto valutare e riabilitare le abilità di cambio di compito dei pazienti con trauma cranico. Occorre inoltre verificare che la generalizzazione dell'effetto abbia luogo anche in aspetti di tipo occupazionale. Se è vero infatti che la riabilitazione cognitiva risulta efficace nelle misure dei test neuropsicologici, è anche vero che il risultato ultimo deve riguardare un

miglioramento delle condizioni di vita delle persone e in generale l'autonomia nelle attività di vita quotidiana. In particolare, dato il tipo di abilità cognitiva studiata, ci si aspetta che alcune abilità strumentali e occupazionali siano migliorate in maniera significativa. Per valutare questi aspetti, in continuità con la riabilitazione cognitiva, si vuole verificare sia il grado di autonomia della persona sia l'efficacia del training in alcuni compiti alternati di tipo occupazionale. Per valutare l'autonomia della persona, Lindeboom et al. (2003) hanno analizzato 27 scale di misura delle Activities of Daily Living (ADL). Tra queste, hanno individuato la Newcastle Independence Assessment Form Research (NIAF-R, Semlyen et al., 1997; Semlyen e Barnes, 1998) come scala ottimale per la valutazione della persona che ha subito trauma cranico. Non esiste una versione italiana della NIAF-R. Si propone quindi di tradurre e adattare la NIAF-R in italiano. Le abilità strumentali e occupazionali verranno valutate secondo una metodologia del tutto simile a quella utilizzata nei training cognitivi. Saranno pertanto somministrate delle prove specifiche sia prima che dopo il training cognitivo.

### Metodologia

I partecipanti sono tutti valutati su 3 livelli: i test cognitivi, le prove di tipo occupazionale e la scala sulle autonomie nella vita quotidiana. I partecipanti con deficit cognitivi seguono i normali trattamenti riabilitativi, sia cognitivi che occupazionali, non specifici per il compito alternato. Solo un gruppo verrà trattato con un training specifico e i risultati, nei termini di generalizzazione delle abilità, verranno confrontati tra le valutazioni sui 3 livelli. I criteri di inclusione dei due gruppi di utenti con lesioni cerebrali riguardano: fascia d'età (ristretta ai giovani adulti), gravità del deficit cognitivo (maggiore di 5 nella scala LCF), non presenza di plegie o paresi che pregiudichino i compiti occupazionali previsti, non presenza di gravi deficit sensoriali, presenza di deficit nei test attentivi doppio compito e più in generale nelle funzioni esecutive.

Per valutare i deficit cognitivi e in particolare il deficit nell'alternanza dei compiti, verrà somministrata una batteria di test tra i quali in particolare il "Paced Auditory Serial Addition Task" (pasat; Gronwall, 1977), il Behavioural Assessment of the Dysexecutive Syndrome (bads; Wilson, Alderman, Burgess, Emslie, Evans, 1996), e un paradigma di doppio compito (Umiltà, Nicoletti, Simion, Tagliabue, Bagnara, 1992). Il pasat misura la velocità dei processi di controllo. Il BADS misura i deficit esecutivi, ed il paradigma di doppio compito esamina una

componente esecutiva specifica, e cioè l'abilità di coordinare due azioni. Prima dei trattamenti riabilitativi verrà applicata anche la NIAF-R. Le prove ecologiche di tipo occupazionale saranno strutturate come le prove del training cognitivo e saranno costituite da 3 situazioni diverse nelle quali la persona deve alternare dei compiti in maniera endogena (blocchi da 2 item) o in maniera esogena (blocchi da 10 item). Le situazioni riguarderanno: attività di tipo grafico-pittorico (es: disegno e pittura di elementi semplici ad un colore vs disegno e pittura di elementi differenti a più colori), attività del laboratorio di falegnameria-assemblaggio (taglio e composizione di pezzi accoppiati vs taglio e assemblaggio molteplici elementi di forma e incastro differente), attività di tipo domestico (es.: lavaggio e asciugatura di posate vs pulizia complessa di molteplici stoviglie). Vi saranno griglie di osservazione e le variabili dipendenti saranno il numero di errori nelle alternanze e il tempo di esecuzione. Ci aspettiamo che il costo del cambio di compito sia maggiore per i pazienti con trauma cranico rispetto a soggetti di controllo, ma solo quando è richiesto un cambio di compito endogeno. Inoltre ci aspettiamo che i pazienti abbiano bisogno di più tempo, rispetto ai soggetti di controllo, per riconfigurare il "task-set". Il training cognitivo specifico di trattamento consisterà di 10 sessioni in cui sarà concesso più tempo per prepararsi al cambio di compito. Per verificare la specificità del trattamento saranno incluse sia una condizione che richiede un cambio di compito endogeno sia una condizione che richiede un cambio di compito esogeno. Ci si attende che nel retest ci sia una significativa riduzione del costo di cambio di compito endogeno rispetto al test. Questa riduzione inoltre dovrebbe essere presente anche nella sessione di follow-up condotta dopo sei mesi. Non ci si attende una riduzione del costo di cambio di compito esogeno, mentre ci dovrebbero essere delle indicazioni che l'effetto benefico del trattamento generalizza ad altre funzioni esecutive. L'effetto di generalizzazione verrà verificato su ulteriori tre livelli: i test neuropsicologici, la verifica delle prove ecologiche di tipo occupazionale dopo il training cognitivo specifico e la rivalutazione a distanza di 6 mesi, comprensiva della NIAF-R.

## Procedura

### Prima fase:

- eseguire prove sui compiti singoli (finché viene raggiunta una buona accuratezza);
- eseguire la prima valutazione pre-training sui compiti shift (2 sessioni valide per ogni tipo di

compito shift – Sessione 1-2); se è necessario somministrare delle prove preliminari sui compiti shift usare sessione 99;

- inviare tutti i dati all'Università di Padova per valutazione di idoneità del soggetto;
- somministrare BADS (se non è già stata fatta), doppio compito (sessione 1) e pasat.

### Seconda fase:

Se da parte dell'Università di Padova c'è parere positivo, eseguire la valutazione delle prove ecologiche; dopo 2 settimane dalla prima valutazione sui compiti shift, eseguire la seconda valutazione pre-training sui compiti shift (2 sessioni valide per ogni tipo di compito shift – sessione 3-4).

### Terza fase:

Cominciare il training: 3 sedute la settimana, per 45' l'una, per 3 settimane. Totale: 9 sedute. Fare 5 sessioni di random-training a seduta.

### Quarta fase:

- eseguire la valutazione post-training sui compiti shift (2 sessioni valide per ogni tipo di compito shift – sessione 5-6);
- eseguire la seconda valutazione del doppio compito (sessione 2);
- eseguire la seconda valutazione (post-training) delle prove ecologiche.

### Follow up:

- a 6 mesi dalla valutazione post-training sui compiti shift.
- eseguire la seconda valutazione post-training sui compiti shift (2 sessioni valide per ogni tipo di compito shift – sessione 7-8);
- somministrare BADS, pasat e terza valutazione del doppio compito (sessione 3).
- eseguire la terza valutazione (post-training) delle prove ecologiche.

## Risultati e prodotti conseguiti

### Correlazione NIAF-FIM

I dati descrittivi raccolti relativi alla correlazione NIAF-FIM si riassumono schematicamente nei punti seguenti:

- numero soggetti: 60 (44 maschi e 16 femmine).
- tipi di patologia: trauma cranico (29 soggetti), accidente vascolare ischemico (7 soggetti), accidente vascolare emorragico (14 soggetti), anossie (5 soggetti), altro (tumori, infezioni, intossicazioni, ictus multipli: 5 soggetti).
- età al momento dell'evento lesivo: minimo 15 anni, massimo 73 anni; fasce per età al momento della lesione: inferiore ai 18 anni = 2 soggetti, tra 18 e 65 anni: 55 soggetti, maggiori di 65 anni:

3 soggetti; età al momento della valutazione: minimo 16 anni, massimo 74 anni.

- mesi trascorsi tra evento lesivo e valutazione: minimo 2, massimo 109; fasce per mesi tra evento lesivo e valutazione: inferiore a 12 mesi = 27 soggetti, da 12 a 24 mesi = 13 soggetti, oltre 24 mesi = 20 soggetti.

È stata effettuata un'analisi inferenziale con il Kappa di Cohen (test unilaterale) per valutare il grado di correlazione item per item tra i due strumenti su tutti i pazienti. Dal confronto globale, su 26 item confrontati, 12 hanno un livello di correlazione sostanziale, 11 moderata e 3 mediocri. Dunque l'89% degli item ha una correlazione che va da moderata a sostanziale. Il risultato è buono ma non ottimale: non replica pienamente i dati originali che, tuttavia sono stati ottenuti con un campione più ridotto, più omogeneo per patologia e con meno varianza per distanza dalla lesione. Ulteriori analisi verranno condotte cercando di controllare meglio la dimensione temporale (fattore a 4 livelli) e le diverse patologie (fattore a 3 livelli).

### **Training riabilitativi sulle funzioni esecutive**

Allo stato attuale l'intero protocollo di valutazione e riabilitazione è stato applicato a 3 pazienti del gruppo sperimentale.

Più sotto sono indicati i livelli di accuratezza e i tempi di risposta dei tre soggetti nel compito computerizzato, nella valutazione iniziale e nella valutazione finale successiva al training effettuato.

È specificata la prestazione nelle tre diverse versioni del paradigma di doppio compito:

- Shift 10: paradigma di cambio di compito in cui i due compiti si alternano ogni 10 stimoli (cambio di compito esogeno);
- Shift 2: paradigma di cambio di compito in cui i due compiti si alternano ogni 2 stimoli (cambio di compito endogeno);
- Shift random: paradigma di cambio di compito in cui i due compiti si alternano in modo casuale, ovvero ogni 2,3 o 4 stimoli (cambio di compito esogeno).

#### *SOGGETTO 1*

Per quanto riguarda l'accuratezza, il soggetto 1 nella valutazione pre-training ha un'alta percentuale di errore, che si riduce in modo significativo in seguito al training. La riduzione della percentuale di errori (riduzione media: 30.18% nel complesso delle 3 prove):

- Shift 10: riduzione del 30.55% degli errori;
- Shift 2: riduzione del 26.07% degli errori;

Shift random: riduzione del 33.92% degli errori; Miglioramento nei tempi di risposta (riduzione media di 108 msec nelle tre prove):

- Shift 10: 193.5 msec.
- Shift 2: 81.5 msec.
- Shift random: 49 msec.

#### *SOGGETTO 2*

Vi è una buona accuratezza già nella valutazione pre-training. Si verifica comunque un ulteriore miglioramento nell'accuratezza in seguito al training effettuato. Riduzione della percentuale di errori (riduzione media: 2.21% nel complesso delle 3 prove):

- Shift 10: riduzione del 2.99 % degli errori;
- Shift 2: riduzione del 3.62 % degli errori;
- Shift random: riduzione dello 0.01% degli errori;
- Miglioramento nei tempi di risposta (riduzione media di 120.5 msec nel complesso delle tre prove):
- Shift 10: riduzione 95 msec.
- Shift 2: riduzione 126.5 msec.
- Shift random: riduzione 140 msec.

#### *SOGGETTO 3*

Per quanto riguarda l'accuratezza, nella valutazione pre-training vi è una percentuale di errori abbastanza alta, che si riduce e si stabilizza sul 3% di errori in seguito al training effettuato.

Riduzione della percentuale di errori (riduzione media del 15.10% nel complesso delle tre prove):

- Shift 10: riduzione del 20.07% degli errori;
- Shift 2: riduzione del 9.03% degli errori;
- Shift random: riduzione del 6.19% degli errori.
- Miglioramento nei tempi di risposta (riduzione media di 247.7 msec. nel complesso delle tre prove):
- Shift 10: riduzione 148.7 msec.
- Shift 2: riduzione 468 msec.
- Shift random: riduzione 126.4 msec.

Nel complesso, quindi, il training specifico sul cambio di compito effettuato dai soggetti testati finora, ha degli effetti rilevabili, sia in termini di una riduzione della percentuale di errore durante le prove (una riduzione media del 15.8%, nel complesso delle prove e dei soggetti testati), sia in termini di riduzione generale dei tempi di risposta (una riduzione media di 158.7 msec.) nel complesso delle prove e dei soggetti testati.

### **Descrizione della procedura seguita**

È stata richiesta ed ottenuta la concessione di tradurre ed adattare all'italiano lo strumento Newcastle Assessment Form – R dagli autori; lo strumento è stato poi tradotto ed adattato in italiano con la procedura della back-translation. Successivamente si è proceduto

all'applicazione coordinata tra diversi raters di FIM e NIAF su 60 pazienti afferiti al Centro, e alla somministrazione agli stessi soggetti del protocollo interno di valutazione in terapia occupazionale.

È stato raggiunto un accordo con l'Università di Padova circa le procedure e gli strumenti da utilizzare per la ricerca, che prevedono l'uso di un software creato nel dipartimento di psicologia generale. Tale software presenta un paradigma di cambio di compito, con tre diverse versioni del paradigma, in cui i due compiti alternati si alternano ogni 2 stimoli, ogni 10 stimoli, e in modo casuale (versione random).

È stata messa a punto l'intera procedura di valutazione ecologica delle stesse abilità sottostanti al software.

È stato messo a punto l'intero protocollo da applicare ai pazienti appartenenti al gruppo sperimentale e al gruppo di controllo.

Sono stati completati valutazione e riabilitazione di 3 dei 10 soggetti previsti.

#### Attività previste

Perfezionamento e completamento analisi statistiche di correlazione su 3 strumenti di valutazione di abilità occupazionale e funzionali: NIAF-FIM-Protocollo di terapia occupazionale. Può essere opportuno allargare ancora il campione, ma non è obiettivo primario al momento.

Incremento del numero dei soggetti sperimentali che seguono l'intera procedura di valutazione e riabilitazione da 3 fino ai 10 previsti: finora su 22 soggetti solo 3 rientravano nei criteri di inclusione (molti per gravità o per presenza di sintomi comportamentali). Attualmente sono in lista di attesa per valutare se rientrano nei criteri di inclusione del test di ingresso altri 20 soggetti con deficit lievi e senza disturbi comportamentali.

Valutazione con gli strumenti individuati nel protocollo di un campione di soggetti patologici di controllo (pareggiato per età, gravità dei deficit e disturbo specifico iniziale) e del campione di soggetti senza patologie.

## DISFAGIA E PROBLEMI CORRELATI IN BAMBINI CON PATOLOGIA NEUROLOGICA: DELINEAZIONE DI PROTOCOLLI DI VALUTAZIONE E TRATTAMENTO

**DR. PAOLO DUCOLIN**

e-mail: PAOLO.DUCOLIN@CN.LNF.IT

#### Linea di Ricerca n. 2

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

#### Tipo di Ricerca

Corrente

#### Periodo di svolgimento

2006

#### Polo Scientifico

Conegliano

#### Collaborazioni

Centri La Nostra Famiglia del Veneto  
ULSS 9 di Treviso Reparto Chirurgia Pediatrica dell'Ospedale di Treviso

#### DESCRIZIONE

L'eterogeneità dei comportamenti nei processi di diagnosi e nella terapia delle turbe della deglutizione nei bambini con patologia neurologica sia centrale che periferica ha indotto ad una verifica delle opzioni diagnostiche e di trattamento ed alla ricerca di una unitarietà delle stesse.

#### Risultati e prodotti conseguiti nel primo anno di ricerca

Elaborazione di una scheda per la raccolta di dati relativi alla disfagia nei singoli pazienti ed alla sua somministrazione ai tempi 0 – 6 mesi – 12 mesi. Il reclutamento e l'utilizzo dei questionari nei diversi Centri de La Nostra Famiglia del Veneto ha portato a raccogliere circa una quarantina di casi. Altra casistica è stata raccolta al di fuori dei Centri de La Nostra Famiglia ed è affidata alla Unità Operativa di Chirurgia Pediatrica dell'Ospedale di Treviso.

#### Attività previste

Nel corso dei mesi di aprile-maggio verranno somministrati i protocolli relativi al tempo 6 mesi. Nei mesi di ottobre-novembre si prevede di completare la raccolta dei questionari e di giungere ad una valutazione dei dati ottenuti e conseguente comunicazione dei risultati della ricerca entro fine anno.

## **PATTERN DI ATTIVAZIONE CEREBRALE ALLA RISONANZA MAGNETICA (fRMN) IN PAZIENTI AFFETTI DA DISTROFIA MUSCOLARE: POSSIBILE RUOLO DELLA DISTROFINA CEREBRALE NEI PROCESSI COGNITIVI**

**DR.SSA ALESSANDRA BARDONI**

e-mail: ALESSANDRA.BARDONI@BP.LNF.IT

### **Linea di Ricerca n. 2**

Riabilitazione neuromotoria e neuropsicologia funzionale

### **Tipo di Ricerca**

Corrente

### **Periodo di svolgimento**

2006

### **Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### **Collaborazioni**

IRCCS "E Medea" - Bosisio Parini (A. Bardoni, MG. D'Angelo, S. Galbiati, F. Civati, E. Castelli, A. Turconi)

IRCCS Ospedale Maggiore di Milano- Reparto di Neuroradiologia (A. Costa, V. Branca)

IRCCS Ospedale Maggiore di Milano- Dipartimento di Neuroscienze (GP. Comi, N. Bresolin)

### **DESCRIZIONE**

Come dimostrato da diversi lavori riportati in letteratura, circa il 30% dei bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne presentano, oltre al severo e progressivo deficit muscolare, anche un modesto ritardo cognitivo. L'assenza di distrofina alla base dell'instabilità della membrana muscolare, potrebbe avere un ruolo anche nello sviluppo del sistema nervoso centrale (come ipotizzato da diversi studi sulle isoforme cerebrali della distrofina Dp71 – Dp140).

Molti studi, condotti anche presso il nostro Istituto, hanno evidenziato una correlazione tra il ritardo mentale e le delezioni distali nel gene della distrofina. Il deficit cognitivo coinvolge prevalentemente l'area linguistica ed implica dei disturbi di apprendimento del bambino, coinvolgenti la sfera della lettura.

Più recentemente, sono stati eseguiti studi di imaging funzionale per valutare l'eventualità della presenza di un'alterazione metabolica in aree cerebrali specifiche. Lee e Coll (2002) hanno dimostrato un ipometabolismo del glucosio nel giro

temporale mediale, nell'uncus e nel cervelletto (aree in cui l'espressione di distrofina è elevata) in un gruppo di bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne con funzioni cognitive borderline. La fMRI è una recente metodica di neuroimaging che permette di visualizzare e localizzare le aree di attivazione cerebrale in seguito ad appropriati compiti (task) ed è per questo motivo uno degli strumenti privilegiati nello studio in vivo dell'organizzazione cerebrale.

In realtà essa non misura direttamente l'attivazione cerebrale ma, grazie all'effetto BOLD, è in grado di identificare le variazioni di segnale legate alle modificazioni del flusso ematico cerebrale che l'attivazione neuronale determina.

Proprio a partire dalle conoscenze neuropatologiche (alcune aree cerebrali risultano più ricche in distrofina di altre) e di metabolismo funzionale già dimostrate in soggetti affetti da distrofia muscolare, ci proponiamo di identificare le aree di attivazione cerebrale alla RMN funzionale durante l'esecuzione di compiti cognitivi specifici e di chiarire pertanto il reale ruolo della distrofina cerebrale nei processi cognitivi.

#### *Risonanza Magnetica Funzionale (fMRI)*

La fMRI è uno degli strumenti di neuroimaging più avanzati, in vivo, per lo studio dell'organizzazione funzionale del cervello umano, ma essa rappresenta solo la tappa finale di un processo di sviluppo tecnologico iniziato più di un secolo fa.

Nel 1973 Lauterbur introdusse la Risonanza Magnetica (RM) che divenne rapidamente lo strumento migliore per lo studio anatomico e per la visualizzazione delle patologie del cervello. Gli studi funzionali mediante RM iniziarono nel 1991, utilizzando un mezzo di contrasto intravascolare (Gd-DTPA) per la determinazione del volume ematico cerebrale (CBV). Fu così possibile visualizzare il funzionamento di singole aree cerebrali mediante le variazioni del CBV indotte localmente dall'attività neuronale.

Tuttavia i mezzi di contrasto esogeni furono ben presto abbandonati in favore dell'evidenza che l'emoglobina poteva essere considerata un contrasto endogeno; Pauling dimostrò la modificazione delle sue proprietà magnetiche in relazione allo stato di ossigenazione.

Nel 1990 Ogawa descrive per la prima volta l'effetto BOLD (Blood Oxygenation Level Dependent contrast) che permette alla RM, attraverso particolari sequenze, di rilevare le variazioni di segnale dipendenti dalla pressione parziale dell'ossigeno nel sangue.

Dato che le variazioni dell'attività neuronale sono

accompagnate da modificazioni locali del consumo di ossigeno, è evidente che una tecnica basata sull'effetto BOLD ha potuto consentire lo studio dell'attività cerebrale attraverso le variazioni indotte dall'attivazione nell'ossigenazione tissutale.

Fondamentale in questa metodica è la deossiemoglobina. In quanto mezzo paramagnetico, la deossiHb aumenta la dispersione di fase degli spin protonici regionali, accelerando così il rilassamento trasversale (T2), in particolare quello non rifocalizzato (T2\*). Tale effetto risulta direttamente proporzionale alla concentrazione della deossiHb ed è maggiore quando essa si trova all'interno dei globuli rossi e dei vasi sanguigni.

L'iniziale aumento della deossiHb determina una riduzione di segnale nelle immagini T2\* pesate, cui fa seguito un incremento del segnale legato alla successiva riduzione della deossiHb.

Alla fine della stimolazione, il flusso ematico regionale (rCBF) si riduce rapidamente riportandosi allo stato basale, mentre la vasodilatazione cerebrale e di conseguenza il volume ematico cerebrale (rCBV) impiegano più tempo a normalizzarsi. Per alcuni istanti si ha perciò un flusso ridotto ed un volume aumentato che determinano un aumento della deossiHb e una riduzione dell'intensità del segnale (post-stimulus undershoot).

Nelle stimolazioni prolungate, invece, si osserva una prima fase di aumento del segnale legato al disaccoppiamento tra estrazione di ossigeno e incremento del flusso, mentre successivamente si raggiunge un equilibrio tra le due componenti che provoca una progressiva riduzione dell'intensità del segnale che inizia dopo 3-5 minuti e raggiunge il valore basale dopo circa 8-12.

Nella genesi dell'"effetto BOLD", oltre alla deossiHb sono importanti altri derivati emoglobinici con proprietà paramagnetiche. La vasodilatazione regionale conseguente all'attivazione neuronale è in gran parte mediata dall'ossido nitrico (NO). Questa molecola è tuttavia poco maneggevole poiché rapidamente diffusibile attraverso l'interstizio e le pareti cellulari ed è in grado di esercitare effetti citotossici come la perossidazione dei lipidi di membrana; per questo motivo essa deve venire rapidamente inattivata dopo la sua liberazione. È proprio l'emoglobina che svolge questo compito di detossificazione legandosi con un'elevatissima affinità all'NO e formando derivati nitrosilati e metaemoglobina (Di Salle 1997). Tutti questi derivati emoglobinici sembrano essere attivi sul segnale RM e contribuiscono, seppure in maniera minoritaria, all'effetto BOLD.

Probabilmente oltre all'"effetto BOLD" altri mecca-

nismi contribuiscono al contrasto endogeno nella fMRI. Uno di questi è l'effetto in-flow che determina variazioni di segnale additive rispetto al BOLD e che può quindi risultare vantaggioso, ma che tuttavia può far perdere risoluzione spaziale alla metodica in quanto non è correlato solo al microcircolo cerebrale, ma anche al flusso nei vasi di calibro maggiore e che può pertanto determinare incrementi del segnale in regioni che si estendono al di là di quelle effettivamente attivate.

Negli studi di fMRI lo scopo principale è quello di evocare risposte neuronali mediante stimoli appropriati che possono spesso richiedere una risposta attiva da parte del soggetto. La presentazione dello stimolo può essere caratterizzata da periodi on/off (modello a blocchi) oppure essere continua (modello parametrico).

Nel primo caso l'attività cerebrale viene evidenziata mediante semplice sottrazione tra periodi di stimolazione e di riposo e questo permette di ottenere informazioni più analitiche sul funzionamento delle singole aree. Nel modello parametrico invece è possibile registrare l'effetto sull'attività neuronale di variazioni continue, quantitative e qualitative dello stimolo ottenendo un "mappaggio" delle risposte corticali.

Le possibilità di ricerca legate all'applicazione della fMRI sono molteplici. Se inizialmente gli studi si sono focalizzati sulle funzioni più semplici (sensoriali e motorie), successivamente l'attenzione si è spostata sull'indagine del comportamento e dei processi cognitivi più complessi.

### Definizione del Protocollo Clinico

Recluteremo, su un'ampia casistica di pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e studiati approfonditamente dal punto di vista cognitivo, 3 pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne e 2 bambini di pari età affetti da un severo disturbo motorio non correlato al deficit di distrofina, affetti da amiotrofia spinale progressiva (SMA).

I bambini affetti da distrofia muscolare devono soddisfare i seguenti criteri diagnostici:

- deficit muscolare progressivo determinante una severa disabilità motoria
- incremento degli enzimi muscolari
- biopsia muscolare con segni di chiara degenerazione muscolare e assenza di immunoreattività per gli anticorpi anti distrofina o delezioni (duplicazioni/mutazioni puntiformi) a livello del gene DMD.

I bambini affetti da Amiotrofia spinale devono

soddisfare i seguenti criteri diagnostici:

- deficit muscolare simmetrico con assenza dei riflessi osteotendinei
- quadro elettromiografico neurogeno in assenza di alterazioni delle velocità di conduzione
- quadro bioptico muscolare con segni neurogeni e/o presenza di delezioni in omozigosi sul gene SMN1.

#### *Criteri di inclusione*

- Consenso informato
- Diagnosi definita di distrofia muscolare di Duchenne (o di Amiotrofia muscolare progressiva)
- Età compresa tra i 8 e 12 anni
- Quoziente intellettivo > 70
- Normali funzioni uditive
- Assenza di grave deficit visivo
- Frequenza a scuola dell'obbligo

#### *Criteri di esclusione*

- Associazione di patologie concomitanti
- Disturbi comportamentali o psichiatrici (problemi emozionali, severa depressione)
- Famiglia di origini non italiane, bilinguismo o parziale conoscenza della lingua italiana

### **Definizione del Protocollo Neuropsicologico**

I giovani pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione cognitiva approfondita che ha guardato con particolare attenzione alle competenze linguistiche ma anche alle funzioni attentive/esecutive, alla memoria e all'apprendimento.

*Le competenze linguistiche* sono state valutate con i seguenti test:

- Storia del nido: il bambino osserva alcune immagini in sequenza e le descrive verbalmente
- Batteria di valutazione del linguaggio dai 4 ai 12 anni (Fabbro F., 1999), composta dai seguenti test:
  - discriminazione uditiva verbale
  - riconoscimento di figure
  - comprensione semantica
  - comprensione sintattica (test Token)
  - comprensione grammaticale
  - ripetizione di frasi
  - denominazione di sostantivi e verbi
  - fluency semantica
- Test dello Sviluppo Morfosintattico (Fabbro F. e Galli R. 2001):
  - morfologia derivazionale
  - ripetizione di parole e non parole

Tutti i risultati sono composti da punteggi numerici, con valori medi correlati alle diverse età.

*Le capacità di lettura* sono state determinate con i seguenti test:

- Batteria per la valutazione della dislessia e della disortografia (Sartori G., Job R., and Tressoldi P.E.)
  - prova 4: lettura di lista di parole
  - prova 5: lettura di lista di non parole
- Test di correttezza e rapidità MT (Cornoldi et al, 1998): lettura di una storia, durante la quale si registra il tempo impiegato, il numero di errori, il numero di sillabe.

*L'attenzione e la memoria* sono state valutate tramite alcune parti del

- Test di sviluppo neuropsicologico: NEPSY (Korkman M., Kirk U., Kemp S.):
  - Subtest di attenzione uditiva
  - Subtest di attenzione visiva
  - Subtest di memoria di nomi
  - Subtest di apprendimento di lista

### **Risultati degli studi cognitivi al momento attuale**

Come dimostrato da diversi lavori riportati in letteratura, il 30% circa dei bambini affetti da distrofia muscolare di Duchenne presentano, oltre al severo e progressivo deficit muscolare, anche un modesto ritardo cognitivo. Il deficit cognitivo coinvolge prevalentemente l'area linguistica ed implica dei disturbi di apprendimento del bambino, coinvolgenti la sfera della lettura.

Lo scopo del nostro studio fino ad ora è stato quello di descrivere il profilo cognitivo e neuropsicologico di bambini italiani affetti da distrofia muscolare di Duchenne valutando il livello intellettivo (IQ), le abilità linguistiche e di lettura, l'attenzione e la memoria. Il gruppo di controllo, per ora limitato numericamente, è stato costituito da bambini di pari età, con difficoltà motorie non correlate all'assenza di distrofina (ad esempio Amiotrofia Spinale ed Osteogenesi Imperfetta).

Il campione di soggetti fino ad ora esaminato è di 44 bambini (38 soggetti affetti da distrofia muscolare di Duchenne, 3 soggetti affetti da Amiotrofia Spinale e 3 soggetti affetti da Osteogenesi Imperfetta).

Nel complesso i soggetti DMD non presentano disturbi specifici di linguaggio.

Sono emerse però modeste difficoltà nelle prove che esaminano le modalità visive, in particolare nell'attenzione visiva.

Tenendo in considerazione il livello intellettivo,

è stato osservato che i soggetti DMD ottengono risultati superiori alla norma nelle prove che valutano l'attenzione uditiva e l'apprendimento verbale mentre le prestazioni nelle prove che misurano l'attenzione visiva e la memoria visiva risultano inferiori alla norma.

Il risultato delle difficoltà di attenzione e memoria nella modalità visiva piuttosto che uditiva non è ovvio, considerato il profilo cognitivo generale dei soggetti DMD che hanno punteggi migliori nelle prove visuo-spaziali e inferiori nelle prove linguistiche.

### Attività previste

A partire da questi dati, si tratta ora di implementare task cognitivo-linguistici applicabili durante l'esame di Risonanza Magnetica Funzionale facendo particolare attenzione alle competenze linguistiche deficitarie e a quelle non deficitarie.

Si sono pertanto scelti i test volti alla valutazione della memoria e dell'attenzione visiva (che sono risultate deficitarie nei soggetti affetti da distrofia di Duchenne analizzati) e i test di valutazione della memoria uditiva e dell'attenzione uditiva (che invece sono risultati pienamente nei limiti di norma). I soggetti reclutati nello studio verranno sottoposti ad esame di Risonanza Magnetica Funzionale. Verranno quindi analizzati i pattern di attivazione corticale durante i diversi compiti cognitivi e tali aree di attivazione verranno comparate tra i diversi soggetti inclusi nello studio (DMD e SMA).

Se i pazienti non hanno mai eseguito una Risonanza Magnetica Convenzionale verranno sottoposti a tale esame.

## BASI GENETICHE DELL'AUTISMO

**DR. MASSIMO MOLteni**

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino

### DESCRIZIONE

L'autismo è un disturbo Generalizzato dello Sviluppo caratterizzato da un pattern di ritardi/atipie a carico dello sviluppo sociale, comunicativo verbale e non verbale e da forme limitate, ripetitive e stereotipate del comportamento, degli interessi e delle attività (A.P.A. 1995). L'autismo ha un esordio nei primi anni di vita, alterando i normali processi evolutivi e di sviluppo cognitivo. Accanto alle forme francamente autistiche nelle classificazioni diagnostiche (DSM-IV, ICD-10) vengono descritti quadri clinici frustrati definiti "non altrimenti specificati" che rappresentano uno "Spettro" abbastanza ampio del disturbo stesso specie nella prima infanzia (Autism Disorders Spectrum – ADS).

Sebbene l'autismo non sia associato a deficit neurologici maggiori presenta manifestazioni caratteristiche nell'ambito percettivo e motorio, come deficit nei riflessi posturali (Schimtz et al 2003), pattern di manipolazione degli oggetti bizzarri, anomalie nello sguardo e nel cammino (Hallett et al 1993), alterazione nella pianificazione e nell'esecuzione del movimento (Mari et al 2003). Queste osservazioni sono in accordo a recenti studi di neuroimaging cerebrale che suggeriscono la presenza di anomalie nei circuiti neurali che coinvolgono la corteccia fronto-temporo-parietale, il sistema limbico ed il cervelletto (Keller & Persico 2003, Brambilla et al 2003).

Diversi studi familiari, sui fratelli e sui gemelli dimostrano come la componente genetica sia un fattore importante di suscettibilità alla malattia. (Fonbonne et al 1999, Bailey et al 1996, Rutter et al 1990). Il tasso di concordanza per la malattia tra gemelli omozigoti è stimato attorno al 64%, per i

gemelli eterozigoti al 9% ed il rischio di avere la stessa malattia è tra il 3-4% per un bambino che abbia un fratello affetto da autismo, circa 75 volte maggiore della popolazione generale. L'ereditabilità, cioè la quota di varianza del disturbo spiegata da fattori genetici è stimata tra 80% e 90% (Folstein SE and Rosen-Sheidley B 2001). Come in altre malattie complesse, l'ipotesi genetica prevede che la malattia dipenda dall'effetto combinato di diversi loci, posti su cromosomi differenti ed interagenti tra loro e con l'ambiente. Il numero minimo stimato dei geni coinvolti va da 2-10 a > 10-15 a dimostrazione dell'eterogeneità genetica. Ciascun gene avrebbe un ruolo eziologico "parziale" nel determinare il fenotipo (geni ad effetto "minore"): livelli di gravità fenotipica diversa, sino a giungere alla malattia conclamata, dipenderebbero dagli effetti complessi della interazione tra loci. La suscettibilità all'autismo comporterebbe anche la suscettibilità a manifestazioni di forme più lievi di ADS o 'sottosoglia'. Questo modello fornisce una base biologica all'ipotesi clinica di 'spettro del disturbo autistico' e spiega la vasta gamma di espressioni fenotipiche che si rilevano nella pratica clinica.

Per identificare i geni coinvolti nella suscettibilità all'ADS sono state utilizzate differenti strategie, dalla citogenetica alla biologia molecolare, inclusi studi di linkage estesi all'intero genoma e studi di associazione con 'geni candidati'.

Un'altra modalità è quella di studiare con particolare attenzione quadri malformativi che si associano ad autismo, così da concentrare l'attenzione su particolari zone cromosomiche suscettibili. Ad esempio la sindrome da delezione 22q13 (MIM 606232), recentemente denominata sindrome Phelan-McDermid, è caratterizzata da ipotonia neonatale, ritardo globale dello sviluppo, assenza o ritardo di linguaggio, ritardo mentale lieve, lievi segni dismorfici, comportamento di tipo autistico, alta tolleranza al dolore.

Il raffinamento della identificazione del fenotipo e la conoscenza delle loro interrelazioni reciproche sono premesse indispensabili per ricostruire su nuove basi i percorsi diagnostici/identificativi della patologia e proporre migliori strategie di intervento e terapia.

Queste informazioni verranno raggiunte:

a) attraverso l'identificazione di una popolazione affetta da autismo dove siano riconoscibili diversi endofenotipi omogenei e riproducibili sulla base dell'identificazione di pattern motori e comportamentali caratteristici.

Ad esempio il comportamento autoaggressivo è

un aspetto che si manifesta sovente nello spettro di manifestazioni cliniche osservabili nei pazienti affetti da autismo o da Disturbi dello spettro autistico in età evolutiva.

Una delle tante possibili ipotesi sull'insieme dei problemi comportamentali che si manifestano con l'autismo, risiederebbe nella mancanza di "intenzionalità condivisa" (shared intentionality), ossia in attività di cui gli interagenti condividono fini e intenzioni e agiscono, coordinando i loro rispettivi ruoli, secondo piani d'azione comuni e condivisi.

b) Lo studio dell'associazione genetica dell'Autismo – e dei diversi profili funzionali – con possibili geni candidati ed in un secondo tempo con le regioni cromosomiche identificate come sede di possibili loci di suscettibilità alla malattia (7q31, 16p, 15q11-13, 2q, 6q21 e 10q).

Sarà quindi possibile valutare l'impatto dei geni candidati o delle regioni cromosomiche a rischio non solo con diagnosi categoriali ma anche con profili funzionali e valutare l'interazione tra i diversi loci di suscettibilità alla malattia nel determinare fenotipi funzionali differenti.

c) Comprendere se alterazioni nel profilo farmacocinetico dei farmaci si associno casualmente alla presenza/assenza di effetti benefici e/o effetti collaterali nelle forme di autismo autoaggressivo nei bambini, per identificare effetti dei farmaci che possano essere utilizzati per una migliore comprensione della patogenesi e quindi per la proposta di azioni terapeutiche alternative.

Il progetto verrà articolato in quattro sottoprogetti specifici che consentano di ottenere specifici risultati secondo le linee sopra indicate e che vengono descritti dettagliatamente più avanti.

### **Risultati e prodotti conseguiti nei primi due anni di ricerca**

Nel protocollo inizialmente messo a punto per la Ricerca Corrente 2004 "Basi genetiche dell'autismo e correlazione con la dimensione clinico-funzionale" è stato previsto il reclutamento di circa 60 triplette entro il primo anno e di altre 60 triplette entro la fine del secondo anno.

A circa 24 mesi dall'inizio dello studio, questo obiettivo è stato raggiunto.

Nel corso dell'ultimo anno, inoltre, 12 pazienti sono stati coinvolti in una valutazione standardizzata della stabilità posturale e del cammino ("gait analysis") attraverso una valutazione cinetica e cinematica con sistema ELITE a 8 telecamere ad infrarossi a due piattaforme di forza modello Kistler.

Il campione è attualmente costituito da 101 triplette

complete e da 32 triplette non complete.

Tra i partecipanti, sono state individuate 6 famiglie con più di un soggetto affetto (MULTIPLEX); in due casi, i soggetti affetti sono gemelli.

Per quanto riguarda l'analisi del cammino preliminarmente svolta il campione è stato costituito da 12 bambini affetti da Autismo (range di età: 7.0 ± 2.3), reclutati tra i soggetti già coinvolti nell'indagine genetica, e da 15 bambini sani.

Tutti i 27 bambini erano in grado di camminare autonomamente senza nessun tipo di ausilio.

Ogni bambino è stato sottoposto ad una valutazione clinico-funzionale da parte di un fisiatra. Tale valutazione ha compreso anche l'analisi quantitativa 3D del cammino (gait analysis). Le acquisizioni si sono svolte in un'unica sessione costituita da un numero di prove variabile tra 5 e 10 in modo da garantirne la ripetibilità.

Al fine di analizzare il pattern locomotorio dei soggetti, sono state valutate alcune classi di parametri:

- parametri temporali;
- parametri di distanza;
- parametri di velocità;
- parametri cinematici relativi alle articolazioni degli arti inferiori.

È stato infine utilizzato un indice sintetico in grado di riassumere le informazioni relative a tutti i parametri sopra indicati.

Sono emerse differenze statisticamente significative sia nei parametri cinetici che cinematici (in accordo alla letteratura). In particolare le differenze riguardavano la lunghezza del passo per i parametri cinetici. Per i parametri cinematici è emerso come le differenze nell'angolazione della caviglia sul piano di dorsi-plantiflessione evidenziano per tutti i parametri una tendenza all'accentuata plantiflessione, avallando quindi le osservazioni cliniche. In particolare l'angolo al contatto iniziale ( $t=3.116$ ;  $p=0.003$ ) e al massimo nella fase di stanche ( $t=2.225$ ;  $p=0.030$ ) hanno riportato differenze significative dal punto di vista statistico, come peraltro già testimoniato da alcuni autori.

Per quanto riguarda lo studio del gene SHANK3 il rilevamento della delezione e la successiva caratterizzazione molecolare mediante FISH con sonde cosmidi hanno permesso di individuare il punto di rottura nel gene candidato. I punti di rottura nel nostro caso e in quello di Anderlid et al. (2002) hanno dimostrato la presenza di un punto di rottura ricorrente nel gene SHANK3. I dati ottenuti sono perfettamente sovrapponibili al primo caso pubblicato da Wong et al, 1997,

umentando a tre i casi con sindrome da delezione 22q13.3 associati ad un identico punto di rottura localizzato in una unità ripetuta di 15 paia di basi del gene SHANK3.

Questi dati sottolineano, inoltre, che data la difficoltà nell'interpretazione dei dati di FISH mediante l'uso delle sonde commerciali subtelomeriche 22qter, la strategia ottimale per rilevare microdelezioni 22qter è attuare uno screening subtelomerico mediante FISH con sonde cosmidi specifiche alla regione critica 22q13.

Inoltre questi dati molecolari suggeriscono l'esistenza di un meccanismo genomico che determina il verificarsi di delezioni ricorrenti 22q13.3 nel gene SHANK3.

Le caratteristiche cliniche comuni nei tre casi esaminati (nostro caso, il caso di Anderlid et al. 2002, il caso di Wong et al, 1997) sono ritardo mentale e ritardo dello sviluppo con grave compromissione del linguaggio espressivo, confermando il fenotipo minimo della sindrome da delezione 22q13.3.

#### Publicazioni

- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O.: IDENTIFICATION OF A RECURRENT BREAKPOINT WITHIN THE SHANK3 GENE IN THE 22Q13.3 DELETION SYNDROME. J Med Genet. 2005 Nov 11

#### Attività previste

Si prevede un reclutamento di circa 60 triplette (pz+genitori) entro il primo anno e di altre 60 triplette entro la fine del secondo anno. Per la fine del terzo anno si prevede la raccolta di un campione di 150 triplette e l'esecuzione delle indagini genetiche.

Particolare attenzione verrà inoltre dedicata alla raccolta di famiglie con più di un soggetto affetto (MULTIPLEX). Per queste si prevede un tasso di identificazione di 3-4 nuove famiglie multiplex all'anno.

L'identificazione di endofenotipi clinici e funzionali differenti verrà posta sulla base di diversi profili di valutazione: profilo cognitivo; profilo delle abilità sociali e funzionali; particolare attenzione verrà riservata al profilo motorio e comportamentale, sulla base delle ipotesi che le anomalie nei pattern di movimento e comportamentali descritte nell'autismo siano il riflesso di minime anomalie strutturali o funzionali di sistemi sottocorticali coinvolti nel controllo motorio, come i gangli della base e il cervelletto.

Per quanto riguarda invece lo studio della componente dell'attenzione condivisa, il campione sperimentale sarà composto da bambini d'età prescolare (3-6 anni) con diagnosi di autismo. I risultati ottenuti verranno successivamente confrontati con le prestazioni di due gruppi di controllo, costituiti rispettivamente da bambini con sviluppo normale appaiati per età mentale e da bambini con altri disturbi dello sviluppo associati per età cronologica. Il protocollo sperimentale messo a punto dal nostro gruppo di ricerca si suddivide essenzialmente in 2 parti, che tentano di valutare rispettivamente:

- 1) il livello di comprensione dell'azione intenzionale
- 2) l'attitudine alla condivisione e alla collaborazione

Per quanto riguarda il punto 1), verrà utilizzato un paradigma sperimentale basato sull'imitazione a diversi livelli di complessità (a, b, c), ciascuno dei quali si presuppone riflettere lo sviluppo di differenti abilità cognitive. Per quanto riguarda il punto 2), sono state pensate diverse attività, studiate per valutare la disposizione alla condivisione nelle sue varie forme (emozionale, attenzionale, comportamentale) secondo livelli di sempre più complessa cooperazione. Le attività comprenderanno: cooperazione semplice; gioco di finzione; pointing; gioco con ruoli alternati.

I pazienti con comportamenti autoaggressivi verranno caratterizzati per i polimorfismi classici noti influenzare il metabolismo di acido valproico in UDP glicuronosiltransferasi, CYP2A6, CYP2C19; i polimorfismi del recettore per il GABA A; i polimorfismi suggeriti modificare la risposta al risperidone (su recettore D2 e D4, trasportatore della dopamina, e CYP2D6). Si monitoreranno nel tempo la concentrazione plasmatica (frazione libera/legata) dei farmaci ed in parallelo l'insorgenza di effetti benefici, reazioni avverse, resistenza e/o perdita di efficacia del farmaco e, nel caso del risperidone, prolattinemia.

Lo studio del meccanismo di rilascio di prolattina da parte del risperidone avverrà in cellule ipofisarie GH trasfettate o meno col recettore D2. Si valuteranno il ruolo del recettore e dei meccanismi di traduzione ad esso legati (cAMP, IP3/Calcio) con appositi bloccanti.

**Sottoprogetto n. 1: analisi molecolare del gene SHANK3 in pazienti con sindrome neurogenetica da delezione cromosomica 22q13.3 (MIM 606232) e soggetti non deleti con fenotipo caratteristico.** Anno di inizio: 2005

La sindrome da delezione 22q13 (MIM 606232)

è caratterizzata da ipotonia neonatale, ritardo globale dello sviluppo, assenza o ritardo di linguaggio, ritardo mentale lieve, comportamenti di tipo autistico e lievi segni dismorfici. Questa malattia genetica rimane sotto-diagnosticata, per la difficoltà a rilevare la microdelezione della porzione terminale del cromosoma 22 con una analisi cromosomica di routine e di riconoscere le sue caratteristiche cliniche.

L'obiettivo di questo progetto è quello di approfondire i meccanismi molecolari che determinano la sindrome da delezione 22q13.3 mediante l'analisi citogenetica molecolare mediante FISH (ibridazione in situ fluorescente), Array-CGH (ibridazione genomica comparata mediante array) in soggetti con riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione 22q13 e fenotipo da sindrome 22q13, per permettere una migliore correlazione genotipo/fenotipo e definire gli elementi strutturali che determinano il verificarsi di tali riarrangiamenti. In questo anno di lavoro abbiamo caratterizzato mediante tecniche molecolari due casi non correlati con sindrome da delezione 22q13.3 associati ad una microdelezione eterozigote di 100Kb. I risultati ottenuti dimostrano che entrambi i casi con sindrome da delezione 22q13.3 mostrano un identico punto di rottura localizzato in una unità ripetuta di 15 paia di basi suggerendo l'esistenza di un breakpoint ricorrente nel gene SHANK3. (Bonaglia et al, 2005).

### Razionale

La sindrome da delezione 22q13 (MIM 606232), recentemente denominata sindrome Phelan-McDermid, è caratterizzata da ipotonia neonatale, ritardo globale dello sviluppo, assenza o ritardo di linguaggio, ritardo mentale lieve, lievi segni dismorfici, comportamento di tipo autistico, alta tolleranza al dolore. Gli individui affetti, se diagnosticati nella prima infanzia, traggono enorme beneficio da intensi programmi terapeutici focalizzati al miglioramento delle abilità comunicative e adattive e attività sportive mirate allo stiramento dei muscoli (Havens et al, 2004)

La diagnosi da sindrome 22q13.3 è confermata dalla presenza di una delezione o rotture a carico del cromosoma 22q13.3. Circa il 75% dei soggetti presenta una delezione pura 22q sia terminale che interstiziale (Wilson et al, 2003), mentre il 25% è portatore di una delezione derivante da traslocazioni sbilanciate o reciproche (Wilson et al, 2003) o da cromosomi ad anello r(22) (Lucani et al, 2003).

Il fatto che un numero crescente di pazienti venga diagnosticato con questa sindrome fa ritenere che essa possa essere una causa frequente di ritardo mentale. Tuttavia questa malattia genetica rimane sotto-diagnosticata, a causa della difficoltà di rilevare la microdelezione della porzione terminale del cromosoma 22 con una analisi cromosomica di routine e di riconoscere le sue caratteristiche cliniche. Di conseguenza la sua incidenza non è ancora stabilita (Phelan, 2005). Infatti, l'identificazione della delezione 22qter può avvenire in modo causale in soggetti riferiti per sindrome Velocardiofaciale di George (VCF/DGC), poiché la sonda commerciale specifica per VCF/DGS contiene una sonda di controllo in 22qter.

Considerato che la taglia della delezione varia da 100Kb (Anderlid et al, 2002) a oltre 9 Mb (Wilson et al, 2003) l'analisi del cariotipo ad alta risoluzione non è in grado di rilevare la delezione 22q13 nella maggior parte dei casi. L'analisi mediante FISH con sonde subtelomeriche specifiche può dare risultati ambigui, richiedendo particolare attenzione nella valutazione dell'intensità dei segnali di ibridazione (Anderlid et al, 2002).

I segni neurologici maggiori della sindrome da delezione 22q13 sono con molta probabilità causati dalla mancanza di una delle due copie del gene Shank3/ProSAP2, che codifica per una proteina strutturale del sistema nervoso coinvolta nella formazione delle spine dendritiche (Roussignol et al, 2005). La rottura del gene riportata per la prima volta da Bonaglia et al (2001) in un soggetto con le caratteristiche fenotipiche sovrapponibili alla sindrome 22q13.3 rende SHANK3 il gene candidato responsabile del fenotipo neurologico della sindrome. Questa ipotesi è rafforzata dall'osservazione che tutti i casi studiati avevano una delezione del gene SHANK3 (Wilson et al, 2003).

L'obiettivo di questo progetto è quello di approfondire i meccanismi molecolari che determinano la sindrome da delezione 22q13.3 mediante l'analisi citogenetica molecolare mediante FISH (ibridazione in situ fluorescente), Array-CGH (ibridazione gnomica comparata mediante array) in soggetti con riarrangiamenti cromosomici coinvolgenti la regione 22q13 e fenotipo da sindrome 22q13, per permettere una migliore correlazione genotipo/fenotipo e definire gli elementi strutturali che determinano il verificarsi di tali riarrangiamenti.

In questo anno di lavoro abbiamo caratterizzato mediante tecniche molecolari due casi non correlati (un caso nostro e un caso già pubblicato da Anderlid et al, 2002, che ci è stato fornito dalla

Dr.ssa Britt-Marie Anderlid) con sindrome da delezione 22q13.3 associati ad una delezione eterozigote di 100Kb. I dati ottenuti sono stati confrontati con un caso precedentemente caratterizzato e pubblicato da Wong et al., 1997.

## Caso clinico e metodi

### Descrizione clinica

Il soggetto è una femmina primogenita nata da genitori sani e non consanguinei. Nata a termine dopo 40 settimane di gestazione. Alla nascita i parametri auxologici mostravano: PN 3360 g (50th and 75th centile), lunghezza 51 cm (75th centile), and circonferenza cranica 35 cm (10th centile).

Il periodo neonatale era nella norma e l'ipotonia non è stata segnalata. La probanda iniziava a camminare all'età di 11-12 mesi. Il linguaggio era severamente compromesso: pronunciava le prime 2-3 parole all'età di 1 anno, ma poi non si è più avuta alcuna progressione nel linguaggio. Vengono richiesti test genetici quali X-Fragile e il test di metilazione per sindrome di Angelman che risultano negative.

All'età di 17 anni mostrava una statura di 164.5 cm (50th centile), peso 93 Kg (> 97th centile) e circonferenza cranica 56 cm (75th-90th centile). Era evidente obesità dovuta ad iperfagia. Al viso mostrava lievi dimorfismi: volto lungo e piatto, brachicefalia, occhi infossati, filtro corto, lieve prognatismo, lobi delle orecchie ipoplastici e macrostomia. Sindattilia cutanea di 2-3 dita del piede con ipoplasia delle unghie. L'esame neurologico era nella norma.

All'esame psichiatrico era evidente sin dall'età di due anni un ritardo mentale severo, assenza totale del linguaggio e tratti di tipo autistico. La valutazione psichiatrica mediante il test Profilo Psicoeducativo Revisionato (PEP-R) evidenziava ad una età cronologica di 13 anni ed 1 mese (157 mesi) un punteggio globale di sviluppo funzionale di circa 16 mesi; nelle singole sub-aree di sviluppo i punteggi di sviluppo funzionale erano: *Imitazione*: 3 mesi; *Percezione*: 12 mesi; *Motricità Fine*: 28 mesi; *Motricità Globale*: 19 mesi; *Coordinazione Oculo-manuale*: 24 mesi; *Performance cognitiva*: 10 mesi; *Linguaggio cognitivo*: 7 mesi. Il comportamento adattivo è stato valutato attraverso la somministrazione ai genitori della paziente delle scale Vineland. La somministrazione evidenziava che, a livello di comportamento adattivo, un livello di sviluppo medio era inferiore ai 18 mesi di età (il livello minimo della scala). In particolare, a livello di *comunicazione* il livello di svilup-

po evidenziato era risultato inferiore ai 18 mesi di età, con una distribuzione dei punteggi armonica: tutte e 3 le sub-aree (*comprensione linguistica, espressione linguistica e apprendimenti formali*) evidenziavano un punteggio inferiore al punteggio minimo previsto dalla taratura. L'area delle *abilità quotidiane* mostrava un livello di sviluppo intorno ai 32 mesi, con la sub-area delle *autonomie personali* che si collocava intorno ai 33 mesi, l'area delle *autonomie domestiche* si collocavano intorno ai 45 mesi e l'area delle *autonomie sociali* intorno ai 27 mesi. L'area della *socializzazione* evidenziava un livello di sviluppo inferiore ai 18 mesi, con una distribuzione dei punteggi armonica: tutte e 3 le sub-aree prese in esame (*relazioni interpersonali, gioco e tempo libero e rispetto delle regole sociali*) mostravano un punteggio inferiore al punteggio minimo previsto dalla taratura. Infine, a livello *motorio* il soggetto presentava un livello di sviluppo intorno ai 23 mesi, armonico nelle sub-aree *grosso-motorie e fino-motorie*.

#### *Analisi citogenetica e FISH*

L'analisi del cariotipo ad alta risoluzione (500-550 bande) eseguita sulla probanda e genitori era risultata nella norma. L'analisi mediante FISH con sonde subtelomeriche specifiche (kit Chromoprobe -T Cytocell) e la sonda ARSA (LSI DiGeorge/VCFS regions probe, Vysis) sono state eseguite secondo le indicazioni della casa produttrice. La sonda subtelomerica specifica 22q AquariusT probe (Cytocell) è stata utilizzata per ritestare singolarmente la probanda e i genitori. Sono state inoltre utilizzate le seguenti sonde cosmidi: n66c4 (AC000050), n85a3 (AC000036), n94h12 (AC002056) e n1g3 (AC002055) marcate con biotin-dUTP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) usando una reazione di nick translation. Le sonde marcate sono state visualizzate con FITC-avidin (Vector), i cromosomi sono stati colorati con DAPI (sigma) e analizzati mediante un microscopio epifluorescente Olympus BX61 e sono state prodotte immagini digitalizzate mediante il sistema Power Gene FISH System (PSI, Newcastle upon Tyne, UK).

#### *Analisi mediante Array-CGH*

Il campione di DNA del nostro caso e quello di un caso precedentemente pubblicato dal Dr. Anderlid (Anderlid et al, 2002) sono stati marcati secondo le procedure standard fornite da Agilent. In breve, 4µg di DNA purificato del paziente e del controllo (Promega) sono stati digeriti con due

enzimi RsaI e AluI (Promega) per due ore a 37°C. Dopo purificazione su colonna, 1 µg d'ogni campione digerito è stato marcato mediante random priming (Invitrogen) per due ore usando il fluorocromo Cy5-dUTP per il paziente e Cy3-dUTP per il DNA di controllo. I prodotti di marcatura sono stati in seguito purificati su colonna e preparati secondo le procedure Agilent e conservati a -20°C. Successivamente presso il laboratorio dell'Università di Pavia, che è attrezzato delle apparecchiature dedicate all'array-CGH, i campioni sono stati denaturati e dopo un pre-annealing di 30 minuti con 50µg di Cot-1 DNA, ibridati a 65 °C con rotazione per 40 ore. Dopo due lavaggi, l'array è stato analizzato mediante scanner Agilent al software Feature Extraction (v8.0). È stato infine elaborato un grafico utilizzando il programma CGH analytics software (v3.1).

#### *Analisi mediante Real-Time PCR*

La sequenza genomica annotata del cromosoma 22 è disponibile attraverso lo UCSC Human Genome Browser (assemblaggio Magio 2004) (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/Gateway>). La struttura genomica di SHANK3 è basata in parte sui dati delle Referenze 9 e 13 e sulla sequenza dei cDNA murini (NM\_021423 and NM\_021676). Gli esoni sono stati numerati seguendo la numerazione degli ortologi murini. Sette sequenze bersaglio specifiche per il cromosoma 22 sono state selezionate a intervalli di circa 5 Kbase all'interno di porzioni non ripetute del gene SHANK3 usando il software Primer Express (Applied Biosystems); un amplicone di controllo è stato selezionato con gli stessi parametri nel gene MAPK1 in 22q11.2; tutti gli ampliconi avevano le stesse dimensioni (60 nt) e Temperatura di Melting (58°C).

Amplificazione e rilevamento sono stati eseguiti su un ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems) usando il SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems); Le condizioni di amplificazione sono: 50°C, 2 minuti, 95°C, 10 minuti, seguiti da 40 cicli di 95°C, 15 secondi, 60°C, 1 minuto; tutti i campioni sono stati amplificati in quadruplica copia.

Esperimenti di validazione hanno dimostrato che l'efficienza di amplificazione del controllo e di tutti gli ampliconi target erano approssimativamente le stesse. Perciò la quantificazione relativa del numero di copie di DNA è stata ottenuta usando il metodo comparativo del CT (descritto in Applied Biosystems User Bulletin #2, Dicembre 11, 1997: ABI PRISM 7700 Sequence Detection System).

## Risultati

Il rilevamento della delezione e la successiva caratterizzazione molecolare mediante FISH con sonde cosmidi hanno permesso di individuare il punto di rottura nel gene candidato SHANK3.

I punti di rottura nel nostro caso e in quello di Anderlid et al. (2002) hanno dimostrato la presenza di un punto di rottura ricorrente nel gene SHANK3. I dati ottenuti sono perfettamente sovrapponibili al primo caso pubblicato da Wong et al, 1997, aumentando a tre i casi con sindrome da delezione 22q13.3 associati ad un identico punto di rottura localizzato in una unità ripetuta di 15 paia di basi del gene SHANK3.

Questi dati sottolineano, inoltre, che data la difficoltà nell'interpretazione dei dati di FISH mediante l'uso delle sonde commerciali subtelomeriche 22qter, la strategia ottimale per rilevare microdelezioni 22qter è attuare uno screening subtelomerico mediante FISH con sonde cosmidi specifiche alla regione critica 22q13.

Inoltre questi dati molecolari suggeriscono l'esistenza di un meccanismo genomico che determina il verificarsi di delezioni ricorrenti 22q13.3 nel gene SHANK3.

Le caratteristiche cliniche comuni nei tre casi esaminati (nostro caso, il caso di Anderlid et al. 2002, il caso di Wong et al, 1997) sono ritardo mentale e ritardo dello sviluppo con grave compromissione del linguaggio espressivo, confermando il fenotipo minimo della sindrome da delezione 22q13.3.

## Pubblicazioni

- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O.: IDENTIFICATION OF A RECURRENT BREAKPOINT WITHIN THE SHANK3 GENE IN THE 22Q13.3 DELETION SYNDROME. *J Med Genet.* 2005 Nov 11

## Bibliografia

- Wong AC, Ning Y, Flint J, Clark K, Dumanski JP, Ledbetter DH, McDermid HE: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A 130-KB TERMINAL MICRODELETION AT 22Q IN A CHILD WITH MILD MENTAL RETARDATION. *Am J Hum Genet* 1997;60:113-20.
- Phelan K.: 22q13.3 DELETION SYNDROME. *GENEReviews*, University of Washington, Seattle ([www.genetests.org](http://www.genetests.org)). Posted 11 May 2005.
- Luciani JJ, De Mas P, Depetris D, Mignon-Ravix C, Bottani A, Prieur M, Jonveaux P, Philippe A, Bourrouillou G, De Martinville B, Delobel B, Val-

lee L, Croquette MF, Mattei MG.: TELOMERIC 22Q13 DELETIONS RESULTING FROM RINGS, SIMPLE DELETIONS, AND TRANSLOCATIONS: CYTOGENETIC, MOLECULAR, AND CLINICAL ANALYSES OF 32 NEW OBSERVATIONS. *J Med Genet.* 2003;40:690-6.

- Bonaglia MC, Giorda R, Borgatti R, Felisari G, Gagliardi C, Selicorni A, Zuffardi O.: DISRUPTION OF THE PROSAP2 GENE IN A T(12;22)(Q24.1;Q13.3) IS ASSOCIATED WITH THE 22Q13.3 DELETION SYNDROME. *Am J Hum Genet.* 2001;69: 261-8.
- Anderlid BM, Schoumans J, Anneren G, Tapia-Paez I, Dumanski J, Blennow E, Nordenskjöld M.: FISH-MAPPING OF A 100-KB TERMINAL 22Q13 DELETION. *Hum Genet.* 2002;110:439-43.
- Wilson HL, Wong AC, Shaw SR, Tse WY, Stapleton GA, Phelan MC, Hu S, Marshall J, McDermid HE.: MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE 22Q13 DELETION SYNDROME SUPPORTS THE ROLE OF HAPLOINSUFFICIENCY OF SHANK3/PROSAP2 IN THE MAJOR NEUROLOGICAL SYMPTOMS. *J Med Genet* 2003;40:575-84.
- Precht KS, Lese CM, Spiro RP, Huttenlocher PR, Johnston KM, Baker JC, Christian SL, Kittikamron K, Ledbetter DH: TWO 22Q TELOMERE DELETIONS SERENDIPITOUSLY DETECTED BY FISH. *J Med Genet* 1998;35:939-942
- Havens JM, Visootsak J, Phelan MC, Graham JM Jr.: 22q13 DELETION SYNDROME: AN UPDATE AND REVIEW FOR THE PRIMARY PEDIATRICIAN. *Clin Pediatr (Phila)* 2004 Jan-Feb;43(1):43-53. Review.
- Roussignol G, Ango F, Romorini S, Tu JC, Sala C, Worley PF, Bockaert J, Fagni L.: SHANK EXPRESSION IS SUFFICIENT TO INDUCE FUNCTIONAL DENDRITIC SPINE SYNAPSES IN ASPINY NEURONS. *J Neurosci.* 2005;25:3560-70.

Sottoprogetto n. 2: Basi genetiche dell'Autismo e correlazione con la dimensione clinico-funzionale: approfondimento degli aspetti senso-motori e ampliamento della casistica. Anno di inizio: 2004

L'autismo è un disturbo Generalizzato dello Sviluppo caratterizzato da un pattern di ritardi/atipie a carico dello sviluppo sociale, comunicativo verbale e non verbale e da forme limitate, ripetitive e stereotipate del comportamento, degli interessi e delle attività (A.P.A. 1995). L'autismo

ha un esordio nei primi anni di vita, alterando i normali processi evolutivi e di sviluppo cognitivo. Accanto alle forme francamente autistiche nelle classificazioni diagnostiche (DSM-IV, ICD-10) vengono descritti quadri clinici frustri definiti "non altrimenti specificati" che rappresentano uno "Spettro" abbastanza ampio del disturbo stesso specie nella prima infanzia (Autism Disorders Spectrum – ADS).

Sebbene l'autismo non sia associato a deficit neurologici maggiori presenta manifestazioni caratteristiche nell'ambito percettivo e motorio, come deficit nei riflessi posturali (Schimtz et al 2003), pattern di manipolazione degli oggetti bizzarri, anomalie nello sguardo e nel cammino (Hallett et al 1993), alterazione nella pianificazione e nell'esecuzione del movimento (Mari et al 2003). Queste osservazioni sono in accordo a recenti studi di neuroimaging cerebrale che suggeriscono la presenza di anomalie nei circuiti neurali che coinvolgono la corteccia fronto-temporo-parietale, il sistema limbico ed il cervelletto (Keller & Persico 2003, Brambilla et al 2003).

Mentre fino a 10 anni fa la prevalenza del disturbo era stimata intorno a 2-4 su 10000, gli ultimi studi suggeriscono una prevalenza fino a 6/1000 con un tasso stimato di 1 su 500 nati se si considerano i disturbi dello spettro autistico (Prior M 2003). Diversi studi familiari, sui fratelli e sui gemelli dimostrano come la componente genetica sia un fattore importante di suscettibilità alla malattia. (Fonbonne et al 1999, Bailey et al 1996, Rutter et al 1990). Il tasso di concordanza per la malattia tra gemelli omozigoti è stimato attorno al 64%, per i gemelli eterozigoti al 9% ed il rischio di avere la stessa malattia è tra il 3-4% per un bambino che abbia un fratello affetto da autismo, circa 75 volte maggiore della popolazione generale. L'ereditabilità, cioè la quota di varianza del disturbo spiegata da fattori genetici è stimata tra 80% e 90% (Folstein SE and Rosen-Sheidley B 2001). Come in altre malattie complesse, l'ipotesi genetica prevede che la malattia dipenda dall'effetto combinato di diversi loci, posti su cromosomi differenti ed interagenti tra loro e con l'ambiente. Il numero minimo stimato dei geni coinvolti va da 2-10 a > 10-15 a dimostrazione dell'eterogeneità genetica. Ciascun gene avrebbe un ruolo eziologico "parziale" nel determinare il fenotipo (geni ad effetto "minore"): livelli di gravità fenotipica diversa, sino a giungere alla malattia conclamata, dipenderebbero dagli effetti complessi della interazione tra loci. La suscettibilità all'autismo comporterebbe anche la

suscettibilità a manifestazioni di forme più lievi di ADS o 'sottosoglia'. Questo modello fornisce una base biologica all'ipotesi clinica di 'spettro del disturbo autistico' e spiega la vasta gamma di espressioni fenotipiche che si rilevano nella pratica clinica.

Per identificare i geni coinvolti nella suscettibilità all'ADS sono state utilizzate differenti strategie, dalla citogenetica alla biologia molecolare, inclusi studi di linkage estesi all'intero genoma e studi di associazione con 'geni candidati'.

Tra i risultati più significativi l'identificazione di un primo gene per l'Autismo in 7q che permetterebbe di distinguere tra forme di Autismo con e senza associati disturbi del linguaggio (Collaborative Linkage Study on Autism 2001) e la identificazione sul cromosoma 15q11-13 (area coinvolta anche nelle Sindromi di Prader Willi e di Angelman) di un locus responsabile per il comportamento ripetitivo e stereotipo nell'Autismo (Shao et al 2003). Altre regioni cromosomiche di interesse si trovano in 2q, 6q, 7q, 10q e 16q (IMGSAC 1998, Philippe et al 1999, Risch et al 1999, Ashley-Koch et al 1999, Persico et al 2001, Buxbaum et al 2001).

Sono state recentemente descritte mutazioni a carico dei geni NLGN3 e NLGN4, entrambi sul cromosoma X, in casi familiari di autismo (Jamain et al 2003). Questi geni sono candidati ideali per un'analisi di mutazione nei soggetti della nostra casistica.

Le indagini relative ad altri geni candidati suggeriscono un possibile ruolo di Reelin, FMR1, FMR2; Triptofano Idrossilasi, Recettore Dopaminergico DRD3, promotore per il trasportatore della serotonina (5HTTLPR) e c-HRAS (Herault et al 1993.), e per il gene GABRB3 localizzato all'interno della regione deleta nella sindrome di Angelman e Prader-Willi in 15q11-q13, anche se tuttora mancano evidenze definitive.

Il problema attuale è, quindi, l'esistenza di un disturbo eterogeneo sul piano clinico e genetico con importanti ripercussioni sull'intervento riabilitativo e quindi sulla prognosi dei pazienti autistici. L'obiettivo finale del progetto è, quindi, un miglioramento della conoscenza dell'eziologia dell'Autismo e delle patologie ad esso correlate.

La comprensione delle basi biologiche della malattia, il raffinamento della identificazione del fenotipo e la conoscenza delle loro interrelazioni reciproche sono premesse indispensabili per ricostruire su nuove basi i percorsi diagnostici/identificativi della patologia e proporre migliori strategie di intervento e terapia.

Queste informazioni verranno raggiunte:

a) attraverso l'identificazione di una popolazione affetta da autismo dove siano riconoscibili diversi endofenotipi omogenei e riproducibili sulla base dell'identificazione di pattern motori e comportamentali caratteristici.

b) lo studio dell'associazione genetica dell'Autismo – e dei diversi profili funzionali – con possibili geni candidati ed in un secondo tempo con le regioni cromosomiche identificate come sede di possibili loci di suscettibilità alla malattia (7q31, 16p, 15q11-13, 2q, 6q21 e 10q).

Sarà quindi possibile valutare l'impatto dei geni candidati o delle regioni cromosomiche a rischio non solo con diagnosi categoriali ma anche con profili funzionali e valutare l'interazione tra i diversi loci di suscettibilità alla malattia nel determinare fenotipi funzionali differenti.

### **Risultati e prodotti conseguiti nei primi 2 anni di ricerca**

Nel protocollo inizialmente messo a punto per la Ricerca Corrente 2004 "Basi genetiche dell'autismo e correlazione con la dimensione clinico-funzionale" è stato previsto il reclutamento di circa 60 triplete entro il primo anno e di altre 60 triplete entro la fine del secondo anno.

A circa 24 mesi dall'inizio dello studio, questo obiettivo è stato raggiunto.

Nel corso dell'ultimo anno, inoltre, 12 pazienti sono stati coinvolti in una valutazione standardizzata della stabilità posturale e del cammino ('gait analysis') attraverso una valutazione cinematica e cinematica con sistema ELITE a 8 telecamere ad infrarossi a due piattaforme di forza modello Kistler.

#### *Campione clinico*

Sino ad oggi, sono state complessivamente contattate per la ricerca 140 famiglie di bambini ricoverati presso l'IRCCS "E.Medea" in tempo pieno o in day hospital.

Tra di esse, 133 famiglie (95%) hanno deciso di prendere immediatamente parte allo studio; 6 famiglie (5%) non hanno invece fornito la loro adesione.

Il campione è inoltre composto da 110 maschi (82,7%) e da 23 femmine (17,3%), di età compresa tra i 2 ed i 24 anni (età media=6,72, DS=3,79).

La diagnosi più frequente è quella di Disturbo Autistico (86,5%), seguita dalla diagnosi di Disturbo Generalizzato dello Sviluppo Non Altrimenti Specificato (9,8%). Infine, per cinque partecipanti (3,7%) è stata formulata una diagnosi di Disturbo

di Asperger.

Per la valutazione del funzionamento cognitivo globale sono stati utilizzati, in base alle caratteristiche del paziente, i seguenti strumenti: Leiter (Roid e Miller, 2002), Griffiths (Griffith, 1996), Stanford Binet (Roid, 2003), Scale Weschler -WPPSI (Wechsler, 1973) e WISC-R (Wechsler, 1986).

Per 37 soggetti, non è stata possibile la somministrazione di nessuno di questi strumenti, a causa del loro bassissimo livello di collaborazione. Per i restanti 96 soggetti il QI medio coincide con il punteggio di 61,59 (DS=21,18).

La Childhood Autism Rating Scale (CARS, Schopler et al., 1988) è una scala di valutazione che può essere utilizzata a partire dai due anni di età e che può contribuire ad identificare i bambini con Autismo o con un altro disturbo dello spettro autistico.

Questo strumento è stato compilato dai clinici per 65 soggetti (48,9%). Per quanto riguarda il Punteggio Totale, la media coincide con il punteggio di 39,95 (DS=5,92).

La "Developmental Behaviour Checklist" (DBC, Einfeld and Tonge, 1992, 2002) è uno strumento per la valutazione di un'ampia gamma di problemi emotivi e comportamentali nei bambini e nei ragazzi con disabilità intellettiva di età compresa tra i 4 ed i 18 anni.

In riferimento al cut-off clinico, che coincide con il punteggio di 46 - 58° percentile - alla Scala Totale dei Problemi Comportamentali, 72 soggetti (68,6%) hanno superato questo punteggio.

È dunque possibile affermare che più della metà dei partecipanti allo studio per i quali è stata compilata la DBC, manifestano, secondo la valutazione dei propri genitori, delle difficoltà comportamentali ed emotive di rilevanza clinica.

Le "Vineland Adaptive Behaviour Scales" (VABS, Sparrow et al., 1984) valutano l'autonomia personale e la responsabilità sociale delle persone, dalla nascita fino all'età adulta. Questo strumento è stato compilato per 90 soggetti.

Il Profilo Psicoeducativo Revisionato (PEP-R, Schopler et al., 1990) consente di valutare il livello di sviluppo dei bambini con Autismo o con altri disturbi pervasivi dello sviluppo.

Il PEP-R è stato compilato per 83 soggetti; La "Autism Diagnostic Observation Schedule" (ADOS, Lord et al., 1999) è uno strumento semistrutturato, che consiste in una serie di attività standardizzate. Queste consentono all'esaminatore di osservare una serie di comportamenti considerati rilevanti allo scopo di formulare una diagnosi di Autismo o di altro disturbo dello spettro autistico.

I clinici hanno compilato questo strumento per 37 pazienti.

Per quanto riguarda più specificamente l'indagine genetica, tutti i soggetti partecipanti -probandi e coppia genitoriale- sono stati sottoposti a prelievo ematico (prelievo di 5-10 ml di sangue venoso) o di saliva (sciacquo boccale con saccarosio 4% o, in alternativa, brush).

Il campione è attualmente costituito da 101 triplete complete e da 32 triplete non complete.

Tra i partecipanti, sono state individuate 6 famiglie con più di un soggetto affetto (MULTIPLEX); in due casi, i soggetti affetti sono gemelli.

Le indagini genetiche verranno svolte nel corso del prossimo anno.

#### Analisi del cammino

Il campione è costituito da 12 bambini affetti da Autismo (range di età:  $7.0 \pm 2.3$ ), reclutati tra i soggetti già coinvolti nell'indagine genetica, e da 15 bambini sani reclutati tra i figli degli operatori dell'Istituto Scientifico.

Tutti i 27 bambini erano in grado di camminare autonomamente senza nessun tipo di ausilio.

Ogni bambino è stato sottoposto ad una valutazione clinico-funzionale da parte di un fisiatra. Tale valutazione ha compreso anche l'analisi quantitativa 3D del cammino (gait analysis). Le acquisizioni si sono svolte in un'unica sessione costituita da un numero di prove variabile tra 5 e 10 in modo da garantirne la ripetibilità.

Al fine di analizzare il pattern locomotorio dei soggetti, sono state valutate alcune classi di parametri:

- parametri temporali;
- parametri di distanza;
- parametri di velocità;
- parametri cinematici relativi alle articolazioni degli arti inferiori.

È stato infine utilizzato un indice sintetico in grado di riassumere le informazioni relative a tutti i parametri sopra indicati.

Sono emerse differenze statisticamente significative sia nei parametri cineteci che cinematici (in accordo alla letteratura). In particolare le differenze riguardavano la lunghezza del passo per i parametri cineteci. Per i parametri cinematici è emerso come le differenze nell'angolazione della caviglia sul piano di dorsi-plantiflessione evidenziano per tutti i parametri una tendenza all'accentuata plantiflessione, avallando quindi le osservazioni cliniche. In particolare l'angolo al contatto iniziale ( $t=3.116$ ;  $p=0.003$ ) e al massimo nella fase di stanche ( $t=2.225$ ;  $p=0.030$ ) hanno riportato differenze significative dal punto

di vista statistico, come peraltro già testimoniato da alcuni autori.

Si è inoltre riscontrata una differenza significativa per quanto riguarda la foot progression ( $t=3.192$ ;  $p=0.002$ ), che testimonia un'accentuata extra-rotazione del piede durante il cammino.

Il Gillette Global Index (GGI) è un indice sintetico che riassume un certo numero di parametri antropometrici, temporali, di distanza e cinematici. Per questo è stato recentemente indicato come un valido strumento in grado di caratterizzare gli scostamenti dei pattern locomotori patologici rispetto al cammino ritenuto normale: maggiore è il valore del GGI, maggiore è lo scostamento rispetto alla normalità.

La differenza riscontrata (Autistici:  $46.24 \pm 24.98$ ; controlli:  $28.72 \pm 11.67$ ), e la rilevanza statistica della stessa ( $t=-3.590$ ;  $p=7.31 \text{ E-}04$ ), fanno supporre la reale esistenza di un'anomalia del cammino nei soggetti affetti da autismo.

#### Attività previste

Il campione clinico deriva dalla popolazione dei pazienti attualmente seguiti dalla Unità di Psicopatologia -NR2- dell'Istituto Scientifico "E. Medea".

Il disegno sperimentale prevede che il campione sia raccolto secondo metodologie complementari, sia con uno schema caso-controllo tradizionale (Risch and Botstein, 2003) che con uno schema TDT (Transmission Disequilibrium Test) dove il "caso" è il paziente affetto ed il "controllo" è rappresentato dai cromosomi non trasmessi della coppia genitoriale (Spielman RS et al 1993).

Si prevede un reclutamento di circa 60 triplete (pz+genitori) entro il primo anno e di altre 60 triplete entro la fine del secondo anno. Per la fine del terzo anno si prevede la raccolta di un campione di 150 triplete e l'esecuzione delle indagini genetiche.

Particolare attenzione verrà inoltre dedicata alla raccolta di famiglie con più di un soggetto affetto (MULTIPLEX). Per queste si prevede un tasso di identificazione di 3-4 nuove famiglie multiplex all'anno.

L'identificazione di endofenotipi clinici e funzionali differenti verrà posta sulla base di diversi profili di valutazione: profilo cognitivo; profilo delle abilità sociali e funzionali; particolare attenzione verrà riservata al profilo motorio e comportamentale, sulla base delle ipotesi che le anomalie nei pattern di movimento e comportamentali descritte nell'autismo siano il riflesso di minime anomalie strutturali o funzionali di sistemi sotto-

corticali coinvolti nel controllo motorio, come i gangli della base e il cervelletto.

### Diagnosi clinica

Verrà seguito un percorso di diagnosi clinica secondo le linee guide suggerite dalla Child Neurology Society e dalla American Academy of Neurology (1999). La diagnosi sarà posta utilizzando i criteri diagnostici del DSM-IV e dell'ICD-10.

### Definizione del fenotipo funzionale:

Valutazione neuropsichiatrica: Childhood Autism Rating Scale (CARS)(Schopler et al., 1988); l'Autistic Diagnostic Observation Schedule (ADOS - G)(Lord et al 1999). Queste scale saranno somministrate da clinici esperti e specificamente addestrati all'uso di queste scale ed autorizzati dagli Autori delle stesse.

Per la valutazione del funzionamento cognitivo globale saranno utilizzati i seguenti strumenti in base alle caratteristiche del paziente: Leiter, Griffith, Stanford Binet (1964), Scale Weschler:WPPSI (1973) e WISC-R (1986).

Il profilo di adattamento funzionale verrà indagato tramite la somministrazione della Vineland Adaptive Behavior Scale (VABS) (Sparrow et al 1986) intervista semistrutturata somministrata ai genitori che indaga il livello di funzionamento nella socializzazione, nella comunicazione, nelle abilità motorie e nelle autonomie della vita quotidiana.

Il profilo comportamentale verrà valutato tramite la somministrazione della "Developmental Behaviour Checklist" (DBC, Einfeld & Tonge, 1992, 2002). Questo strumento valuta un'ampia gamma di problemi emotivi e comportamentali (tra cui Comportamento Distruttivo/Antisociale, Chiusura in se stessi, Disturbi della Comunicazione, Ansia, Alterazioni nelle Relazioni Sociali) nei bambini e nei ragazzi con disabilità intellettiva di età compresa tra i 4 ed i 18 anni.

Il profilo motorio verrà valutato attraverso l'analisi quantitativa 3D del cammino (gait analysis). Le acquisizioni di gait analysis vengono eseguite utilizzando:

- un sistema optoelettronico a 8 telecamere, 100 Hz (ELITE System, BTS S.p.A., Milano, Italia) a marker passivi, per rilevare il movimento: i marker sono stati posizionati secondo il protocollo Davis;
- due piattaforme di forza (Kistler, CH), per misurare lo scambio di forze con il terreno;
- un sistema di ripresa video frontale e sagittale, sincronizzato con il sistema optoelettronico e le piattaforme di forza.

Al soggetto è chiesto di camminare a piedi nudi,

ad una velocità "normale", lungo un camminatoio (6 metri di lunghezza ed 1.5 metri di larghezza) posizionato al centro del Laboratorio (stanza di 12 metri di lunghezza e 8 di larghezza). Le acquisizioni si svolgono in un'unica sessione costituita da un numero di prove variabile tra 5 e 10 in modo da garantirne la ripetibilità.

Al fine di analizzare il pattern locomotorio dei soggetti, sono valutate alcune classi di parametri:

- parametri temporali;
- parametri di distanza;
- parametri di velocità;
- parametri cinematici relativi alle articolazioni degli arti inferiori.

È infine utilizzato un indice sintetico in grado di riassumere le informazioni relative a tutti i parametri sopra indicati.

Tra i **parametri temporali** sono analizzati:

- % stance: durata della fase durante la quale il piede poggia a terra, calcolata in percentuale rispetto alla durata totale del ciclo del passo;
- stride time: durata del ciclo del passo, espressa in millisecondi;
- cadence: numero di passi nel ciclo di tempo, espressa in passi al minuto.

Tra i **parametri di distanza** sono stati analizzati:

- stride length: lunghezza del passo espressa in millimetri;
- stride length normalizzata: lunghezza del passo espressa in millimetri, normalizzata rispetto all'altezza del soggetto;
- step width: larghezza del passo espressa in millimetri;
- step width normalizzata: larghezza del passo espressa in millimetri, normalizzata rispetto all'altezza del soggetto.

Nel piano di flesso-estensione (piano sagittale) sono stati analizzati i seguenti parametri relativi alla **cinematica dell'anca**:

- hip angle at initial contact: angolo dell'articolazione dell'anca al momento del contatto del piede col terreno;
- hip angle at toe off: angolo dell'articolazione dell'anca al momento del distacco del piede dal terreno;
- range of motion: range di variazione angolare dell'anca calcolato come differenza tra massima estensione e massima flessione dell'articolazione.

Nel piano di flesso-estensione (piano sagittale) sono stati analizzati i seguenti parametri relativi alla **cinematica del ginocchio**:

- knee angle at initial contact: angolo dell'ar-

ticolazione del ginocchio al momento del contatto del piede col terreno;

- knee angle at toe off: angolo dell'articolazione del ginocchio al momento del distacco del piede dal terreno;
- range of motion: range di variazione angolare del ginocchio calcolato come differenza tra massima estensione e massima flessione dell'articolazione.

Nel piano di dorsi-plantiflessione (piano sagittale) sono stati analizzati i seguenti parametri relativi alla **cinematica della caviglia**:

- ankle angle at initial contact: angolo dell'articolazione della caviglia al momento del contatto del piede col terreno;
- ankle angle at 10% of stride: angolo dell'articolazione della caviglia al 10 % del ciclo del passo;
- max stance angle: massimo valore di dorsi-flessione nella fase di appoggio del piede;
- min swing angle: minimo valore di plantiflessione nella fase di volo del piede;
- ankle angle at toe off: angolo dell'articolazione della caviglia al momento del distacco del piede dal terreno;
- range of motion: range di variazione angolare della caviglia calcolato come differenza tra i valori assoluti del max stance angle e del min swing angle.

Nel piano di rotazione interna-esterna (piano orizzontale) è inoltre analizzato il valor medio della foot progression.

Il **Gillette Global Index (GGI)** è un indice sintetico che riassume un certo numero di parametri antropometrici, temporali, di distanza e cinematici. Per questo è stato recentemente indicato come un valido strumento in grado di caratterizzare gli scostamenti dei pattern locomotori patologici rispetto al cammino ritenuto normale: maggiore è il valore del GGI, maggiore è lo scostamento rispetto alla normalità.

### Valutazioni genetiche

In seguito a consenso informato raccolto dai genitori del paziente, in accordo ai criteri internazionalmente riconosciuti, verranno prelevati 5 – 10 ml di sangue venoso dal paziente e dalla coppia genitoriale o da un soggetto di controllo, nel caso i genitori non vogliano o non possano partecipare allo studio.

Riuscire a definire l'architettura genetica di un tratto genetico complesso (come L'autismo ed i disturbi dello spettro autistico) e identificare le singole componenti del tratto e scomporle negli

elementi base risulta essere un'operazione difficile. Nell'attualità la metodologia più appropriata per questo genere di indagini prevede di utilizzare un approccio di Associazione genetica, tramite tecniche e strategie definite di Linkage Disequilibrium (Risch & Botstein, 2003), particolarmente sensibile nella rilevazione di suscettibilità genetica ai disordini multifattoriali.

Verrà quindi esplorata la possibile associazione genetica tra i parametri motori e alcuni geni coinvolti sia nell'autismo che in alterazioni del movimento (gene della Relina e il cluster dei geni GABAA sul cromosoma 15q12). Per raggiungere questo obiettivo verrà condotto uno studio di linkage basato su famiglie nucleari (Proband + genitori) di bambini autistici, dove i parametri funzionali verranno utilizzati per definire i fenotipi sia categoriali che quantitativi.

Sottoprogetto n. 3:  
**Interazione sociale e Autismo**

### Collaborazioni

Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino

### Descrizione

Secondo una recente proposta avanzata da Tomasello e collaboratori (2004), ciò che contraddistingue la cognizione umana da quella delle altre specie sarebbe la capacità di partecipare in attività collaborative caratterizzate, secondo la terminologia da loro utilizzata, da "intenzionalità condivisa" (shared intentionality), ossia in attività di cui gli interagenti condividono fini e intenzioni e agiscono, coordinando i loro rispettivi ruoli, secondo piani d'azione comuni e condivisi.

La possibilità di partecipare in questo "noi intenzionale" si svilupperebbe nei bambini entro i primi quattordici mesi di vita grazie all'emergere progressivo e interrelato di due abilità fondamentali:

I) la comprensione dell'azione intenzionale altrui (intention reading), ossia la capacità di inferire intenzioni, finalità e percezioni sottostanti il comportamento manifesto dell'Altro

II) una forte motivazione alla condivisione di stati mentali (emozioni, intenzioni, desideri) nell'iterazione con i conspecifici.

Proprio questa motivazione, specie-specifica e biologicamente determinata, costituirebbe la caratteristica cruciale che differenzerebbe l'uomo dai suoi parenti filogeneticamente più prossimi, i primati, dotandolo di abilità interazionali uniche e funzionalmente ottimali ad una piena partecipazione alle complesse collettività umane.

Secondo i fautori di quest'ipotesi, i deficit interazionali che costituiscono l'essenza della sindrome autistica potrebbero derivare ed essere spiegati dall'assenza o dal malfunzionamento di questa fondamentale disposizione alla condivisione, che pregiudicherebbe, limitandoli sin dalle loro prime fasi, l'apprendimento e lo sviluppo di quelle abilità sociali necessarie per una soddisfacente integrazione e partecipazione alla società.

### Obiettivo

Verificare la plausibilità dell'ipotesi secondo cui molti dei deficit associati all'Autismo deriverebbero dall'assenza o dalla deficitarietà dell'innata motivazione alla condivisione, mentre risulterebbero sostanzialmente inalterate tutte le abilità sottostanti una piena comprensione dell'azione intenzionale (intention reading).

### Attività previste

#### *Partecipanti*

Il campione sperimentale sarà composto da bambini d'età prescolare (3 – 6 anni) con diagnosi di autismo, reclutati in vari centri di Neuropsichiatria Infantile presenti sul territorio nazionale. I risultati ottenuti verranno successivamente confrontati con le prestazioni di due gruppi di controllo, costituiti rispettivamente da bambini con sviluppo normale appaiati per età mentale e da bambini con altri disturbi dello sviluppo associati per età cronologica.

A tutti i genitori dei partecipanti saranno consegnati il consenso informato, dove sono esplicitati i termini e gli obiettivi della ricerca, e un questionario riguardante le preferenze e le abitudini di gioco dei bambini.

### Disegno sperimentale e materiali

Il protocollo sperimentale messo a punto dal nostro gruppo di ricerca si suddivide essenzialmente in 2 parti, che tentano di valutare rispettivamente:

- 1) il livello di comprensione dell'azione intenzionale
- 2) l'attitudine alla condivisione ed alla collaborazione

Per quanto riguarda il punto 1), verrà utilizzato un paradigma sperimentale basato sull'imitazione a diversi livelli di complessità (a, b, c), ciascuno dei quali si presuppone riflettere lo sviluppo di differenti abilità cognitive. Essi sono Imitazione semplice, Imitazione di azioni incomplete, Imitazione di azioni pretend.

Per quanto riguarda il punto 2), sono state pensate diverse attività, organizzate sotto forma di giochi, studiate per valutare la disposizione alla

condivisione nelle sue varie forme (emozionale, attenzionale, comportamentale) secondo livelli di sempre più complessa cooperazione. Le attività comprenderanno: cooperazione semplice; gioco di finzione; pointing; gioco con ruoli alternati.

### Procedura

La sessione sperimentale si svolge in una stanza dotata di apparecchiatura per la videoregistrazione, dove lo sperimentatore E ed il bambino si siedono attorno ad un tavolo. E spiega al bambino che gli mostrerà una serie di giochi con cui potranno divertirsi insieme. Le varie attività sono proposte una alla volta, sebbene non secondo una sequenza rigidamente stabilita, ma piuttosto in base alla loro attrattiva, seguendo le oscillazioni attenzionali del bambino. Durante lo svolgimento di un'attività, gli oggetti non utilizzati saranno tenuti all'interno di un contenitore, in modo da non costituire fonte di distrazione. Sono previste due sessioni sperimentali della durata di circa 40 minuti ciascuna.

Sottoprogetto n. 4: Farmacologia clinica e autismo. Anno di inizio: 2006

### Razionale

Il comportamento autoaggressivo è un aspetto che si manifesta sovente nello spettro di manifestazioni cliniche osservabili nei pazienti affetti da autismo o da Disturbi dello spettro autistico in età evolutiva. Al momento non esiste una terapia razionale che risolva questo quadro patologico. Sono al momento utilizzati due farmaci specifici, il valproato di sodio (depakin) bloccante del sistema gabaergico ed il risperidone (risperdal), antagonista dei recettori serotoninergici e dopaminergici. Nessuno di questi farmaci ha dato risultati positivi nel lungo periodo, anche se sono in grado di migliorare il quadro clinico in alcuni pazienti in modo sporadico. La ragione del comportamento imprevedibile di tali farmaci è ignota, come ignoto è se il loro effetto benefico, quando presente, sia dovuto al loro principale meccanismo di azione o ad altri effetti (quali per esempio l'inibizione delle deacetilasi da parte dell'acido valproico). Un ulteriore problema legato a questi farmaci, ed in particolare al risperidone, è l'aumento di prolattina, osservato in diversi pazienti ed a genesi non nota.

### Obiettivi

Comprendere se alterazioni nel profilo farmacocinetico dei farmaci si associno casualmente alla

presenza/assenza di effetti benefici e/o effetti collaterali nelle forme di autismo autoaggressivo nei bambini, per identificare un ipotetico protocollo terapeutico efficace. In subordine identificare effetti dei farmaci che possano essere utilizzati per una migliore comprensione della patogenesi e quindi per la proposta di azioni terapeutiche alternative. Ci si propone anche uno studio biologico per capire la via di traduzione del segnale che porti all'increzione di prolattina.

### Attività previste

I pazienti verranno caratterizzati per i polimorfismi classici noti influenzare il metabolismo di acido valproico in UDP glicuronosiltransferasi, CYP2A6, CYP2C19; i polimorfismi del recettore per il GABA A; i polimorfismi suggeriti modificare la risposta al risperidone (su recettore D2 e D4, trasportatore della dopamina, e CYP2D6). Si monitoreranno nel tempo la concentrazione plasmatica (frazione libera/legata) dei farmaci ed in parallelo l'insorgenza di effetti benefici, reazioni avverse, resistenza e/o perdita di efficacia del farmaco e, nel caso del risperidone, prolattinemia.

Lo studio del meccanismo di rilascio di prolattina da parte del risperidone avverrà in cellule ipofisarie GH trasfettate o meno col recettore D2. Si valuteranno il ruolo del recettore e dei meccanismi di traduzione ad esso legati (cAMP, IP3/Calcio) con appositi bloccanti.

### Risultati attesi

Lo studio nel tempo e la correlazione tra aspetto genetico, quadro farmacocinetico e risposta al farmaco dovrebbe permettere di individuare se esistano condizioni di assenza di risposta o di presenza di risposta legate ad una definita concentrazione dei farmaci e quindi aggiustare il dosaggio in modo conforme. Lo stesso dicasi per la comparsa di effetti collaterali. Lo studio osservazionale potrebbe inoltre portare alla luce eventi clinici che, pur nella loro complessità possano suggerire meccanismi patogenetici.

## DISTURBI NEUROPSICOLOGICI COMPLESSI: CORRELATI NEUROFISIOLOGICI E GENETICI

### DR. MASSIMO MOLteni

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Istituto Scientifico H San Raffaele, Dipartimento di Medicina Nucleare, Milano, Italia (D.Perani)

Yale School of Medicine, Department of Pediatrics, New Haven, Connecticut, USA (J.Gruen)

### DESCRIZIONE

La dislessia evolutiva (DE) è un disturbo dell'apprendimento specifico che determina difficoltà significative delle abilità di lettura a fronte di normali capacità intellettive ed in assenza di disturbi neurologici o sensoriali. Le cause del disturbo non sono ad oggi note, anche se appare chiaro il contributo di fattori genetici, verosimilmente rappresentati dall'azione congiunta di più geni a piccolo effetto sul fenotipo.

#### *Attenzione selettiva uditiva e visiva*

I dati finora raccolti mostrano come i bambini con dislessia abbiano un deficit di selezione spaziale sia visivo (orientamento attenzionale visuospatiale) che uditivo (orientamento attenzionale uditivo-spaziale), supportando l'idea che un'ampia varietà di sintomi della dislessia potrebbe essere ricondotta a un deficit della selezione multi-modale dell'informazione.

L'attenzione spaziale viene definita come un processo di selezione mediante la quale viene filtrata una ristretta porzione del campo percettivo. Tale processo si realizza sia attraverso meccanismi facilitatori che agiscono sulla figura (area attesa o bersaglio), sia mediante meccanismi inibitori che agiscono sullo sfondo (area non attesa o distrattore).

La nostra ipotesi prevede che una disfunzione dell'attenzione selettiva sia per la modalità visiva che per quella uditiva sia cruciale per la DE. Infatti

ti, l'abilità di focalizzare rapidamente l'attenzione, aumentando l'elaborazione del "segnale" e riducendo l'elaborazione del "rumore", è la funzione cruciale implicata nella procedura seriale di apprendimento della lettura (i.e., via sublessicale).

#### *Correlati neurofisiologici nel disturbo specifico del linguaggio*

Secondo l'ipotesi di Tallal, le difficoltà di codifica del linguaggio parlato nei disturbi specifici del linguaggio (DSL) avrebbero origine da deficit nel processamento di transizioni rapide nell'input acustico; a conferma di tale ipotesi si osserva come i bambini con DSL incontrino maggiori difficoltà, rispetto ai controlli, nel discriminare stimoli acustici molto brevi (con una durata inferiore ai 50 ms.) o separati da intervalli particolarmente ridotti. Sulla base di tali osservazioni, Tallal e coll. hanno proposto una metodologia innovativa per il trattamento dei DSL, fondato proprio sulla modificazione delle componenti temporali dello stimolo acustico.

Negli ultimi anni sono apparsi numerosi studi che utilizzano anche tecniche di tipo psicofisiologico per rilevare differenze nell'elaborazione centrale del segnale. In particolare, sono state osservate modificazioni nella latenza e nell'ampiezza di una specifica componente dei potenziali evocati (ERP), chiamata Mismatch Negatività (MMN).

Sulla base delle considerazioni precedenti, il presente studio si propone di:

- Verificare se un gruppo di bambini con DSL mostra una risposta di MMN alla comparsa di uno stimolo raro che si discosta dallo stimolo frequente per una parte dello spettro acustico di durata molto breve (50 ms.).
- Verificare se e come cambi la componente MMN in seguito ad un training di discriminazione ad analisi fonologica di stimoli verbali modificati con particolari algoritmi informatici, sia in termini assoluti che in confronto a diversi trattamenti riabilitativi della stessa durata e intensità.
- Studiare le relazioni e correlazioni tra la MMN, le abilità linguistiche nelle diverse componenti, e le prove comportamentali (psicofisiche e neuropsicologiche) per la valutazione del processamento uditivo.

#### *Interferenza spaziale e temporale nella dislessia evolutiva*

I dislessici manifestano infatti una specifica difficoltà nel "filtrare" il segnale dal rumore vicino sia nello spazio (i.e., interferenza spaziale) sia nel tempo (i.e., interferenza temporale). Tra i più impor-

tanti processi che permettono di escludere il rumore dall'elaborazione del segnale, l'attenzione selettiva sembra essere quella crucialmente implicata nella DE. Un disturbo dell'attenzione selettiva potrebbe determinare le difficoltà percettive uditive e visive che sono alla base della disfunzione linguistica – fonologica normalmente associate alla DE. Misureremo i disturbi di esclusione del rumore spaziale e temporale nella modalità visiva e in quella uditiva e di studiarne la diretta relazione con i disturbi dell'attenzione spaziale e temporale nei bambini con DE.

#### *Studio gene *dc/dc2**

L'identificazione di fenotipi umani correlati a varianti polimorfiche di geni della migrazione neuronale rappresenta un approccio alla comprensione della corticogenesi nell'uomo ed apre una strada alla comprensione delle malformazioni della corteccia cerebrale umana. Particolarmente interessante è l'area 6p22, da tempo riconosciuta come area all'interno della quale con elevata probabilità risiedono gene/i che conferiscono un rischio a sviluppare dislessia quando trasmessi da genitore a figlio e che potrebbero avere un ruolo causale nella dislessia. Il DCDC2, che si trova nell'area 6p22 ed è un gene che controlla la migrazione neuronale, presenta un sito variabile che è stato recentemente associato alla dislessia evolutiva. Il gruppo di ricerca dell'Università di Yale, USA, che ha pubblicato questo risultato, ha richiesto la nostra collaborazione per replicare nella nostra popolazione di soggetti dislessici (circa 200 famiglie nucleari di probandi dislessici) il risultato da loro trovato.

#### *Imaging morfologico*

Per verificare se individui portatori delle varianti del gene DCDC2 associate alla dislessia evolutiva rappresentano un sottotipo con caratteristiche morfostrutturali cerebrali specifiche.

#### **Risultati e prodotti conseguiti** (relativo a progetti che continuano)

Per quanto riguarda lo studio dei correlati neurofisiologici nei Disturbi specifici di linguaggio, sono stati finora raggiunti i seguenti obiettivi:

- definizione dei protocolli di valutazione linguistica;
- definizione del protocollo di valutazione neurofisiologica;
- messa a punto delle prove sperimentali comportamentali;
- definizione dei tre programmi di trattamento;
- raccolta dei primi dati pre- e post-trattamento.

I soggetti finora valutati sono 30. I dati raccolti evidenziano differenze significative sia nelle risposte

comportamentali che in quelle elettrofisiologiche, nei diversi gruppi di soggetti; tali differenze appaiono interpretabili sulla base delle ipotesi sperimentali.

### Attività previste

1. Studio delle modificazioni nella latenza e nell'ampiezza di una specifica componente dei potenziali evocati (ERP), chiamata Mismatch Negatività (MMN) in 40 bambini di età compresa tra i 4 anni e 6 mesi ed i 7 anni, di cui 30 con diagnosi di DSL (criteri diagnostici ICD-10) e 10 con normale sviluppo del linguaggio.
2. Studio di imaging morfometrico e di diffusion tensor imaging di 15 dislessici con delezione nel DCDC2 e 15 controlli sani senza delezione che verranno inviati presso il dipartimento di medicina nucleare dell'Istituto San Raffaele di Milano per eseguire MRI 3 Tesla.
3. Studio di 15 bambini con DE e di 15 controlli di pari età cronologica e di pari abilità di lettura per studiare i processi percettivi e attentivi e verificare se sono deficitari nella DE.
4. Particolarmente importanti in quest'ambito di ricerca sono gli aspetti di elaborazione e di interpretazione dei dati che consentono la validazione di ipotesi cognitive stabilite su base puramente teorica o la costruzione di nuovi modelli cognitivi.

## REATTIVITÀ ADRENOCORTICALE E VULNERABILITÀ GENETICA IN FUNZIONE DELLA RELAZIONE DI ATTACCAMENTO MADRE-BAMBINO IN UN CAMPIONE AD ALTO RISCHIO

### DR. MASSIMO MOLteni

e-mail: MASSIMO.MOLTENI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

University College of London – Sub-Department of Clinical and Health Psychology, London

### DESCRIZIONE

Il protocollo di studio dal titolo "Reattività adrenocorticale e vulnerabilità genetica in funzione della relazione di attaccamento madre-bambino in un campione ad alto rischio", in corso dal 2004, prevede: 1) la valutazione del ruolo giocato dal legame di attaccamento come fattore che può moderare la risposta dell'organismo allo stress (attivazione sistema HPA e SNS) e 2) la valutazione di alcuni polimorfismi genetici nella formazione del legame di attaccamento disorganizzato (si veda RC 2004, 2005). Nel corso di quest'anno, oltre ad ampliare la numerosità del campione si intende anche estendere l'indagine genetica ad entrambi i genitori. Questa aggiunta oltre a rafforzare la metodologia dello studio (passaggio da una metodologia caso-controllo ad uno schema TDT- Transmission Disequilibrium Test), può fornire un maggiore contributo alla comprensione a) dei fattori implicati nell'eziologia dell'attaccamento disorganizzato e b) al complesso ruolo svolto dall'attaccamento come fattore che può moderare tra predisposizione genetica e outcomes nella risposta psicofisiologica dell'organismo allo stress.

Il punto di partenza in base al quale si può integrare la genetica del comportamento e la teoria dell'attaccamento è che entrambe forniscono spiegazioni completamente differenti dello stesso dato ampiamente documentato: la trasmissio-

ne intergenerazionale del pattern di attaccamento. Secondo i teorici dell'attaccamento il pattern di attaccamento disorganizzato sembra essere l'effetto diretto di comportamenti spaventanti o di traumi, o l'effetto secondario di caregivers spaventati che non hanno risolto le loro esperienze di trauma o di perdita (Main & Hesse, 1990). I dati sperimentali sostengono questo tipo di ipotesi; sono state infatti trovate associazioni tra attaccamento disorganizzato e maltrattamento, esperienze genitoriali di lutto non risolto, abuso d'alcool e di droghe. Tuttavia, di recente è stata trovata un'associazione tra polimorfismi (48bp e -521 C/T promoter) del gene per il recettore D4 (DRD4) e l'attaccamento disorganizzato in campioni di bambini non a rischio (Lakatos et al., 2000; 2002; 2003). Tale associazione è stata inoltre confermata da un lavoro pubblicato recentemente dallo stesso gruppo di ricerca (Gervai et al. 2005) che ha raccolto e analizzato anche i dati genetici raccolti sui genitori attraverso il modello TDT. Nessuno studio, a nostra conoscenza, ha indagato il ruolo svolto da entrambe le componenti (genetica e ambientale) nella genesi della disorganizzazione dell'attaccamento.

Non si conoscono a tutt'oggi gli esatti meccanismi che sottostanno la risposta biologica multimodale allo stress. Lo stress evoca risposte a livello psicofisiologico, comportamentale e psicologico che possono essere differenti a seconda dell'individuo. A livello psicofisiologico, i sistemi di risposta dell'organismo allo stress sono il sistema ipotalamo-ipofisi-surrene e il sistema simpatico adrenomidollare, indagati nel presente studio attraverso l'analisi del cortisolo e dell'alpha amylase salivare (si veda relazione RC2004-2005). Verosimilmente, la variabilità individuale nell'attivazione di questi parametri dipende da fattori genetici, epigenetici ed ambientali; secondo alcuni autori, inoltre, lo stile di attaccamento può essere un fattore in grado di modulare la reazione dell'individuo allo stress (Spangler & Grossman, 1993; Hertsgaard et al, 1995). Questa parte dello studio si propone di verificare se alcune varianti polimorfiche (COMT, DRD4, 5HTT-PR) costituiscono un fattore di rischio predisponente in grado di mediare un tipo di risposta psicofisiologica allo stress, la cui espressività fenotipica tuttavia è modulata dalla occorrenza dei diversi stili di attaccamento dell'infante.

## Metodologia

### Partecipanti

Il campione viene reclutato attraverso la collabo-

razione dei servizi sociali e delle comunità della Lombardia che accolgono i minori e le loro madri, mentre il gruppo di controllo (appaiato per sesso, età e, possibilmente, livello socioeconomico) attraverso gli asili nidi della stessa regione (si veda relazione RC 2004-2005 per quanto riguarda la procedura di reclutamento dei partecipanti nei due gruppi). Ad oggi (aprile 2006), sono già stati reclutati 78 partecipanti: 63 del gruppo di controllo e 15 di quello sperimentale.

La proposta di includere il prelievo del materiale genetico ai genitori verrà estesa ai soggetti reclutati finora e a quelli che daranno il loro consenso a partecipare durante il prossimo anno. Considerate le grosse difficoltà nel reclutamento dei padri dei bambini che hanno subito trascuratezza e abuso (nella maggioranza dei casi separati dalle madri), l'indagine genetica sui genitori verrà effettuata solo sui partecipanti del gruppo di controllo. Per la fine dell'anno si prevede, per quanto riguarda l'indagine genetica, la raccolta di 50 triplete (genitori più bambino). Al fine di ottenere una numerosità campionaria sufficiente per le analisi statistiche, si mira a ottenere – entro un paio d'anni - un numero di triplete pari a 100.

### Indagine genetica

Il disegno sperimentale prevede che il campione sia raccolto secondo metodologie complementari, sia con uno schema caso-controllo tradizionale sia con uno schema TDT (Transmission Disequilibrium Test) dove il "caso" è il bambino con un attaccamento disorganizzato ed il "controllo" è rappresentato dai cromosomi non trasmessi della coppia genitoriale.

Il campione è rappresentato dai probandi sani raccolti nell'ambito della ricerca corrente 2006 (vedi metodi parte generale RC 2004-2005). Per la parte di genetica sarà necessario raccogliere materiale biologico per estrarre il DNA da entrambi i genitori (sciacquo buccale). Per lo studio del modello di interazione genexambiente utilizzeremo il programma di analisi genetica intrafamiliare PBAT.

## Bibliografia

- Gervai J, Nemoda Z, Lakatos K, Ronai Z, Toth I, Ney K, Sasvari – Szekely M.: TRANSMISSION DISEQUILIBRIUM TESTS CONFIRM THE LINK BETWEEN DRD4 GENE POLYMORPHISM AND INFANT ATTACHMENT. American journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics) 2005;132B: 126 – 130.
- Hertsgaard L, Gunnar M, Erickson MF, Nachmias M.: ADRENOCORTICAL RESPONSES

TO THE STRANGE SITUATION IN INFANTS WITH DISORGANIZED/DISORIENTED ATTACHMENT RELATIONSHIPS. *Child Development* 1995;66:1100-6.

- Lakatos K, Nemoda Z, Birkas E, Ronai Z, Kovacs E, Ney K, Toth I, Sasvary-Szekely M.: ASSOCIATION OF D4 DOPAMINE RECEPTOR GENE AND SEROTONIN TRANSPORTER PROMOTER POLYMORPHISM WITH INFANTS' RESPONSE TO NOVELTY. *Molecular Psychiatry* 2003;8: 90-97.
- Lakatos K, Nemoda Z, Toth I, Ronai Z, Ney K, Sasvary-Szekely M, Gervai J.: FURTHER EVIDENCE OF THE DOPAMINE D4 RECEPTOR (DRD4) GENE IN ATTACHMENT DISORGANIZATION: INTERACTION OF THE EXON III 48-BP REPEAT AND THE -521 C/T PROMOTER POLYMORPHISMS. *Molecular Psychiatry* 2002;7: 27-31.
- Lakatos K, Toth I, Nemoda Z, Ney K, Sasvary-Szekely M, Gervai J.: DOPAMINE D4 RECEPTOR (DRD4) GENE POLYMORPHISM IS ASSOCIATED WITH ATTACHMENT DISORGANIZATION. *Molecular Psychiatry* 2000;5: 633-637.
- Main M. & Hesse H.: (1990). PARENTS' UNRESOLVED TRAUMATIC EXPERIENCES ARE RELATED TO INFANT DISORGANIZED ATTACHMENT STATUS: IS FRIGHTENED AND/OR FRIGHTENING PARENTAL BEHAVIOR THE LINKING MECHANISM? In Greenberg, Mark T (Ed); Cicchetti, Dante (Ed); Cummings, E. Mark (Ed). (1990). *Attachment in the pre-school years: Theory, research, and intervention.* (pp. 161-182). Chicago, IL, US: University of Chicago Press. xix, 507 pp.
- Spangler G, Grossmann KE.: BIOBEHAVIORAL ORGANIZATION IN SECURELY AND INSECURELY ATTACHED INFANTS. *Child Development* 1993;64:1439-50.

## STANDARDIZZAZIONE ITALIANA DELLA NEPSY: A DEVELOPMENTAL NEUROPSYCHOLOGICAL ASSESSEMENT: (M. KORKMAN, U. KIRK, S. KEMP, 1998)

**PROF. FRANCO FABBRO**

e-mail: FRANCO.FABBRO@SV.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento

### Collaborazioni

Poli IRCCS "E. Medea" di Bosisio Parini (LC), Ostuni (BR)

Centri di Riabilitazione La Nostra Famiglia Sedi di Cava dei Tirreni (SA), Varazze (SV).

### DESCRIZIONE

La NEPSY (Korkman M., Kirk U., Kemp S., 1998. *Nepsy. A Developmental Neuropsychology Assessment.* Harcourt Brace & Company; The Psychological Corporation, San Antonio) è una batteria di valutazione neuropsicologica del bambino sviluppata in lingua inglese ed ampiamente usata a livello internazionale. Essa si ispira ai principi diagnostici e riabilitativi di Luria (Luria, A.R. 1973. *Come lavora il cervello.* Tr. It. Bologna: Il Mulino). Le 27 prove di cui è composta consentono una valutazione neuropsicologica ampia con riferimento a cinque domini cognitivi: attenzione e funzioni esecutive; linguaggio; funzioni senso-motorie; elaborazione visuo-spaziale; memoria e apprendimento. Le prove possono essere combinate in modo flessibile per formare una valutazione di base o estesa dei vari domini cognitivi. La possibilità inoltre di fornire sia punteggi quantitativi, che si compongono in un profilo neuropsicologico, sia osservazioni qualitative affina ulteriormente lo strumento nel rilevare deficit cognitivi sottili che possono interferire con l'apprendimento (Kemp S., Kirk U, Korkman M., 2001. *Essentials of NEPSY Assessment.* New York: John Wiley & Sons.). Considerate le difficoltà di un uso diretto della

versione originale in altri paesi a causa di differenze socio-culturali e linguistiche, sono state fornite versioni standardizzate della NEPSY in altre lingue, tra cui francese, olandese, svedese e finlandese. Il presente progetto si propone di preparare una versione standardizzata in lingua italiana della batteria NEPSY-II, attualmente in fase di standardizzazione in inglese. Il progetto permetterà di avere a disposizione una batteria completa per la valutazione neuropsicologica del bambino con valori normativi rappresentativi della popolazione infantile italiana. Tale strumento potrà essere utilizzato non solo dai vari centri dell'Associazione La Nostra Famiglia, ma anche da altri centri universitari e di riabilitazione. Ciò consentirà un confronto più ampio tra i vari centri a livello nazionale, ma consentirà al tempo stesso di avere dati confrontabili con quelli di altri centri internazionali che usano la batteria NEPSY in altre lingue.

### Attività previste

Il primo passo del progetto di standardizzazione della batteria NEPSY consisterà nel preparare una versione in lingua italiana sia delle istruzioni che degli elementi linguistici del test. Particolare attenzione sarà data ai test del dominio linguistico in modo da avere una versione del test adattata alle tipiche caratteristiche linguistiche della lingua italiana. Le liste di parole saranno controllate per frequenza nel vocabolario infantile; le liste di non-parole saranno adattate per difficoltà articolatoria e per vicinanza alle parole del vocabolario italiano; le frasi e i racconti saranno adattati alla lingua italiana per complessità sintattica e contenuto semantico. Un team multidisciplinare composto da neurolinguisti, neuropsicologi e psicologi, afferenti al Centro dell'Associazione La Nostra Famiglia di S. Vito al Tagliamento (PN), provvederà alla preparazione della versione in italiano della batteria. Tale gruppo lavorerà in continuo contatto con la Prof.ssa Marit Korkman, primo autore della versione originale del test. Il gruppo potrà far riferimento alle esperienze con una versione provvisoria del test che è stata somministrata in un progetto pilota ad un gruppo di bambini con problemi neuropsicologici di vario tipo afferenti ai centri IRCCS "E. Medea" dell'Associazione La Nostra Famiglia. Nel processo di adattamento si farà riferimento anche ad altri test neuropsicologici in versione italiana usati nella pratica clinica sia in campo infantile sia nell'adulto, in modo da conservare, anche nella versione italiana, la coerenza strutturale con gli altri strumenti di valutazione che

la batteria ha nella versione originale. Il processo di traduzione linguistica si baserà direttamente sulla versione inglese; considerata, però, la distanza tra lingua inglese e italiana si farà, all'uopo, riferimento anche alla già pubblicata versione francese. La versione che emergerà da tale lavoro sarà sottoposta alla valutazione di un gruppo di esperti esterni che sulla base della propria esperienza clinica e conoscenza della batteria NEPSY daranno un giudizio indipendente in base ai criteri di comprensibilità delle istruzioni, opportunità del linguaggio usato rispetto ai vari gruppi di età cui il test è rivolto, vicinanza strutturale delle scelte linguistiche fatte nella traduzione dei test verbali rispetto agli altri strumenti di valutazione neuropsicologica per bambini in lingua italiana. Una volta concluso il processo di traduzione definitiva, prima di dare avvio alla standardizzazione su larga scala, si procederà ad un piccolo studio pilota per valutare l'opportunità dei cambiamenti che possano emergere nella pratica di somministrazione.

La standardizzazione della batteria NEPSY sarà effettuata su un campione di 1000 bambini dai 3 ai 16 anni selezionati su tutto il territorio nazionale. Sarà usato un piano di campionamento random stratificato per assicurare una presenza rappresentativa di tutti i gruppi demografici. Come criteri di stratificazione saranno considerati l'età, il sesso e l'area geografica di provenienza. Saranno coinvolti i centri dell'Associazione La Nostra Famiglia presenti in Friuli Venezia Giulia [S. Vito al Tagliamento (PN) e Pasian di Prato (UD)], di Bosisio Parini (LC), Ostuni (BR), Cava de' Tirreni (SA), Varazze (SV). Parteciperanno, inoltre, alla standardizzazione alcuni centri universitari ed extrauniversitari che permetteranno di coprire la maggior parte del territorio nazionale: Prof. Chiara Lavorato, Università di Padova, Prof. Laura D'Odorico, Università di Milano-Bicocca; Prof. Cristina Caselli & Prof. Volterra & Prof. Vicari, IULM, Roma; Dott.ssa Daniela Brizzolara, Stella Maris & Università di Pisa; Prof. Anna Chilosi, Università di Cesena. Tutti i bambini selezionati a far parte del campione normativo saranno di madrelingua italiana e con una storia di normale sviluppo neurologico e neuropsicologico. Informazioni circa la storia clinica dei bambini saranno acquisite con una intervista strutturata fatta ai genitori e agli insegnanti o agli animatori. Sarà inoltre preparato un veloce screening neuropsicologico che permetterà di escludere problemi di sviluppo neuropsicologico che possano compromettere la prestazione al test. Per assicurare una somministrazione il più possi-

bile standardizzata della batteria durante la raccolta di dati normativi, saranno selezionati esaminatori esperti nella somministrazione di test individuali a bambini. Sarà preparato e distribuito a tutti gli esaminatori, incluso con i materiali di somministrazione del test, un manuale preliminare in italiano in cui saranno contenute tutte le istruzioni per una corretta somministrazione dei vari test della NEPSY e per un'attribuzione standardizzata dei punteggi. Inoltre sarà programmato un training specifico per gli esaminatori che sarà effettuato su tutto il territorio nazionale dal coordinatore del progetto. Sarà predisposto un controllo qualità al fine di verificare l'adeguatezza della selezione del campione e la correttezza delle modalità di somministrazione della batteria nei vari centri che collaboreranno alla standardizzazione. Tutti i materiali compilati e i dati saranno poi raccolti e analizzati in un unico centro che avrà anche la cura dell'elaborazione dei dati normativi. L'attribuzione dei punteggi alle varie prove seguirà le regole indicate nella versione originale.

I risultati dell'elaborazione dei dati normativi saranno presentati in un adattamento alla versione italiana del manuale del test. Esso sarà curato in collaborazione con la Prof.ssa Marit Korkman e conterrà oltre ai dati normativi, anche i presupposti teorici e clinici e le istruzioni dettagliate per una corretta somministrazione, attribuzione di punteggi ed interpretazione del test. Il manuale conterrà anche una sezione dedicata alla validazione della batteria su una popolazione clinica, sia facendo riferimento alle esperienze cliniche fatte con la versione originale, sia riportando i dati di uno studio di validazione della versione in italiano su alcune popolazioni cliniche afferenti ai centri dell'Associazione La Nostra Famiglia. L'esperienza del processo di standardizzazione sarà anche oggetto di pubblicazione di articoli su riviste internazionali e nazionali.

## IL PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELLE ABILITÀ PRAGMATICHE VERBALI NEI BAMBINI (PAPV): APPLICAZIONE CLINICA

**DR. ALESSANDRO TAVANO**

e-mail: ALESSANDRO.TAVANO@SV.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 3

Psicopatologia dello sviluppo, del linguaggio e dell'apprendimento

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

San Vito al Tagliamento

### DESCRIZIONE

Le abilità pragmatiche verbali costituiscono un insieme di abilità che regola l'uso appropriato del linguaggio, per realizzare uno scambio comunicativo efficace e flessibile. Tali abilità si sviluppano in tempi e modi diversi: le abilità interattive, quali il rispetto del turno della conversazione e la conoscenza del valore comunicativo del contorno intonativo, si sviluppano gradualmente a partire dalla prima infanzia, modificandosi nel tempo fino a raggiungere un livello stabile e funzionalmente operativo a partire dal terzo anno nei soggetti con sviluppo nella norma (Orsolini, 1995); le abilità inferenziali, quali la comprensione delle metafore o la comprensione delle informazioni implicite, si sviluppano in un secondo momento, poiché risultano più legate all'importante maturazione cognitiva che nel passaggio dai 3 ai 4 anni permette ai bambini di riflettere sul pensiero degli altri (Teoria della mente; Cacciari, 1991).

In ambito clinico, la valutazione delle abilità pragmatiche verbali nei soggetti con patologie della sfera affettiva e relazionale costituisce un momento fondamentale del processo diagnostico e del percorso riabilitativo (Bonifacio e Stefani 1998). La diagnosi differenziale delle sindromi dello spettro autistico (in particolare Sindrome di Asperger) e dei disturbi del linguaggio (in particolare Disturbo della Comprensione) richiede una valutazione del profilo comunicativo pragmatico, considerato nei due aspetti complementari dell'interazione faccia a faccia e della comprensione dei significati non letterali (metafore) o impliciti (inferenze legate al contesto discorsivo) (Bishop, 1997).

In questa prospettiva, la distinzione tra sviluppo del linguaggio e sviluppo della pragmatica risulta

determinante anche nell'identificazione del profilo comunicativo di soggetti con ritardo mentale (sindrome di Down e sindrome di Williams). Infatti, i soggetti con sindrome di Down sembrano mantenere un'efficacia comunicativa di base (abilità conversazionali) (Johnston e Stansfield 1997), ma pochi sono i dati relativi alle abilità pragmatiche inferenziali. Questo tipo di dati risulta particolarmente importante per la definizione del profilo evolutivo della sindrome di Williams, in cui i bambini mantengono buone capacità interazionali, mostrano deficit linguistici selettivi ma presentano una abilità di scelta lessicale che da molti è stata avvicinata alle abilità metaforiche (Volterra, Capirci, Pezzini, Sabbadini e Vicari, 1996).

Benché le ricerche sullo sviluppo della pragmatica siano ormai numerose, esistono pochi strumenti valutativi a disposizione del clinico. Nell'ambito dell'attività di ricerca dell'IRCCS "E.Medeo", Polo di San Vito al Tagliamento e Pasian di Prato, è stato messo a punto uno strumento pilota di valutazione delle abilità pragmatiche, il Protocollo di valutazione delle Abilità Pragmatiche nei Bambini (PAPB, Tavano, 2005), che consiste di 8 prove, 2 di tipo interattivo e 6 di tipo metaforico-inferenziale: *Interazione*: 1) conversazione semistrutturata; 2) prosodia linguistica (comprensione e produzione) e prosodia emotiva (comprensione e produzione); *Comunicazione metaforica e implicita*: 1) similitudini; 2) metafore; 3) idiomi; 4) presupposizioni; 5) implicature; 6) atti linguistici indiretti. Tale strumento risulta potenzialmente di grande interesse per la definizione clinica dei profili comunicativi di tipo pragmatico. L'obiettivo della ricerca è duplice: 1) continuare la raccolta di dati normativi per il PAPB; 2) raccogliere dati sulle abilità di pragmatica verbale di bambini con Disturbo della comprensione del linguaggio (DSL, gruppo A), bambini con Sindrome di Asperger (gruppo B), bambini con sindrome di Williams (gruppo C).

### Risultati e prodotti conseguiti (dal 2003)

- Bearzotti F, Tavano A, Fabbro F.: OROFACIAL PRAXIS DEVELOPMENT IN CHILDREN FROM 4 TO 8. *Perceptual and Motor skills*, accettato per la pubblicazione.
- Tavano A, Borgatti R, Fabbro F.: SPEAKING WITHOUT THE CEREBELLUM: LANGUAGE SKILLS IN A YOUNG ADULT WITH NEAR TOTAL ABSENCE OF THE CEREBELLUM. *Proceedings of the International Language and Cognition Conference, Coffs Harbour (Australia, 10-12 September 2004).*

- Busan P, Pelamatti G, Tavano A, Grassi M, Fabbro F.: INVOLVEMENT OF VERBAL BEHAVIOUR AFTER PHARMACOLOGICAL TREATMENT OF DEVELOPMENTAL STUTTERING: A CASE STUDY. *Proceedings of DiSS'05. Disfluency in spontaneous Speech Workshop 10-12 September 2005. Aix-en-Provence. France.*
- Tavano A, De Fabritiis P, Fabbro F.: CONTRIBUTO ALLA VALUTAZIONE STANDARDIZZATA DELL'ELOQUIO NARRATIVO NEI BAMBINI. *Giornale di neuropsichiatria dell'età evolutiva*, 25: 48-64.
- Tavano A.: Review of Ludo Verhoeven & Hans Van Balkom, CLASSIFICATION OF DEVELOPMENTAL LANGUAGE DISORDERS. Theoretical Issues and Clinical Implications (Mawhak: LEA, 2004), *Journal of Child Language*, in press.
- Tavano A, Fabbro S, Fabbro F.: NEUROPHYSIOLOGICAL BASIS OF LANGUAGE. In GM Guazzo (Ed). *L'autismo infantile*, submitted.
- Bearzotti F, Tavano A, Pecile P, Skrap M, Fabbro F.: 2004. NEUROPSYCHOLOGICAL AND LANGUAGE DISORDERS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS WITH BRAIN TUMOR. *Saggi. Child Development and Disabilities*, 30: 69-84.
- Burelli A, Tavano A, Fabbro F.: 2004. CLINICAL NEUROLINGUISTICS OF BILINGUALISM. *Logos and Language*, 4: 35-44.
- Fabbro F, Tavano A, Corti S, Bresolin N, Borgatti R.: 2004. LONG-TERM NEUROPSYCHOLOGICAL DEFICITS AFTER CEREBELLAR INFARCTIONS IN TWO YOUNG ADULT TWINS. *Neuropsychologia*, 42: 536-545.
- Borgatti R, Tavano A, Cristofori G, Fabbro F.: (2004). LANGUAGE DEVELOPMENT IN CHILDREN WITH CEREBELLAR MALFORMATIONS. In F. Fabbro (Ed.), *Neurogenic Language Disorders in Children* (pp.127-148). Amsterdam: Elsevier.
- Fabbro F, Tavano A, Cristofori G, Borgatti R.: 2003. LANGUAGE DISORDERS AFTER VERY EARLY BRAIN LESION ASSOCIATED WITH PAROXYSMAL ABNORMALITIES DURING NREM SLEEP. In F. Fabbro (Ed.), *Neurogenic Language Disorders in Children* (pp.83-98). Amsterdam: Elsevier.
- Tavano A, Burelli A, Fabbro F.: 2004. I DISTURBI DEL LINGUAGGIO ACQUISITI E EVOLUTIVI NEI BILINGUI. In Albarea R e Rossi PG (Eds.), *Percorsi in Formazione* (pp. 75-83). Udine: Forum.

- Zanini S, Tavano A, Vorano L, Schiavo F, Gigli GL, Aglioti S, Fabbro F.: 2004. GREATER SYNTACTIC IMPAIRMENTS IN NATIVE LANGUAGE IN BILINGUAL PARKINSONIAN PATIENTS. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75, 1678-81.
- Tavano A.: 2003. PRONOMINAL ANAPHORA: A STUDY OF THE GRAMMAR / PRAGMATICS INTERFACE IN NORMAL AND LANGUAGE IMPAIRED CHILDREN. Università degli Studi di Trieste: Ph.D. Thesis, 5 March 2003.
- Bigoni A, Piccolo B, Tavano A, Csillaghy AL, Fabbro F.: 2003. SVILUPPO DEL LINGUAGGIO IN BAMBINI SORDI TRATTATI CON IL METODO ORALE. *Saggi. Child Development and Disabilities*, 19(1) :25-39.
- Fabbro F, Vorano L, Fabbro S, Tavano A.: 2003. LANGUAGE DISORDERS FOLLOWING LESIONS TO THE THALAMUS AND BASAL GANGLIA. *Europa Medicophysica*, 38(4): 15-29.

### Attività previste

I partecipanti, selezionati sulla base di un protocollo di valutazione dello sviluppo del linguaggio (Fabbro 1999, Bearzotti e Fabbro 2003), saranno distribuiti per classi di età, dai 4 agli 11 anni, considerando il passaggio dalla scuola materna alla scuola elementare come una linea di demarcazione dello sviluppo evolutivo delle abilità verbali (vedi Tavano, De Fabritiis e Fabbro 2005). La distribuzione dei soggetti è la seguente, sia per la fascia dai 4 ai 6 anni che per la fascia dai 7 agli 11 anni: 100 soggetti controllo, 15 bambini con disturbo del linguaggio, 10 bambini con sindrome di Asperger, 10 bambini con sindrome di Williams, per un totale di 135 + 135 partecipanti. Le fasi del progetto sono le seguenti: 1) Identificazione e selezione dei soggetti per ciascun gruppo patologico (2 mesi); 2) Somministrazione del protocollo ai gruppi sperimentali; (5 mesi); 3) Analisi dei risultati. (5 mesi); 4) Continuazione della raccolta di dati normativi.

## UTILIZZO DEI PECS (PICTURE EXCHANGE COMMUNICATION SYSTEM) IN BAMBINI CON DISTURBO AUTISTICO

**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

2006

### Polo Scientifico

Ostuni

## DESCRIZIONE

Il PECS (Picture Exchange Communication System) è un sistema di comunicazione alternativa che è stato sviluppato per insegnare una comunicazione di tipo funzionale a bambini con deficit comunicativo e linguistico, in particolare a bambini con disturbo dello spettro autistico (DSA).

Pochi però sono stati gli studi (per la maggior parte americani) effettuati finora sulla reale efficacia di questo sistema nell'implementare le possibilità comunicative del DSA. In questi pochi studi (su case report singoli in prevalenza, o su pochi casi) sono emerse indicazioni interessanti sulle opportunità di uso di questo strumento nella riabilitazione del DSA (sia pure in aggiunta agli altri sistemi utilizzati).

È noto come la problematica comunicativa sia uno dei sintomi "core" dei DSA e del Disturbo Autistico in particolare e, come tale, difficilmente scardinabile, ma, nelle situazioni in cui vi sia un iniziale aggancio relazionale, un approccio comunicativo che aggiri la componente verbale può essere estremamente utile nel trattamento riabilitativo ed educativo di questi bambini. Il PECS è un sistema strutturato che potrebbe essere applicato in maniera poi più ampia in queste situazioni. Obiettivo di questa ricerca è quindi quello di individuare la reale efficacia del PECS nella riabilitazione del DSA e, in caso di risposta positiva, introdurre l'utilizzo nei protocolli terapeutici riabilitativi in uso per questa patologia, implementando questo con ausili ad alta e bassa tecnologia.

### Attività previste

Selezionare un campione di 11 bambini con Disturbo Autistico che afferiscono al Polo di Ostuni dell'IRCCS "E. Medea", e al Centro di Riabilitazione a questo annesso, di età compresa fra 3 e 10 anni, con importante penalizzazione comunicativa linguistica; effettuare una valutazione psicolinguistica di partenza delle capacità comunicative linguistiche, neuropsicologica e psicologica; avviare il trattamento mediante PECS con frequenza trisettimanale per 6 mesi; avviare la raccolta dei dati mediante videoregistrazione e l'analisi dei dati, effettuare una valutazione finale della competenza comunicativa linguistica.

Sarebbe poi auspicabile mantenere aperta la ricerca anche dopo il 1° anno, programmandone una continuazione per altri 2 anni con i seguenti obiettivi: studiare il comportamento del bambino con DSA nell'interazione con la macchina e, di conseguenza, i criteri di accessibilità all'uso di queste tecnologie nei diversi contesti; costruire e definire un protocollo di valutazione per stabilire i requisiti necessari ed essenziali per l'accesso all'uso delle basse ed alte tecnologie sia nei bambini con DSA che in altre patologie della comunicazione; proporre l'utilizzo della Comunicazione Aumentativa Alternativa nei protocolli terapeutici del DSA.

## CARATTERISTICHE NEUROFISIOPATOLOGICHE DELLE CEREBROPATIE EPILETTOGENE E NON EPILETTOGENE ASSOCIATE A CANALOPATIE

**DR. CLAUDIO ZUCCA**

e-mail: CLAUDIO.ZUCCA@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 4**

Neurofisiopatologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2006

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### DESCRIZIONE

Negli ultimi anni sono state dimostrate cause genetiche di quadri neurologici caratterizzati da compromissioni polidistrettuali, insufficienza mentale e forme di epilessia (E) ad insorgenza precoce, spesso refrattarie al trattamento farmacologico. In queste patologie in genere il dato neuroradiologico è poco significativo mentre sono presenti alterazioni neurofisiologiche di entità e caratteristiche variabili. In particolare è frequente la presenza di miocloni correlati o meno alle alterazioni EEGrafiche. Il Servizio di Neurofisiopatologia dell'IRCCS "E. Medea" si è occupato dello studio di sindromi epilettiche e cerebropatie (caratterizzate anche da manifestazioni parossistiche di natura non epilettica) associate a mutazioni di geni che codificano per canali e pompe della membrana neuronale. Ha inoltre collaborato con altri IRCCS nello studio delle caratteristiche neurofisiologiche di cerebropatie associate ad epilessia ed iperecitalità corticale. Questi studi tra l'altro hanno completamente modificato il tradizionale concetto di E idiopatiche geneticamente determinate un tempo considerate per definizione sindromi benigne ed età relate, evidenziando come forme di E a causa genetica e non sintomatiche di altre patologie neurologiche possano comunque essere caratterizzate da andamento e prognosi particolarmente sfavorevoli.

### Attività previste

L'attività di ricerca prenderà in esame pazienti affetti da cerebropatie, associate o meno ad epilessia, ad eziologia non definita. Sulla base dei dati clinici verranno selezionati i casi da sottopor-

re ad analisi molecolare per l'individuazione di mutazioni in geni che codificano per canali ionici. Nei pazienti in cui saranno dimostrate mutazioni di questo tipo i dati clinici e genetici verranno integrati con quelli ottenuti dalle indagini di neurofisiologia clinica.

In particolare verranno eseguite registrazioni EEG-poligrafiche utilizzando sistemi computerizzati di acquisizione e rielaborazione del segnale e potenziali evocati somatosensoriali. Verranno analizzate le caratteristiche EEG (struttura dell'attività di fondo sia in veglia che durante sonno, sede e tipologia delle anomalie epilettiformi), presenza e caratteristiche di fenomeni mioclonici correlati e non correlati con le alterazioni EEG, studio di eventuali ipereccitabilità corticali. L'analisi delle caratteristiche neurofisiologiche di questi pazienti permetterà una più precisa correlazione tra genotipo e fenotipo e contribuirà a precisare i meccanismi patogenetici alla base di queste sindromi neurologiche e le strutture anatomiche coinvolte.

*Lo scopo ultimo sarà:*

- 1) Individuare possibili eziologie genetiche di sindromi che associano compromissione neurologica e manifestazioni parossistiche epilettiche e non epilettiche.
- 2) Individuare nuove mutazioni presenti in quadri di epilessia criptogenica.
- 3) Correlare alcune caratteristiche neurofisiopatologiche con le alterazioni genetiche presenti in queste cerebropatie.

**Sottoprogetto: cerebropatie epilettogene in età evolutiva: studio clinico e ricerca di indicatori precoci di farmacoresistenza - Polo di Ostuni.**

### Razionale

La farmacoresistenza (FR) è uno dei maggiori problemi clinici nella gestione dell'epilessia. Molti studi hanno dimostrato che approssimativamente 1 paziente su 3 con epilessia ha crisi che non sono controllate in maniera soddisfacente dai farmaci antiepilettici.

Gli studi ad oggi effettuati in campo epilettologico, non hanno definito se la FR si sviluppa come risultato del processo di malattia o se già è presente al momento della prima crisi.

I meccanismi che la sottendono non sono ancora chiaramente individuati, sebbene si ipotizza una genesi multifattoriale non escludendo i fattori ambientali e genetici (Sisodya 2005).

Scarsi sono i dati e gli studi che valutino la FR su ampie casistiche, in soggetti in età evolutiva con epilessie sintomatiche, probabilmente a causa di

difficoltà metodologiche legate alla grande eterogeneità di queste forme di epilessia.

Lo studio proposto si articolerà in due fasi:

1<sup>^</sup> FASE (1° anno): analisi retrospettiva di una ampia casistica di pazienti infanto-giovanili affetti da epilessia sintomatica, giunti ad osservazione nelle nostre sedi di Ostuni, Brindisi e Lecce dal 1985 ad oggi. Verranno analizzate tutte quelle variabili clinico-strumentali e anamnestiche, personali e familiari che potrebbero essere considerate predittive di farmacoresistenza:

- sesso
- tipo di lesione
- età all'arruolamento
- età di insorgenza dell'epilessia
- frequenza e classificazione clinica delle crisi all'esordio
- frequenza e classificazione clinica delle crisi all'arruolamento
- EEG all'esordio
- EEG all'arruolamento
- risposta iniziale alla terapia antiepilettica
- precocità del trattamento (t di avvio della terapia dall'insorgenza dell'epilessia)
- risposta alla terapia antiepilettica all'arruolamento
- resistenza a 1 AED
- resistenza a 2 AED
- resistenza a 3 o più AED
- convulsioni febbrili
- CT o RMN, etc.
- quadro neurologico
- stato di male
- familiarità
- livello socio-economico

2<sup>^</sup> FASE: (1° e 2° anno) studio prospettico della risposta ai farmaci antiepilettici di tutti i pazienti in età evolutiva che giungeranno nei nostri ambulatori con nuova diagnosi di epilessia sintomatica allo scopo di identificare e confrontare con i dati dello studio retrospettivo, i fattori associati a un cattivo controllo delle crisi. Nell'ambito dei pazienti arruolati in questa fase si selezioneranno i casi da sottoporre allo studio genetico per l'individuazione di cause genetiche di farmacoresistenza (geni SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN8A, SCN1B, SCN2B).

### Risultati attesi

La FR rimane ancora controversa, non abbiamo ancora algoritmi terapeutici in grado di distinguere pseudoresistenze relative alla patologia, al paziente o alla terapia. L'individuazione di fattori che

consentono una prognosi clinico-terapeutica affidabile e quindi l'individuazione di situazioni di farmacoresistenza, ci permetterà fin dalle prime fasi della malattia epilettica una appropriata conduzione del caso e un corretto parere nei confronti del paziente e della famiglia, adeguati trattamenti farmacologici, l'avvio di accertamenti finalizzati a una precoce valutazione del trattamento chirurgico, eventualmente evitando un accanimento terapeutico.

Risolvere il problema FR significa certamente migliorare la qualità della vita del paziente epilettico nella misura in cui definiamo farmacoresistente il paziente "che non può avere uno stile di vita consistente con le proprie capacità a causa delle crisi, degli effetti collaterali dei farmaci antiepilettici e/o di problemi psicosociali".

## UTILIZZO DEL NITROSSIDO COME MEZZO FARMACOLOGICO PER OTTIMIZZARE LE TERAPIE CELLULARI DELLE DISTROFIE MUSCOLARI

**PROF. EMILIO CLEMENTI**

e-mail: EMILIO.CLEMENTI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2006

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### DESCRIZIONE

Le cellule satelliti, residenti nel muscolo scheletrico, sono responsabili della rigenerazione muscolare. Anche cellule staminali non residenti partecipano a questo processo: tra queste i mesoangioblasti, un tipo di cellule staminali del mesoderma che ha dimostrato potenzialità terapeutiche. Gli stessi studi hanno tuttavia dimostrato che è necessario migliorare la capacità delle cellule staminali di proliferare, differenziare e colonizzare in vivo il tessuto muscolare per raggiungere la soglia di efficacia terapeutica.

Obiettivo generale di questo studio, sviluppo della ricerca corrente degli anni 2003-2004, è valutare la possibilità di individuare nuovi approcci farmacologici, tra cui quelli attivi sui sistemi p75NTR/neccdin e nitrossido (NO) o in grado di migliorare la terapia cellulare in pazienti distrofici.

### Risultati conseguiti nei primi due anni di ricerca

I risultati dei primi due anni di questa ricerca sono stati molto incoraggianti, ed abbiamo definito aspetti cruciali del ruolo del nitrossido nella rigenerazione muscolare. In particolare i risultati, sottomessi per la pubblicazione a Journal of Cell Biology, dimostrano che l'NO, attraverso la generazione di GMP ciclico, attiva la trascrizione di folistatin. Questa proteina importante nella regolazione della trascrizione genica media la capacità di NO di aumentare la rigenerazione muscolare favorendo la fusione di mioblasti, cellule satelliti e mesoangioblasti. Inoltre, abbiamo identificato, nelle cellule satelliti e mesoangioblasti un sistema di segnalazione tipico delle cellule neuronali, il recettore p75NTR per le neurotrofine. Il ruolo di

questo recettore nel sistema muscolare è poco conosciuto, tuttavia la sua espressione è aumentata in corso di rigenerazione tissutale, come nel caso delle miositi a corpi inclusi. Inoltre topi p75NTR<sup>-/-</sup> mostrano segni di deficit muscolare, mentre i nostri dati indicano che p75NTR stimola la proliferazione ed il differenziamento di progenitori muscolari. Abbiamo inoltre evidenziato alcuni interattori di p75NTR a livello muscolare, in particolare necdin, un co-fattore trascrizionale che potrebbe essere importante nella fisiopatologia muscolare: la sua delezione nell'uomo è associata alla sindrome di Prader-Willi che, tra le manifestazioni cliniche, include ipotonia muscolare severa. Infine nostri studi hanno dimostrato che necdin è espresso durante la miogenesi scheletrica, che è essenziale per il differenziamento a muscolo liscio dei mesoangioblasti e che la sua espressione è controllata da Myf5 e Pax3, due geni regolatori della miogenesi.

### Attività previste

WP1 - Caratterizzeremo il ruolo di NGF/p75NTR e necdin nelle cellule satelliti ed in altri progenitori muscolari, utilizzando cellule derivate da topi w.t., necdin<sup>-/-</sup>, o overesprimenti la proteina (MIC1-Necdin) già disponibili in laboratorio. Caratterizzeremo inoltre il ruolo di NO in questo pathway di segnalazione. L'obiettivo verrà raggiunto valutando: i) proliferazione cellulare (incorporazione di Br-uridina, saggio MTT); ii) ciclo cellulare in cellule sincronizzate (mediante analisi in citometria a flusso); iii) differenziamento e capacità di formare miotubi durante incubazione in media differenziativi (valutazione morfologica, espressione di Myf5, MyoD, miosina); iv) capacità di fondersi a miotubi preesistenti (modello C2C12).

WP2 - Caratterizzeremo le vie di trasduzione del segnale di p75NTR/necdin ed il ruolo di NO in esse. L'obiettivo verrà ottenuto mediante saggi biochimici (fosforilazione, attivazione di chinasi, trascrizione genica) ed identificazione di possibili nuovi interattori mediante two-hybrid screening nelle cellule satelliti e in mesoangioblasti da topi w.t. e necdin<sup>-/-</sup>.

WP3 - Caratterizzazione del potenziale terapeutico di p75NTR/necdin ed NO. L'obiettivo verrà raggiunto attraverso due approcci distinti: nel primo studieremo, mediante generazione di doppi transgenici tra alfa-sarcoglicano<sup>-/-</sup> e MIC1-necdin o necdin<sup>-/-</sup>, come le capacità rigenerative e il fenotipo distrofico del topo alfa-sarcoglicano<sup>-/-</sup> siano modificate in seguito all'overespressione o al

knock-out di necdin nel muscolo e nelle cellule satelliti. Valuteremo se farmaci donatori di NO siano in grado di migliorare il fenotipo distrofico in questi animali.

Nel secondo approccio studieremo nel topo alfa-sarcoglicano<sup>-/-</sup> gli effetti di una terapia combinata con mesoangioblasti overesprimenti necdin e/o p75NTR, e della somministrazione di NGF e/o farmaci donatori di NO, inclusi il potenziale rigenerativo e il miglioramento del fenotipo distrofico.

### Risultati attesi

- Identificazione di interattori di necdin nella via di trasduzione attivata da p75NTR in cellule staminali (mesoangioblasti) e satelliti; caratterizzazione del ruolo svolto dagli interattori identificati in questa specifica via trasduttiva; ruolo di NO;
- comprensione del ruolo di p75NTR/necdin e della sua interazione con NO nella miogenesi e nella fisiologia delle cellule satelliti e di altri progenitori muscolari;
- identificazione del ruolo di p75NTR/necdin e di NO nel muscolo in vivo, con particolare attenzione agli aspetti di rigenerazione muscolare;
- ottimizzazione della terapia cellulare con mesoangioblasti mediante un approccio farmacologico combinato che sfrutti le proprietà del sistema p75NTR/necdin ed NO.

## VALUTAZIONE CLINICA, MODELLI CELLULARI E APPROCCIO TERAPEUTICO IN DIVERSE PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE E NEUROMOTORIE

**DR.SSA MARIA TERESA BASSI**

e-mail: MARIATERESA.BASSI@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Milano presso la Fondazione IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli Regina Elena Istituto Policlinico S. Donato

Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Messina

Dipartimento di Neurologia dell'Università di Padova.

## DESCRIZIONE

In questa proposta di ricerca corrente viene affrontato lo studio di diverse patologie neurodegenerative e/o neuromotorie sotto diversi aspetti: clinico, strumentale, genetico e funzionale.

Le patologie prese in considerazione coinvolgono un ampio spettro della casistica di pazienti afferenti a questo Istituto: 1) paraparesi spastiche, 2) ceroidolipofuscinosi, 3) forme familiari di SLA (ad esordio precoce), atassie episodiche. Per ciascuna di queste patologie sono stati affrontati aspetti diversi (come meglio specificato nelle sezioni successive) in base alle patologie specifiche, alle casistiche a disposizione per ciascuna di esse ed ai dati preliminari disponibili.

### 1) Paraparesi spastiche (HSP)

Le paraparesi spastiche ereditarie (HSP) sono un gruppo clinicamente e geneticamente eterogeneo di disturbi caratterizzati da spasticità progressiva agli arti inferiori associata ad ipostenia, disturbi vescicali e modesta riduzione della sensibilità vibratoria. Sono per convenzione distinte in: forme Pure e forme Complicate in relazione alla presenza o assenza di segni neurologici o non neurologici associati alla paraparesi

(atrofia ottica, retinopatia, segni extrapiramidali, amiotrofia, demenza, atassia, ritardo mentale, sordità, neuropatia periferica ed epilessia). Gli studi istopatologici mostrano un "dying back phenomenon" dipendente dalla lunghezza degli assoni del tratto cortico-spinale, del fascicolo gracile e del tratto spinocerebellare. L'obiettivo principale di questo studio è la caratterizzazione clinico-funzionale di un'ampia casistica di pazienti con paraparesi spastica, sia forme pure sia forme complicate, distribuiti su tutto il territorio nazionale tramite l'impiego di metodi di valutazione clinici, neuroradiologici e neurofisiologici associati a sistemi di valutazione del movimento complessi quali la Gait Analysis. Tali studi accompagnati da una approfondita valutazione genetico-molecolare nel complesso costituiranno le basi per protocolli di tipo valutativo diagnostico e funzionale per programmi riabilitativi e terapeutici (farmacologici e/o chirurgici), in considerazione della storia clinica dello specifico gruppo di HSP.

### 2) Ceroidolipofuscinosi

Le ceroidolipofuscinosi (CLN) sono tra le malattie degenerative progressive più comuni nel bambino. Il quadro clinico è caratterizzato essenzialmente da gravi anomalie dello sviluppo psicomotorio, problemi visivi piuttosto gravi fino a cecità completa, ritardo mentale ed epilessia che portano a morte precoce. Sono state riconosciute almeno 9 forme di CLN (CLN1-CLN9). I prodotti dei geni responsabili delle varie forme di CLN in via di caratterizzazione genetica, non suggeriscono un legame semplice tra genotipo e fenotipo, in quanto codificano per proteine con funzioni diverse in organuli diversi, che, tuttavia, dal punto di vista istopatologico e del quadro patogenetico cellulare, hanno caratteristiche comuni, quali la presenza di depositi intracellulari di lipopigmenti autofluorescenti, morte dei neuroni corticali per apoptosi, ed infiammazione gliale. Un aspetto importante ma non chiarito è il perché il danno cellulare si manifesti selettivamente in cellule di origine neuronale.

Gli obiettivi che ci eravamo riproposti di raggiungere sono i seguenti: caratterizzazione clinica e genotipica della casistica di pazienti; generazione linee cellulari immortalizzate da linfociti e/o fibroblasti di pazienti con forme note e non note, e comprensione del motivo per cui il danno cellulare si manifesti selettivamente in cellule di origine neuronale.

### 3) Modelli cellulari di patologie neurodegenerative

*tive, SLA (ad esordio precoce) e atassie episodiche*

Il progetto è partito dallo studio di due gruppi di pazienti: un gruppo di 10 soggetti con malattia del motoneurone a segregazione prevalentemente familiare, con insorgenza in età giovanile (ALS2 e JPLS), e l'altro è un gruppo di 10 pazienti con forme di atassia episodica (EA2) associate ad emicrania emiplegica.

La sclerosi primaria laterale (PLS) è una patologia rara e progressiva causata da alterazioni del primo motoneurone (UMN). Benché PLS sia una patologia prevalentemente sporadica ad esordio in età adulta, è stata anche una forma giovanile indicata come "juvenile PLS" o JPLS. Il gene responsabile di questa forma è ALS2, il quale è anche responsabile di forma recessiva di sclerosi laterale amiotrofica ad esordio precoce (ALS2), di paraparesi spastica ereditaria con esordio giovanile (IAHSP) e di una forma complicata di paraparesi spastica (cHSP). In uno di questi pazienti con sclerosi laterale primaria ad insorgenza giovanile si è identificata una nuova mutazione nel gene ALS2. Il gene ALS2 codifica una proteina chiamata alsina, comprendente vari domini con attività di "GTPase Exchange factors" o GEFs, con specificità per piccole GTPasi, in particolare quelle appartenenti alla famiglia Ras. Gli studi fino ad ora condotti sulla proteina wild type e su mutanti di delezione indicano un ruolo della stessa nella formazione e riciclo degli endosomi e nel ciclo cellulare essendo associata ai microtubuli.

La mutazione da noi identificata è di tipo missenso e rappresenta la prima mutazione di questo tipo identificata in questo gene. In esso sono infatti note solo mutazioni troncanti. Questa caratteristica ci ha indotto a condurre una accurata caratterizzazione funzionale del prodotto del gene ALS2 mutato.

Parallelamente in questo anno si è identificata anche una nuova mutazione missenso nel gene ALS4 responsabile sempre di forma ad esordio giovanile familiare di SLA con trasmissione autosomica dominante e di una forma recessiva di neuropatia associata ad atassia. Il prodotto di questo gene ALS4, chiamato senataxina è particolarmente interessante da studiare in quanto non si sa quasi nulla sulla sua funzione in vivo. L'unico dato presente in letteratura è la presenza di un dominio DNA-RNA elicastico che indurrebbe a ipotizzare un ruolo di questa proteina nei processi di replicazione e/o riparazione del DNA.

Il secondo gruppo di pazienti è rappresentato da

un gruppo molto eterogeneo di 10 casi familiari e sporadici, in cui si riscontrano in varia combinazione atassia episodica ed emicrania emiplegica. Questi casi sono stati analizzati da un punto di vista genetico molecolare per CACNA1A responsabile di EA2 e di emicrania emiplegica familiare di tipo I (FHMI).

### **Risultati conseguiti nel primo anno di ricerca**

1) Per quanto riguarda le paraparesi spastiche, nel primo anno di attività del progetto è stata raccolta un'ampia casistica di 129 pazienti in collaborazione con altri centri da tempo coinvolti nella diagnosi e nella cura delle patologie neurodegenerative, in particolare sia Poli de La Nostra Famiglia, quali la sezione di Conegliano e di Ostuni, sia centri esterni quali il Dip. di Neuroscienze dell'Univ. di Milano presso l'IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico, l'Istituto Policlinico S. Donato, il Dip. di Neuroscienze dell'Università di Messina e il Dip. di Neurologia dell'Università di Padova. Questa casistica è stata selezionata in base ai criteri di valutazione standard delle paraparesi spastiche secondo un protocollo brevemente riassunto qui di seguito:

- raccolta dettagliata dei dati anamnestici con attenzione alla storia familiare ed agli esami clinico-strumentali eseguiti;

- valutazione obiettiva neurologica e valutazione funzionale tramite l'utilizzo di scale internazionalmente riconosciute quali scala Ashworth, scala FIM o WeeFIM, Gross Motor Function Measure (GMFM) associate a sistemi tecnologicamente evoluti per l'analisi cinetica e cinematica del movimento (Gait analysis) e del consumo energetico durante l'attività stessa (Cosmed K4 System).

Sono stati quindi condotti studi sia di tipo clinico-funzionale-strumentale sia di tipo genetico molecolare.

I dati preliminari ottenuti su 12 pazienti per la parte funzionale-strumentale in particolare l'esame del cammino, Gait analysis (Elite Biomech), ha evidenziato dei pattern tipici di iperestensione di ginocchio in mid-terminal stance di durata ed entità maggiore rispetto al pattern di diparesi (da esiti di sofferenza neonatale) e non legato ad aumento coppia plantiflessione/estensione ginocchio. In alcuni dei soggetti era documentabile un'aumento dell'area della base di appoggio a supporto della presenza di segni di coinvolgimento cerebellare.

Parallelamente per la parte genetico molecolare sono stati ottenuti dati su una più ampia casisti-

ca di 60 pazienti: 50 affetti da paraparesi spastica pura (5 forme familiari e i rimanenti sporadici) e 10 da forme complicate (tutti sporadici).

Sono state individuate 12 mutazioni nel gene SPG4 di cui 8 nuove (Crippa F et al. Archives of Neurology 2006 in press), 3 mutazioni in SPG7 di cui due ancora in fase di caratterizzazione e una mutazione già nota in SPG17. E' in corso il completamento dell'analisi della casistica già esistente per gli altri geni già noti, parallelamente all'analisi di nuovi casi che verranno selezionati durante il prossimo anno di attività.

2) Nell'ambito dello studio delle ceroidolipofuscinosi, il lavoro svolto nel primo anno della ricerca corrente ha portato alla identificazione di una possibile nuova forma di CLN non descritta finora. Questo in sé giustifica l'ulteriore studio genetico e biochimico che ci ripromettiamo di effettuare nel secondo anno di lavoro, perché la definizione delle caratteristiche di questa nuova forma può contribuire a chiarire aspetti della patogenesi finora ignota della malattia. Inoltre è stata identificata una nuova mutazione nel gene CLN8, delezione di tre basi in emi/omozigosi, in una famiglia con una forma di ceroidolipofuscinosi clinicamente poco definita. È quindi in corso la espressione della proteina CLN8 mutata per definire una correlazione tra genotipo e quadro clinico atipico.

Abbiamo inoltre disegnato un modello sperimentale adeguato al raggiungimento dell'obiettivo "comprensione del perché il danno cellulare si manifesta selettivamente in cellule di origine neuronale". Abbiamo utilizzato la linea cellulare di origine neuronale P19 il cui differenziamento a neurone indotto da acido retinoico può essere finemente monitorato attraverso la comparsa/scomparsa di specifici marcatori proteici (quali proteine di trasporto, migrazione, ed elongazione di assoni e/o dendriti, e proteine del sistema di secrezione di neurotrasmettitori). Abbiamo preparato cloni transfettati con il sistema inducibile sensibile alla tetraciclina tet-on. In questi cloni verranno espressi in modo inducibile silenziatori ad RNA specifici per CLN 1, CLN2, CLN 6 e CLN 8. Le sequenze RNA atte al silenziamento sono in fase di caratterizzazione per CLN1, 6, ed 8 ed identificate per CLN 2.

3) I risultati ottenuti dalla caratterizzazione del prodotto genico di ALS2 mutato sono in breve l'identificazione di alcuni effetti legati alla mutazione stessa e di una funzione fino ad ora sconosciuta della proteina wild type. La proteina mutante infatti delocalizza rispetto alla proteina

normale e come conseguenza di ciò perde la sua funzione antiapoptica per acquisire invece una funzione chiaramente pro-apoptica inducendo morte cellulare in vitro (Panzeri C, et al. Brain 2006 in press).

La mutazione da noi identificata in ALS4 è localizzata esternamente al dominio elicastico, in una porzione della proteina a funzione ignota ed è quindi difficile ipotizzare quale possa essere l'effetto della mutazione sulla funzionalità della proteina stessa. La caratterizzazione della forma mutata che ripropone di fare dovrebbe dare indicazioni in tal senso.

In un caso di atassia del tronco, non episodica ma lentamente progressiva è stata identificata una nuova mutazione in CACNA1A la cui caratteristica più rilevante dal punto di vista clinico è l'età di insorgenza molto precoce della malattia. Casi di questo genere sono normalmente associati ad espansione del tripletta CAG nel 3'codificante del gene CACNA1A. Nel nostro caso invece l'analisi di espansione della tripletta CAG ha dato esito negativo. Inaspettatamente è stata invece evidenziata una mutazione di tipo dissenso; questo tipo di mutazione normalmente è associata a forme di atassia episodica con emicrania emiplegica. Le caratteristiche della mutazione identificata associate a questo particolare quadro clinico hanno reso la mutazione stessa particolarmente interessante e degna di nota (Tonelli A et al. J Neurol Sci 2006).

### Prodotti

- Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, Baschiroto C, Vazza G, Mostacciuolo M L, Daga A, Orso G, Profice P, Trabacca A, D'Angelo M G, Comi G P, Galbiati S, Lamperti C, Bonato S, Pandolfo M, Meola G, Musumeci O, Toscano A, Trevisan CP, Bresolin N, Bassi MT (2006). EIGHT NOVEL MUTATIONS IN SPG4 IN A LARGE SAMPLE OF PATIENTS WITH HEREDITARY SPASTIC PARAPLEGIA. *Arch Neurol (in press)*
- Tonelli A, D'Angelo MG, Salati R, Villa L, Germinasi C, Frattini T, Meola G, Turconi AC, Bresolin N, Bassi MT. EARLY ONSET, NON FLUCTUATING SPINOCEREBELLAR ATAXIA AND A NOVEL MISSENSE MUTATION IN CACNA1A GENE. *J Neurol Sci. 2006 Feb 15;241(1-2):13-7.*
- Panzeri C, De Palma C, Martinuzzi A, Daga A, De Polo G, Bresolin N, Miller CC, Tudor E, Clementi E, Bassi MT. (2006). THE FIRST ALS2 MISSENSE MUTATION ASSOCIATED

TO JPLS REVEALS NEW ASPECTS OF ALSIN BIOLOGICAL FUNCTION. *Brain (in press)*.

### Attività previste

1) Paraparesi spastiche: obiettivi da un punto di vista clinico per il prossimo anno sono rappresentati dalla continuazione della raccolta di casistica e valutazione da un punto di vista clinico funzionale di almeno 100 soggetti, numero sufficiente per avere dati di valutazione strumentale statisticamente significativi.

Per quanto riguarda la parte di valutazione genetico molecolare gli obiettivi per il prossimo anno di attività sono: a) il completamento dell'analisi di mutazione di SPG4 e SPG7 nei nuovi casi reclutati e avvio di analisi di mutazioni in altri geni noti (SPG6,10,13,21) sia per le forme pure sia per le forme complicate nei casi in cui non è stata fino ad ora identificata nessuna mutazione; b) completamento della caratterizzazione delle mutazioni in SPG7 identificate; c) analisi di mutazione di un gene candidato per le forme complicate nei casi risultanti negativi per SPG7. Il candidato in questione è un gene omologo a SPG7, AFG3L2 il cui prodotto proteico ha localizzazione mitocondriale e che è stato dimostrato interagire fisicamente con la paraplegina.

2) Ceroidolipofuscinosi: a) analisi di segregazione della mutazione identificata (delezione di tre basi in emi/omozigosi) e definizione dello stato della stessa (se omo o emizigosi); analisi della proteina CLN8 mutante (identificata nel paziente come sopra descritto). Valutazione della sua localizzazione cellulare con particolare attenzione ai compartimenti del reticolo endoplasmatico dove è noto essere localizzata la forma wild type. Dato il tipo di mutazione in esame, in base ai dati ottenuti si valuterà se effettuare ulteriori studi funzionali sulla proteina stessa; b) analisi del pattern di espressione della linea cellulare linfoblastoide dal paziente con una forma di ceroidolipofuscinosi non ben classificata e la cui alterazione genetica non è nota. I dati ottenuti verranno confrontati con quanto è stato recentemente pubblicato relativo alla forma CLN9 definita clinicamente ma di cui non è noto il difetto genico. Analisi di geni nuovi coinvolti in forme di CLN non classificate, che verranno eventualmente pubblicati nel corso di questo anno di attività; c) nel secondo anno di attività si propone inoltre di completare la costruzione del modello sperimentale di differenziamento di cellule P19 con silenziamento dei geni CLN1, 6, 8 e CLN 2 e validarlo definitivamente e quindi di valutare se il silenziamento dei geni CLN nel-

le varie fasi del differenziamento della linea P19 comportino variazioni significative nel pattern del differenziamento stesso.

3) Obiettivi per il prossimo anno sono i seguenti: a) creazione di una linea cellulare neuronale stabilmente esprimente ALS2 mutata per il completamento della caratterizzazione della funzione della proteina mutata in particolare la funzione nota più specificamente legata all'alsina che è rappresentata dall'attività di legame alle piccole GTPasi agendo come GEF (guanine nucleotide exchange factor) per RAB5. Si vuole verificare se la delocalizzazione della proteina mutata da noi identificata comporta anche una perdita specifica di attività GEF per RAB5; b) studio dell'effetto di agenti protettori da apoptosi sull'attività di alsina normale e mutata; c) generazione di una linea cellulare linfoblastoide dal paziente con la mutazione nel gene ALS2 in omozigosi e da un carrier asintomatico con la mutazione in eterozigosi. Caratterizzazione delle due linee linfoblastoidi per quei parametri (localizzazione subcellulare e sensibilità ad agenti induttori di morte cellulare) già definiti per la linea neuronale in modo tale da verificare se anche un modello cellulare da tessuto periferico può essere utilizzato come modello di questa patologia neurodegenerativa; d) caratterizzazione della nuova mutazione identificata in ALS4. Il prodotto di questo gene chiamato senataxina è particolarmente interessante da studiare in quanto non si sa quasi nulla sulla sua funzione in vivo. L'unico dato presente in letteratura è la presenza di un dominio DNA-RNA elicastico che indurrebbe a ipotizzare un ruolo di questa proteina nei processi di replicazione e/o riparazione del DNA. Si intende quindi esprimere la proteina normale e mutata in una linea cellulare neuronale e studiarne anzitutto la localizzazione subcellulare. In base ai dati ottenuti si potrà quindi ipotizzare un suo possibile ruolo funzionale e testare di conseguenza ipotesi sulla sua funzione nella patogenesi di questa forma specifica di SLA.

## ANALISI DI BREAK POINT IN RIARRANGIAMENTI CROMOSOMICI RICORRENTI E NON: STUDIO CITOGENETICO, MOLECOLARE, BIOINFORMATICO E VERIFICA SPERIMENTALE ATTRAVERSO L'USO DI ORGANISMI MODELLO

**DR. ROBERTO GIORDA**

e-mail: ROBERTO.GIORDA@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Dipartimento di Genetica Medica, Università di Pavia

Laboratorio di Citogenetica, Istituto G.Gaslini, Genova

### DESCRIZIONE

I riarrangiamenti cromosomici (delezioni, duplicazioni, traslocazioni) sono cause importanti di tumori e malattie ereditarie, e sono stati oggetto di intenso studio. Questi riarrangiamenti sono distribuiti in modo non casuale lungo il genoma umano. Una ragione di ciò è data dal fatto che nei tumori vengono selezionati riarrangiamenti che conferiscono un vantaggio di crescita alla cellula affetta, mentre tra i riarrangiamenti nella linea germinale sono solitamente rilevati solo quelli che causano un fenotipo patologico nel portatore o nei suoi discendenti. Una seconda ragione è la presenza di "hotspots" di ricombinazione che sono stati associati con alcuni riarrangiamenti sia ricorrenti che sporadici; queste sequenze di DNA promuovono o una ricombinazione omologa ineguale o una ricombinazione non omologa. Le ricombinazioni omologhe sono mediate da regioni paraloghe su cromosomi omologhi o non omologhi, e generano una varietà di delezioni, duplicazioni e traslocazioni. Le ricombinazioni non omologhe ricorrenti sembrano essere correlate alla presenza di specifiche sequenze potenzialmente instabili, la cui instabilità è spesso dovuta alla presenza di sequenze ripetute clusterizzate chiamate Low Copy Repeats (LCR). Gli sforzi dedicati all'analisi di punti di rottu-

ra delle traslocazioni non ricorrenti sono stati minori, perchè essi avvengono con minore frequenza, sono qualche volta più difficili da scoprire, e fino a pochi anni fa la loro caratterizzazione molecolare era tecnicamente ardua. Noi raccoglieremo e analizzeremo informazioni sui punti di rottura di una casistica di traslocazioni non ricorrenti scoperte durante l'iter diagnostico di soggetti afferenti al nostro Istituto, insieme ad altri casi inviati da laboratori esterni. Le traslocazioni saranno analizzate mediante tecniche di citogenetica molecolare per definire i punti di rottura con una approssimazione di 50-100 Kilobasi; in seguito i punti di rottura verranno definiti, mediante long-range PCR o generando cloni ibridi uomo-hamster, e sequenziati. L'informazione ottenuta sarà utilizzata per analizzare, mediante tecniche bioinformatiche, i motivi strutturali specifici delle regioni coinvolte nei riarrangiamenti. Analisi precedenti hanno indicato che le rotture del DNA a doppio filamento (DSB, double strand breaks) sono responsabili, nel genoma dei mammiferi, di dare inizio sia agli eventi di ricombinazione omologa (non patologici) sia a quelli di ricombinazione illegittima. In particolare nel genoma umano, i DSB sono riparati attraverso un pathway denominato NHEJ (nonhomologous end joining) ovvero attraverso la giunzione di estremità non omologhe. I dati da noi ottenuti in seguito al sequenziamento dei punti di rottura nel gene della distrofina umano (DMD) e in alcune traslocazioni bilanciate hanno indicato che il NHEJ è il pathway cellulare implicato nella formazione dei riarrangiamenti. Da quanto detto consegue che, con alta probabilità, l'evento iniziale nell'instaurarsi delle rotture cromosomiche sia, in un alto numero di casi, la formazione di DSB. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto, grazie alla collaborazione con il Prof. D.K. Nag (Wadsworth Center, Albany, NY, USA) un sistema sperimentale basato sull'uso di cellule di lievito (l'unico organismo in cui sia possibile indurre la meiosi) per lo studio delle sequenze coinvolte nella formazione di rotture a doppio filamento nel genoma di mammifero. In particolare tale approccio ha fornito importanti informazioni riguardo alla capacità di una sequenza costituita da ripetizioni CAG (la cui espansione, nell'uomo, è responsabile di diverse patologie quali ad esempio la Corea di Huntington e alcune forme di atassia spinocerebellare) di indurre rotture cromosomiche e di spiegare, quindi, il meccanismo molecolare alla base delle espansioni di tripletta CAG. Lo stesso approccio potrebbe quindi essere impiegato per analizzare la capacità di sequenze presenti a livello dei breakpoint identificati di indurre DSB e, quindi, di

definire gli eventi molecolari implicati nella formazione dei riarrangiamenti.

### Risultati e prodotti conseguiti nel primo anno di ricerca

Abbiamo raccolto e analizzato informazioni sui punti di rottura di una casistica di traslocazioni non ricorrenti scoperte durante l'iter diagnostico di soggetti afferenti al nostro Istituto, insieme ad altri casi inviati da laboratori esterni. Le traslocazioni sono state analizzate mediante tecniche di citogenetica molecolare per definire i punti di rottura con una approssimazione di 50-100 Kilo-basi; poi i punti di rottura sono stati definiti, mediante long-range PCR o generando cloni ibridi uomo-hamster, e sequenziati. Nel 2005 sono stati analizzati riarrangiamenti cromosomici sia ricorrenti (1, 2, 5) che non ricorrenti (3, 4, 6-8). "Hotspots" di ricombinazione sono stati associati con alcuni riarrangiamenti sia ricorrenti che sporadici; queste sequenze di DNA promuovono ricombinazione omologa ineguale o ricombinazione non omologa. Le ricombinazioni omologhe sono mediate da regioni paraloghe su cromosomi omologhi o non omologhi, e generano una varietà di delezioni, duplicazioni e traslocazioni. Le ricombinazioni non omologhe ricorrenti sembrano essere correlate alla presenza di specifiche sequenze potenzialmente instabili, la cui instabilità è spesso dovuta alla presenza di sequenze ripetute clusterizzate chiamate Low Copy Repeats (LCR). Alcuni dei casi da noi analizzati (1, 2, 5) sono riconducibili a questa problematica. In particolare, è stato individuato un punto di rottura ricorrente in soggetti con sindrome da delezione 22q13 contenente una sequenza ripetuta strutturalmente complessa (1) che sarà utilizzata per esperimenti in un modello di lievito. Proseguono le analisi molecolari su altri riarrangiamenti ricorrenti riconducibili agli stessi elementi genomici analizzati in (2, 5). L'analisi dei motivi strutturali coinvolti nei riarrangiamenti non ricorrenti è tuttora in corso.

- Bonaglia MC, Giorda R, Mani E, Aceti G, Anderlid BM, Baroncini A, Pramparo T, Zuffardi O. IDENTIFICATION OF A RECURRENT BREAKPOINT WITHIN THE SHANK3 GENE IN THE 22Q13.3 DELETION SYNDROME. *J Med Genet*. 2005 Nov 11; [Epub ahead of print] PMID: 16284256
- Ciccone R, Mattina T, Giorda R, Bonaglia MC, Rocchi M, Pramparo T, Zuffardi O. INVERSION POLYMORPHISMS AND NON-CONTIGUOUS TERMINAL DELETIONS: THE CAUSE AND

(UNPREDICTED) EFFECT OF OUR GENOME ARCHITECTURE. *J Med Genet* (in press).

- Gimelli G, Giorda R, Beri S, Gimelli S, Zuffardi O. A 46,X,inv(Y) YOUNG WOMAN WITH GONADAL DYSGENESIS AND GONADOBLASTOMA: CYTOGENETICS, MOLECULAR AND METHYLATION STUDIES. *Am J Med Genet* 2006 140:40-45.
- Bocciardi R, Giorda R, Marigo V, Zordan P, Montanaro D, Gimelli S, Seri M, Lerone M, Ravazzolo R, Gimelli G. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF A T(2;6) BALANCED TRANSLOCATION ASSOCIATED WITH COMPLEX PHENOTYPE AND LEADING TO THE TRUNCATION OF THE TCBA1 GENE. *Hum Mutat*. 2005 26:426-436.
- De Gregori M, Pramparo T, Memo L, Gimelli G, Messa J, Rocchi M, Patricelli MG, Ciccone R, Giorda R, Zuffardi O. DIRECT DUPLICATION 12P11.21-P13.31 MEDIATED BY SEGMENTAL DUPLICATIONS: A NEW RECURRENT REARRANGEMENT? *Hum Genet* 2005 118:207-213. Epub 2005 Nov 15.
- Pramparo T, Grosso S, Messa J, Zatterale A, Bonaglia MC, Chessa L, Balestri P, Rocchi M, Zuffardi O, Giorda R. LOSS-OF-FUNCTION MUTATION OF THE AF9/MLLT3 GENE IN A GIRL WITH NEUROMOTOR DEVELOPMENT DELAY, CEREBELLAR ATAXIA, AND EPILEPSY. *Hum Genet*. 2005 118:76-81. Epub 2005 Oct 28.
- Ciccone R, Giorda R, Gregato G, Guerrini R, Giglio S, Carrozzo R, Bonaglia MC, Priolo E, Lagana C, Tenconi R, Rocchi M, Pramparo T, Zuffardi O, Rossi E. RECIPROCAL TRANSLOCATIONS: A TRAP FOR CYTOGENETISTS? *Hum Genet*. 2005 117:571-582. Epub 2005 Jul 23.
- Bonaglia MC, Giorda R, Tenconi R, Pessina M, Pramparo T, Borgatti R, Zuffardi O. (2005) A 2.3 MB DUPLICATION OF CHROMOSOME 8Q24.3 ASSOCIATED WITH SEVERE MENTAL RETARDATION AND EPILEPSY DETECTED BY STANDARD KARYOTYPE. *Eur J Hum Genet* 13:586-591.

### Attività previste

Analisi citogenetica e molecolare di riarrangiamenti cromosomici patologici; generazione di linee immortalizzate di linfociti di soggetti affetti; clonaggio dei punti di rottura; analisi dell'espressione di geni coinvolti in coltura e in tessuti; costruzione di modelli di ricombinazione in lievito; analisi bioinformatica dei punti di rottura.

## SVILUPPO DI UN MODELLO DI EPILESSIA MIOCLONICA GIOVANILE IN DROSOPHILA

**DR. ANDREA DAGA**

e-mail: ANDREA.DAGA@CN.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 5

Neurobiologia

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Conegliano

### Collaboratori:

University of California Los Angeles (Delgado Escueta A.)

Trinity College Dublino, Irlanda (Ramawami M.)

### DESCRIZIONE

Il progetto si sviluppa con un programma pluriennale ed è nato con il rationale di contribuire a chiarire la fisiopatologia molecolare di una forma di epilessia genetica giovanile (la mioclono epilessia giovanile) causata da mutazione del gene EFHC1. In questo progetto si utilizza la *Drosophila*, il cui genoma contiene due geni ortologhi a EFHC1, per comprendere la funzione di questa nuova famiglia di proteine analoghe a EFHC1 e per creare un modello di malattia che attualmente non è ancora disponibile per nessun organismo.

### Risultati e prodotti conseguiti nel primo anno di ricerca

Gli obiettivi per il 2005 erano i seguenti:

1. condurre un'analisi del profilo di espressione nel corso dello sviluppo e della localizzazione subcellulare delle proteine codificate dai geni CG8959 e CG11048, omologhi al gene umano EFHC1 la cui mutazione causa epilessia mioclonica giovanile. Per realizzare questo obiettivo eseguiremo "mRNA in situ hybridization" a diversi stadi di sviluppo per determinare la distribuzione dei trascritti. Inoltre, genereremo anticorpi policlonali contro le proteine codificate da CG8959 e CG11048 per determinarne l'espressione nel corso dello sviluppo e la localizzazione a livello cellulare e subcellulare.
2. Determinare il ruolo di CG8959 e CG11048 nella funzione e/o sviluppo della sinapsi uti-

lizzando la giunzione neuro-muscolare di *Drosophila* come modello. A questo scopo si doveva:

- 2.1. generare mutanti loss of function per entrambi i geni utilizzando sia la tecnologia del RNA interference (già in precedenza usata con successo) sia una recente tecnica che consente di creare knock-outs in *Drosophila*;
- 2.2. creare linee transgeniche che consentono la sovraespressione dei geni CG8959 e CG11048 (questo è in parte già stato fatto);
- 2.3. utilizzare i reagenti genetici ottenuti in 2.1 e 2.2 e quelli già disponibili per esplorare le interazioni genetiche tra alleli loss e gain of function di CG8959 e CG11048 e mutazioni in geni che si sa essere coinvolti nella formazione o funzione delle sinapsi.

### Risultati e Prodotti 2005

1. L'obiettivo 1 è stato in gran parte realizzato perché abbiamo generato anticorpi policlonali contro le proteine codificate dai geni CG8959 e CG11048. Entrambi gli anticorpi sono stati provati su cellule S2 di *Drosophila* trasfettate con costrutti appropriati ed è stato verificato che questi anticorpi riconoscono specificamente il proprio antigene. Gli anticorpi sono stati utilizzati per definire il profilo di espressione delle proteine di interesse nella larva. Entrambe le proteine sono espresse a livello di giunzione neuromuscolare, apparentemente sul versante pre-sinaptico. CG11048 è espressa in tutte le giunzioni, mentre CG8959 risulta specificamente espressa nei bottoni di tipo 3 (giunzione neuromuscolare del muscolo 12 di ogni segmento). Al momento non è chiara la connotazione funzionale che corrisponde a questa diversa localizzazione. Resta anche da definire il profilo di espressione embrionale e nel SNC dell'adulto.

2. L'obiettivo 2 è anch'esso in parte realizzato. Per quanto riguarda il punto 2.1, abbiamo ottenuto individui transgenici per un costrutto per RNA interference del gene CG11048. Questi transgenici sono ora in corso di valutazione per verificare l'efficacia dell'interference. I transgenici per la RNA interference di CG8959 sono stati generati e sono in corso di analisi.

Allo stesso tempo abbiamo stabilito una collaborazione con il laboratorio di Dana Carroll alla University of Utah per utilizzare un nuovo protocollo per la mutagenesi mirata dei due geni CG8959

e CG11048. Sono stati generati i costrutti e sono in corso gli esperimenti di trasformazione per ottenere animali mutagenizzati.

Per quanto riguarda il punto 2.2, abbiamo generato alcune linee transgeniche per CG8959 dopo aver già ottenuto ed analizzato transgenici per CG11048. I transgenici CG8959 ad una prima analisi risultano presentare caratteristiche fenotipiche simili ai transgenici per CG11048.

### Attività previste:

Nel corso di questo anno ci si propone di proseguire il lavoro puntando ai seguenti obiettivi:

1. Completare lo studio del profilo di espressione dei due geni sia nell'embrione che nei tessuti adulti; definire con più precisione la localizzazione delle proteine CG8959 e CG11048 a livello della sinapsi neuromuscolare. In particolare saranno eseguiti esperimenti di immunostochimica con anticorpi specifici per determinare se le proteine siano presenti nel comparto pre o post-sinaptico. Naturalmente la localizzazione subsinaptica ha importanti implicazioni funzionali.
2. Definizione funzionale del ruolo dei due geni mediante:
  - a. Analisi del pattern di espressione di altri geni importanti per la struttura e/o funzione della giunzione neuromuscolare in condizioni di sovra-espressione e, se possibile, di knock-down o knock-out dei geni CG11048 e CG8959. A questo scopo saranno condotti esperimenti di immunostochimica con vari anticorpi disponibili contro proteine sinaptiche note per determinare se condizioni di eccesso o di carenza delle proteine CG8959 e CG11048 producano variazioni nel livello di espressione o localizzazione di proteine sinaptiche importanti.
  - b. Studio neurofisiologico del segnale sinaptico nei vari transgenici da eseguirsi in collaborazione con il Prof Ramaswami, un elettrofisiologo esperto di *Drosophila* il cui laboratorio è al Trinity College di Dublino, Irlanda.
3. Generazione di transgenici per l'espressione delle proteine CG8959 e CG11048 contenenti una mutazione patologica. La mutazione che introdurremo è l'unica tra quelle finora identificate nei pazienti, che riguarda un residuo amioacidico conservato in entrambe le proteine di *Drosophila* e in EFHC1 umana. I fenotipi causati dall'espressione, in particolare a livello del sistema nervoso ma non solo, delle proteine mutate saranno analizzati sia dal punto di vista comportamentale sia dal punto di vista morfologico, strutturale e funzionale della giunzione neuro-muscolare. Questi esperimenti saranno cruciali per stabilire un modello animale di epilessia mioclonica giovanile in *Drosophila*.
4. Analisi delle linee transgeniche per il knockdown dell'espressione di CG8959 e CG11048 mediato da RNA interference. Queste linee sono già disponibili e gli anticorpi da noi generati contro CG8959 e CG11048 saranno usati per determinare l'efficacia del knockdown sia mediante western blot sia mediante immunostochimica.
5. Generazione di animali knock-out utilizzando il sistema di gene-targeting ideato da Gong and Golic, 2003. La generazione di un vero mutante genetico è fondamentale per poter analizzare il fenotipo di completa loss of function per CG8959 e CG11048. Infatti, anche se gli esperimenti di RNA interference dovessero funzionare, la probabilità che l'espressione delle proteine CG8959 e CG11048 sia completamente eliminata è minima.

## ATASSIE: VALUTAZIONE CLINICO-STRUMENTALE E ANALISI GENETICA DI UN'AMPIA CASISTICA DI PAZIENTI. STUDIO DI MODELLI CELLULARI E ANIMALI

**PROF. NEREO BRESOLIN**

e-mail: NEREO.BRESOLIN@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2006

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

**Collaborazioni**

Dip. Scienze Neurologiche, Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli Regina Elena.

### DESCRIZIONE

Le atassie ereditarie sono un gruppo eterogeneo di patologie neurologiche caratterizzate da progressiva degenerazione del cervelletto e/o delle vie cerebellari afferenti ed efferenti.

Il termine atassia, dal greco *ataxia* = "senza ordine", descrive un insieme di segni clinici costituiti da incoordinazione motoria degli arti, alterazioni dell'equilibrio, della postura e della deambulazione, anomalie dell'oculomotricità e disartria. Negli ultimi anni i progressi sulla comprensione dei meccanismi patogenetici ha sensibilmente aumentato l'interesse per questo gruppo di patologie neurodegenerative.

Le atassie ereditarie possono essere classificate, in base alla modalità di trasmissione, in autosomiche dominanti, autosomiche recessive, X-linked e mitocondriali.

Le atassie recessive esordiscono generalmente nell'infanzia o nell'adolescenza e sono spesso patologie multisistemiche per cui ai segni neurologici si accompagnano alterazioni cardiache, disfunzioni endocrino-metaboliche ed immunitarie. I meccanismi mutazionali responsabili delle atassie recessive meglio caratterizzate sono principalmente due: riduzione o perdita di funzione del prodotto del gene mutato, come avviene per la fraataxia nell'atassia di Friedreich, oppure alterazione dei meccanismi di processamento e riparazione del DNA, come nell'Atassia-teleangiectasia.

Le atassie dominanti vengono suddivise in due gruppi: le atassie spinocerebellari (SCA, *Spinocerebellar Ataxias*) e le atassie episodiche (EA, *Episodic Ataxias*).

Le SCA hanno un'incidenza di circa 2-3/100.000 e, a dispetto di una relativa somiglianza del quadro clinico, sono estremamente eterogenee dal punto di vista genetico. Dal clonaggio del gene SCA1, avvenuto circa dieci anni fa, ad oggi sono state identificate ventotto forme diverse di SCA. Per gran parte di queste è stato indentificato il locus associato e per una decina è stato identificato il gene con la relativa mutazione. Le SCA 1-3, 6, 7, 12 e 17 appartengono al gruppo delle patologie da poliglutammine, sono cioè causate dall'espansione di un tratto ripetuto CAG nella regione codificante del rispettivo gene. Tale espansione viene tradotta in un tratto poliglutamminico che conferisce alla proteina mutata una nuova funzione (*gain of toxic function*) che risulta tossica per specifici tipi cellulari ed in particolare per le cellule del Purkinje della corteccia cerebellare. Clinicamente le SCA sono caratterizzate da esordio in età adulta con atassia progressiva della statica e del cammino, atassia degli arti, nistagmo e disartria. Sintomi neurologici aggiuntivi quali sofferenza retinica, neuropatia periferica, disturbi extrapiramidali, deterioramento mentale ed epilessia sono presenti in varie combinazioni e con frequenza variabile nelle diverse forme. Nonostante lo sviluppo di modelli animali e cellulari abbia permesso di progredire notevolmente nella comprensione della patogenesi delle patologie da poliglutammine, numerosi punti oscuri attendono ancora di essere chiariti, soprattutto nell'ottica di una terapia risolutiva.

### Attività previste

- Raccolta, classificazione e caratterizzazione di un'ampia casistica di pazienti affetti da atassia cerebellare ereditaria, con particolare attenzione alle forme autosomiche dominanti.
- Analisi genetica della casistica selezionata.
- Studio della via di traduzione del segnale mediata dalla sfingomielinasi acida e dagli sfingolipidi, un aspetto potenzialmente rilevante nella morte delle cellule del Purkinje in differenti gruppi di patologie neurodegenerative.

### Metodologia

- La raccolta della casistica sarà effettuata sia tramite una rivalutazione di pazienti atassici già afferiti in passato alle diverse sedi dell'IRCCS, sia attraverso la presa in carico di nuovi casi.

La selezione dei pazienti provenienti dalle altre sedi verrà effettuata in prima istanza tramite l'invio di un questionario informativo riguardante la storia clinica, la sintomatologia e gli eventuali esami strumentali eseguiti dai pazienti con atassia e seguiti dai colleghi dei vari poli.

La caratterizzazione della casistica sarà condotta attraverso l'applicazione di un protocollo clinico-strumentale così articolato:

1) Raccolta dettagliata dei dati anamnestici con particolare attenzione alla familiarità per patologie neurologiche e cognitivo-psichiatriche, al parto e periodo perinatale, all'acquisizione delle tappe dello sviluppo psico-motorio e all'eventuale sintomatologia non neurologica associata.

2) Valutazione neurologica: obiettività neurologica completa con particolare attenzione alla semeiotica del sistema spino-cerebellare completata da una valutazione quantitativa dell'atassia mediante somministrazione di scale specifiche: ICARS (International Cooperative Ataxia Rating Scale), SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia).

Valutazione fisiologica: valutazione funzionale tramite l'utilizzo di scale quali la Gross Motor Function Measure (GMFM) per una valutazione della funzione motoria globale associata a filmato del cammino e Gait analysis (Elite Biomech).

3) Esami ematochimici ed urinari: CPK, elettroforesi sieroproteica, assetto lipidico, elettroliti, indici infiammatori, lattato, Ig, funzionalità tiroidea con Ab Anti-TPO e anti-TG, dosaggio vitamina B12 e folati, vitamina E, eventuale ricerca Ab AGA-EMA dosaggio di aminoacidi ed acidi organici urinari.

4) Neuroimaging: TAC encefalo e/o RMN encefalo e midollo in toto, eventuale RMN funzionale in casi selezionati.

5) Valutazione elettrofisiologica: EEG, EMG con studio delle velocità di conduzione sensitivo-motoria, elettroencefalogramma e valutazione dei movimenti saccadici, potenziali evocati visivi (PEV), del tronco-encefalo (BAERs), somatosensitivi (PESS).

7) Valutazione specialistica in ambito cardiopneumologico, ORL, ed oculistico.

8) Valutazione psicometrica, delle competenze visuo-spaziali e del decadimento cognitivo.

b) Sulla base dei risultati della caratterizzazione clinico-strumentale verranno quindi selezionati i casi meritevoli di approfondimento genetico-molecolare. In tutti i casi con fenotipo complesso e sindromico, non chiaramente riconducibile a una forma di atassia nota sia essa dominante

o recessiva verrà effettuata l'analisi del cariotipo ad alta risoluzione in modo tale da escludere eventuali riarrangiamenti cromosomici. Inoltre, nei casi con ritardo mentale o deficit cognitivi importanti verranno escluse alterazioni ai geni FRAXA e FRAXE. Nei casi negativi si condurrà l'analisi delle sequenze subtelomeriche per l'esclusione di microdelezioni o riarrangiamenti cromosomici terminali.

Nelle forme dominanti di atassia verranno analizzate le regioni sottoposte ad espansione di geni quali SCA1-2-3 e 6. Nei casi in cui il fenotipo atassico è associato a caratteristiche fenotipiche specifiche quali retinopatia o demenza l'analisi si orienterà rispettivamente verso forme quali SCA7 e 17. Ove necessario, nei casi familiari con numero adeguato di soggetti affetti e sani in più generazioni, potranno essere condotti test di associazione e/o di linkage.

c) Per raggiungere l'obiettivo al punto c), verrà utilizzato un modello murino di atassia spino-cerebellare di tipo 1 (SCA1). Il topo SCA1 B05/+ (82Q) esprime a livelli 50-100 volte superiori a quelli endogeni l'mRNA full-length del gene umano mutato con 82 triplette CAG (82Q), posto sotto il controllo di un promotore specifico per le cellule del Purkinje. L'espansione del tratto poliQ conferisce alla proteina mutata una funzione tossica che porta alla morte neuronale selettiva. Al Rotarod test l'animale mutante eterozigote mostra un deficit di coordinazione rispetto al topo di controllo A02/+ (30Q) che risulta significativo già a partire dall'età di 5 settimane e diviene francamente atassico a partire da 12 settimane di vita. Il topo omozigote SCA1 B05/B05 82Q presenta un esordio più precoce ed un decorso più rapido e grave rispetto all'eterozigote.

In entrambi i casi i deficit motori esordiscono più precocemente rispetto all'inizio della morte delle cellule del Purkinje. Quest'ultima è infatti preceduta da un periodo di tempo durante il quale si instaurano alterazioni cellulari in parte note (alterazione del metabolismo del DNA, della trascrizione genica, della degradazione proteica del metabolismo del calcio) responsabili della sintomatologia neurologica.

Le cellule del Purkinje rappresentano il bersaglio di altre patologie in cui l'atassia è una componente del fenotipo clinico. In particolare il topo knock-out per la sfingomielinasi acida (AMSKO), modello della malattia di Niemann-Pick, una patologia metabolica da accumulo di sfingolipidi, mostra a livello cerebellare una perdita selettiva delle PuC

con pattern simile a quello del topo SCA1.

L'A-SMase è un enzima dotato di attività C fosfolipasica che idrolizza il legame fosfodiesterico della sfingomielina con formazione di ceramide e fosforilcolina. È noto che il ceramide interviene in qualità di secondo messaggero in numerose vie di traduzione del segnale legate alla proliferazione, al differenziamento e alla morte cellulare.

A livello neuronale il ruolo del ceramide come secondo messaggero non è stato ancora del tutto chiarito. Da una parte è descritto un ruolo protettivo di A-SMase e dei ceramidi su PuC immature. Dall'altra recenti evidenze indicano un'azione pro-apoptotica dei ceramidi attraverso una via mitocondrio-mediata.

Dati preliminari ottenuti su cervelletto di topi SCA1 eterozigoti ed omozigoti indicano che l'attività della sfingomielinasi acida aumenta in maniera statisticamente significativa rispetto ai controlli durante il periodo di "sofferenza cellulare" prima descritto, per diminuire poi progressivamente con la morte delle PuC.

Per stabilire con certezza se A-SMase e la via di traduzione del segnale che da essa origina intervengono negli stadi precoci della malattia, si determinerà, in primo luogo, il pattern di espressione della sfingomielinasi acida nel cervelletto di topi adulti wild-type. Si doserà quindi l'attività enzimatica di A-SMase su omogenati di cervelletti di topi wild-type, SCA1 30Q e topi eterozigoti ed omozigoti SCA1 82Q e si cercherà di stabilire un'eventuale relazione con il quadro neuropatologico e fenotipico a diverse età dell'animale.

Per dimostrare che l'alterazione dell'attività di A-SMase è cervelletto-specifica e che non è imputabile ad un aumento generalizzato dell'attività enzimatica cellulare si determinerà anche l'attività della sfingomielinasi acida e neutra su omogenati di cervelletto e di telencefalo dei suddetti animali.

Per indagare un possibile intervento dei mitocondri nella cascata di eventi cellulari che porta alla morte cellulare si determinerà inoltre l'attività della catena respiratoria mitocondriale su cervelletto di topi wild-type e SCA1 82Q eterozigoti.

Al fine di confermare in vitro le alterazioni metaboliche riscontrate in vivo verranno create linee cellulari neuronali trasfettate con atassina-1 umana normale e mutata. La disponibilità di un modello cellulare permetterà inoltre di testare eventuali modulatori dell'azione di A-SMase e dei suoi prodotti che, in quest'ottica, potrebbero rappresentare un nuovo target per la terapia farmacologica delle atassie degenerative.

## ARCHITETTURE IT PER L'INTEGRAZIONE DI DISPOSITIVI DOMESTICI IN APPLICAZIONI DI HOME CARE (ITACA)

**MATTEO CAVALLERI**

e-mail: MATTEO.CAVALLERI@BP.LNF.IT

**Linea di Ricerca n. 6**

Bioingegneria

**Tipo di Ricerca**

Corrente

**Periodo di svolgimento**

2006

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

**Collaborazioni**

Politecnico di Milano e CNR, che già collaborano con il laboratorio di Bioingegneria nell'ambito del progetto HINT.

**DESCRIZIONE**

L'attuale panorama sanitario dimostra un crescente interesse nei confronti dell'*Home-Care* come strumento per l'innalzamento della qualità di vita del cittadino, per il miglioramento dell'efficacia delle prestazioni offerte e per il contenimento della spesa sanitaria.

Si assiste di conseguenza ad un esteso impiego di avanzati sistemi di telecomunicazione e ad un imponente sviluppo di dispositivi innovativi - portatili o indossabili - dedicati all'acquisizione e alla trasmissione di dati clinici rilevati direttamente sull'individuo sia sano che patologico (ad esempio magliette dotate di sensori, *smart-phone*, sensori *wireless*).

Comincia così ad emergere il bisogno di strumenti che favoriscano l'integrazione di questi dispositivi e che agevolino lo sviluppo di applicazioni, così da poter fruire in modo rapido e semplice delle tecnologie ogni volta necessarie tra quelle disponibili o di nuova creazione.

Questo progetto si propone di disegnare una architettura di integrazione caratterizzata da:

- possibilità di riconfigurazioni adattative e *on-demand* dei dispositivi coinvolti
- "*context awareness*", ovvero capacità dell'architettura di rispondere in modo differenziato a seconda del contesto in cui si trova l'utente
- possibilità di differenziare le modalità di utilizzo del sistema in base alle esigenze dell'utente, rendendolo così accessibile ad ogni fascia di

popolazione, inclusi disabili ed anziani, secondo la logica del *"design for all"*.

### Materiali e Metodi

Nel campo dell'ICT, il sistema operativo è lo strato di software di base che permette ad un dispositivo elettronico di eseguire operazioni fondamentali, consentendo la comunicazione tra le molteplici periferiche in dotazione e facilitando la creazione di applicazioni.

Accanto ai sistemi operativi tradizionali, comunemente utilizzati dai Personal Computer, sono stati sviluppati sistemi operativi orientati ad ambiti specifici: citiamo per esempio i Network Operative System, utilizzati dai server per fornire servizi attraverso una comunicazione via rete dati; oppure sistemi operativi specifici per l'utilizzo di dispositivi di telefonia cellulare/pocket pc.

La struttura stratificata di hardware/sistema operativo/applicazioni presente sui calcolatori permette alle applicazioni a livello utente di beneficiare delle nuove periferiche hardware che vengono via via connesse al dispositivo centrale.

Alcuni dei sistemi operativi citati hanno inoltre la capacità di riconoscere ed utilizzare istantaneamente i dispositivi periferici non appena essi vengono connessi al sistema.

La costante evoluzione delle tecnologie di comunicazione wireless (Irda, Bluetooth, WiFi, WiMax, etc) degli ultimi anni, rende sempre più possibile migrare da connessioni fisiche delle periferiche a connessioni attraverso infrarossi o radiofrequenza. Ciò non solo permette al dispositivo centrale di raggiungere le periferiche tradizionali con maggior semplicità e minore ingombro, ma consente anche di raggiungere un notevole numero di dispositivi elettronici già presenti nell'ambiente circostante, che fino ad ora non sono stati interfacciati con il calcolatore se non a fronte di progetti personalizzati molto onerosi. In questo scenario, potrebbe risultare vantaggioso dotare di intelligenza e capacità di comunicazione wireless anche alcuni oggetti domestici attualmente sprovvisti di tali caratteristiche.

Utilizzando le tecnologie enunciate ci si propone di disegnare un'architettura che permetta l'integrazione di dispositivi domestici in applicazioni home-care, facilitando lo sviluppo di applicazioni verticali strettamente interagenti e cooperanti con l'ambiente in cui l'individuo è quotidianamente inserito. A titolo esemplificativo, possiamo citare:

- sistemi di telemonitoraggio ambientale basati sulle modalità di utilizzo degli oggetti presenti

nell'ambiente abituale (si pensi alla variazione delle modalità di utilizzo di alcuni oggetti da parte di un paziente durante un decorso postoperatorio), oppure sistemi di supporto ai classici apparati di acquisizione e trasmissione di dati biomedicali;

- semplici applicazioni di allerta o di controllo nell'utilizzo di dispositivi comuni (es. telefono, forno, frigorifero, etc.);
- applicazioni di domotica.

La plasticità dell'architettura proposta permette di creare velocemente nuove applicazioni in base a esigenze specifiche, combinando in molteplici modi le periferiche a disposizione e le diverse logiche applicative.

La gestione coordinata delle periferiche permette inoltre ulteriori vantaggi, quali la generazione di interfacce utente a seconda del tipo di disabilità, del grado di confidenza con la tecnologia di individui anziani, etc.

Si può infine ipotizzare un futuro in cui i dispositivi intelligenti in grado di comunicare con l'architettura proposta saranno presenti in grande quantità all'interno dell'ambiente domestico, eliminando la necessità di fornire dispositivi ad-hoc per numerosi trattamenti sanitari o riabilitativi successivi alla dimissione del paziente e rendendo quindi possibile una sorta di *"care on demand"*.

### Attività previste

Nel corso del primo anno del progetto si provvederà a realizzare alcune applicazioni dimostrative specifiche nel campo dell'homecare, inserendo dispositivi elettronici intelligenti in oggetti tradizionalmente utilizzati nelle abitazioni.

1 prototipo

1 richiesta di brevetto

## ANALISI MOLECOLARE E BIOINFORMATICA DELLA RICOMBINAZIONE MEIOTICA UMANA

**DR. ROBERTO GIORDA**

e-mail: ROBERTO.GIORDA@BP.LNF.IT

### Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Dipartimento di Genetica Medica, Università di Pavia

Department of Biological Sciences, University of Warwick, Coventry, UK.

### DESCRIZIONE

La ricombinazione meiotica è essenziale per la formazione di gameti aploidi normali, ed errori nella ricombinazione generano aberrazioni cromosomiche che sono alla base di una serie di patologie umane. Inoltre le mappe di ricombinazione sono essenziali per effettuare analisi genetiche. Fino ad ora, l'analisi delle ricombinazioni meiotiche era stata condotta a bassa risoluzione sia con metodi statistici che con osservazioni dirette. Quest'anno finalmente i dati accumulati sulle variazioni nella sequenza del genoma di individui diversi sono stati utilizzati per un'analisi statistica che ha permesso di ottenere mappe di ricombinazione ad alta risoluzione. Queste metodiche hanno però due lati negativi: sono indirette, e non sono in grado di analizzare le ricombinazioni anomale che si verificano in una grossa percentuale delle meiosi, sia maschili che femminili. Ci proponiamo di analizzare direttamente le regioni genomiche coinvolte nelle ricombinazioni meiotiche, utilizzando una varietà di metodiche molecolari e informatiche già disponibili. In breve, genereremo librerie di frammenti di DNA selezionati per la loro associazione alle proteine responsabili per la ricombinazione meiotica, sequenzieremo un numero statisticamente sufficiente di frammenti e condurremo un'analisi bioinformatica della loro struttura e localizzazione genomica. Allo stesso tempo

genereremo indipendentemente una mappa di ricombinazione ad alta risoluzione mediante array-CGH.

Le mappe ottenute saranno confrontate tra loro e con le mappe esistenti, e forniranno una validazione sperimentale dei dati ottenuti con metodiche statistiche. In più, l'analisi di sequenza permetterà di individuare i frammenti derivanti da ricombinazioni non omologhe che si pensa rappresentino fino al 15% di tutte le ricombinazioni meiotiche, e di analizzarne i punti di rottura.

### Attività previste

Isolamento di sequenze genomiche associate ai punti di ricombinazione meiotica in cellule germinali maschili; sequenziamento; analisi bioinformatica delle sequenze.

## IDENTIFICAZIONE, ANALISI E CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE DI SNPs, MCS ED ELEMENTI TRASPONIBILI NEL GENOMA UMANO: LE POTENZIALITÀ DELL'USO COMBINATO DI DIVERGENZA INTERSPECIFICA E VARIABILITÀ INTRASPECIFICA

**ING. UBERTO POZZOLI**

e-mail: [UBERTO.POZZOLI@BP.LNF.IT](mailto:UBERTO.POZZOLI@BP.LNF.IT)

### Linea di Ricerca n. 7

Bioinformatica

### Tipo di Ricerca

Corrente

### Periodo di svolgimento

2006

### Polo Scientifico

Bosisio Parini

### Collaborazioni

Centro Dino Ferrari, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Milano

IRCCS Fondazione Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena.

### DESCRIZIONE

In questo progetto di ricerca ci proponiamo di creare database umani su scala genomica (genome-wide) di SNPs (single nucleotide polymorphism), sequenze conservate multispecie (MCS, coding e non-coding) ed elementi trasponibili (transposable elements, TE) e di studiarne la distribuzione e le caratteristiche funzionali. I dati ottenuti verranno utilizzati come segue:

Gli SNPs nelle regioni codificanti verranno organizzati in un apposito database e ne verrà valutata (attraverso metodiche computazionali) la propensione a modificare i pattern di splicing (alternativo e costitutivo). L'allele ancestrale verrà identificato attraverso l'allineamento con la sequenza ortologa di scimpanzè. Gli SNPs selezionati (per rappresentare putativi modificatori di splicing) verranno testati attraverso clonaggio in vettori d'espressione, trasfezione in linee cellulari umane, RT-PCR e metodiche di real time PCR. Lo scopo di questo lavoro è quello di mettere a punto un sistema di predizione di SNPs funzionali che, localizzati in geni responsabili di patologie genetiche (o malattie complesse), potrebbero agire come modificatori del fenotipo clinico o come fattori di predisposizione.

Verranno studiate la localizzazione e distribuzione di MCS, SNPs e TE intronici in modo da poter identificare un modello che descriva l'evoluzione delle sequenze introniche nel genoma umano (particolarmente in riferimento ai due modelli attualmente esistenti: "selection for economy" e "genomic design"). Inoltre l'uso combinato dell'analisi comparativa (divergenza) e di variazione intraspecifica (SNPs) dovrebbe consentire di identificare le regioni introniche sottoposte a selezione (purificatrice o darwiniana). Infine, nel caso dei TE, verrà analizzata la distribuzione, per tipo o famiglia, in base alle caratteristiche introniche (lunghezza, contenuto in GC, splicing alternativi) e in base alle caratteristiche del gene (livello d'espressione, classe funzionale, domini proteici).

La localizzazione - distribuzione delle MCS verrà eseguita anche su scala genomica (ampliando quindi lo studio alle MCS localizzate in regioni intergeniche, in deserti genici, etc) e combinando dati genomici derivanti da altri organismi così da verificare se il modello da noi proposto per le sequenze introniche possa essere esteso al genoma intero.

La distribuzione di MCS e SNPs verrà analizzata sull'intero genoma umano; in particolare la divergenza interspecifica (densità e grado di conservazione di MCS) e la variabilità intraspecifica (densità di SNPs) verranno utilizzate per studiare le regioni genomiche non-coding che sono state sottoposte, nella nostra specie, a fenomeni di selezione consentendo di definire in quali regioni sia più attiva la selezione purificatrice e in quali quella positiva (o darwiniana).

I database messi a punto durante le analisi, i metodi impiegati e quelli che verranno prodotti sulla base dei risultati (i.e. Identificazione automatica di putativi SNP funzionali) verranno resi disponibili sia internamente all'Istituto sia attraverso internet mediante l'utilizzo di un sistema software già implementato dal nostro gruppo (COBITIS). In questo modo ci prefiggiamo il duplice obiettivo di disseminare i risultati in modo visibile ed efficiente e di sperimentare e testare il sistema COBITIS.

### Attività previste

Creazione di database di SNP e TE. Allineamento multiplo di sequenze genomiche al fine di identificare sequenze conservate. Analisi statistica della distribuzione di SNP, MCS e TE in regioni introniche e intergeniche. Individuazione di modelli evolutivi. Sviluppo di un sistema software. Clonaggio di regioni candidate e trasfezione in cellule di mammifero. Saggi di splicing in vitro. Analisi tramite real time PCR.

**RICERCHE  
MINISTERIALI  
FINALIZZATE 2005**

---

**RAZIONALI**

## STRESS OSSIDATIVO E FATTORI DI PROTEZIONE IN MODELLI CELLULARI DI NEURODEGENERAZIONE

**PROF. EMILIO CLEMENTI**

e-mail: emilio.clementi@bp.lnf.it

**Linea di Ricerca n. 5**

Neurobiologia

**Tipo di Ricerca**

Finalizzata

**Periodo di svolgimento**

2006-2008

**Polo Scientifico**

Bosisio Parini

### Unità Operative e Collaborazioni

UO.1 IRCCS "E. Medea" Polo di Bosisio Parini  
- Laboratorio di Biologia Molecolare

UO.2 Univ Milano Bicocca – Dipartimento di  
Neuroscienze e Tecnologie Biomediche

UO.3 IRCCS Ospedale Maggiore Policlinico - Di-  
partimento di Scienze Neurologiche

UO.4 IRCCS "E. Medea" Polo di Conegliano

### Obiettivo finale del progetto

Obiettivo finale di questa proposta è la definizione di una correlazione tra stress ossidativo, azione di fattori protettivi, neurodegenerazione e background genetico al fine di identificare eventuali agenti modulatori dei processi neurodegenerativi stessi con ricaduta immediata sul piano terapeutico. A questo scopo lo studio dei meccanismi molecolari alla base di questi eventi avverrà in modelli cellulari di diverse patologie neurodegenerative (SLA, Alzheimer, Parkinson e Sindrome di Down) in modo tale da definire un quadro completo di tutti gli elementi coinvolti e loro correlazioni. Inoltre, la valutazione dell'effetto del background genetico (sia esso direttamente mutazione patogenetica oppure aplotipo associato a un fattore di rischio) nelle forme familiari e sporadiche e le strategie di neuroprotezione messe in atto dalla cellula durante il processo di neurodegenerazione, ha un valore predittivo nei confronti dell'outcome del processo neurodegenerativo stesso con ricaduta sul piano diagnostico.

### Conoscenze già disponibili e nuove conoscenze che il progetto si prefigge di produrre

Diverse malattie neurodegenerative, Parkinson

(PD), Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e Alzheimer (AD) hanno meccanismi patogenetici sovrapponibili, in cui l'accumulo di aggregati proteici non degradabili da parte del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), sono cruciali. La formazione di tali aggregati può essere dovuta a diversi meccanismi e la loro azione diretta sui mitocondri e sulle strutture di membrana può generare stress ossidativo e condurre a neurodegenerazione attraverso l'attivazione di meccanismi di apoptosi(1). Lo stress ossidativo, in particolare i prodotti di perossidazione lipidica quali HNE, a sua volta può determinare l'accumulo di proteine ubiquitinate attraverso l'inibizione della funzionalità del proteasoma, generando un meccanismo di amplificazione del segnale patologico (1). Indubbiamente, in AD, PD e SLA, vi sono deficit nella funzionalità dei mitocondri, la maggior fonte di radicali liberi, accompagnati da alterazioni strutturali e dell'attività di enzimi specifici quali i complessi I e IV della catena respiratoria mitocondriale. Questi dati suggeriscono fortemente che lo stress ossidativo, possa svolgere un ruolo determinante nella patogenesi della neurodegenerazione (1). Ad ulteriore supporto vi sono, molteplici studi che indicano l'attivazione di membri della famiglia di MAPKinasi associati alla risposta da stress e di PDK1-PKB/Akt, in pazienti AD, PD e SLA (2). L'importanza del ruolo dello stress ossidativo è confortata anche dal fatto che sostanze con potere antiossidante sono protettive nelle patologie neurodegenerative (3). In quest'ottica, infine importante appare il ruolo del nitrossido (NO). In AD, PD e SLA, vi è espressione della isoforma inducibile della NO sintasi (NOS) che genera concentrazioni citotossiche di NO. A tali concentrazioni NO può inibire per nitrosilazione l'attività dei complessi I e IV della catena respiratoria mitocondriale ed interferire con l'attivazione della MAP kinasi (4). Il ruolo dello stress ossidativo e di NO è supportato anche dallo studio delle forme genetiche delle malattie neurodegenerative quali diverse forme di Parkinson in cui sono implicate proteine quali l'alfa sinucleina, con un doppio ruolo neuroprotettivo e neurodegenerativo correlati ai suoi livelli di espressione ed alla sua azione a livello mitocondriale dove può regolare la generazione di radicali liberi (2-5) e la parkina la cui perdita di funzionalità porta a ridotta fosforilazione ossidativa ed aumentato stress ossidativo, con alterazioni mitocondriali e conseguente degenerazione cellulare per apoptosi (2).

Forme di SLA familiare si associano a mutazioni

della superossido dismutasi (SOD1) che le conferiscono funzioni tossiche, fra cui una maggiore propensione a formare aggregati insolubili, e una nuova attività enzimatica pro-ossidante dovuta alla sua alterata capacità di legare i metalli. Una forma di SLA ad esordio giovanile si associa a mutazioni del gene ALS2 che codifica per alsina, una proteina appartenente alla famiglia del guanine nucleotide exchanging factor (GEF) e che agisce come attivatore di piccole GTPasi. L'espressione di alsina nativa, al contrario della mutata, protegge i motoneuroni dalla tossicità indotta da SOD1 mutata (6).

Nonostante queste iniziali caratterizzazioni patogenetiche, non è chiaro ancora quali siano in dettaglio i meccanismi attraverso cui parkina, alsina, alfa sinucleina e proteine regolatrici del potenziale redox cellulare esitano in patologia neurodegenerativa. A questo una analisi longitudinale di coorti di pazienti e la determinazione accurata di una correlazione genotipo-fenotipo appare una prospettiva promettente (7).

- 1) Andersen, Nat Med. 2004;10 Suppl:S18-25
- 2) Vila and Przedborski, Nat Med. 2004;10 Suppl:S58-62.
- 3) Moosmann and Behl, Expert Opin Investig Drugs. 2002;11:1407-35.
- 4) Hess et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6:150-166.
- 5) Seo et al., FASEB J. 2002;16:1826-8
- 6) Kanekura et al., J. Biol. Chem. 279: 19247-19256, 2004
- 7) Bertam and Tanzi, J. Clin. Invest. 115: 1449-1457, 2005

### **Quali nuove conoscenze/informazioni il progetto si prefigge di produrre?**

Lo stress ossidativo è un evento patogenetico comune a tutte le malattie neurodegenerative, e cruciale nel determinarne il decorso clinico, come documentato dalle centinaia di pubblicazioni presenti nella letteratura internazionale sull'argomento. Per queste ragioni, un approccio farmacologico diretto a ridurre lo stress ossidativo potrebbe avere un ruolo non indifferente nel migliorare l'esito, e ridurre la progressione di queste malattie. Vi sono tuttavia molti elementi che precludono a tutt'oggi uno sviluppo farmacologico appropriato in questa direzione. In particolare, lo stress ossidativo non ha un'origine unica ma è il risultato finale di una serie di eventi diversi all'interno della cellula, che coinvolgono diversi distretti cellulari (mitocondri, citosol, lisosomi e membrana plasmatica), e diversi enzimi.

In particolare lo stress ossidativo è legato allo squilibrio del bilanciamento fisiologico delle attività degli enzimi che producono specie radicaliche a livello mitocondriale, citosolico, e di membrana, e di quelli deputati alla rimozione dei radicali, quali gli enzimi coinvolti nel ciclo del glutatione, nella conversione di superossido in acqua ossigenata, e nel contrastare la perossidazione lipidica. Inoltre, nello squilibrio dell'omeostasi dei radicali liberi incidono attori che modificano l'espressione/attività degli enzimi suddetti, tra cui si annoverano messaggeri extracellulari, attivi anche in modo paracrino, ed intracellulari, inclusi i segnali aberranti generati da aggregati proteici non fisiologici. La complessità e mutevolezza di questo quadro, e la sua adattabilità a stimoli esterni, è la ragione sottostante al sostanziale insuccesso terapeutico di strategie volte a limitare il danno neurodegenerativo attraverso un intervento sullo stress ossidativo.

Il primo apporto conoscitivo che si prefigge questo gruppo di lavoro è quello di arrivare a definire in modo non equivoco lo specifico ruolo di ciascun elemento concorrente alla genesi e controllo dello stress ossidativo cercando di identificare gli attori comuni alle diverse patologie neurodegenerative. L'identificazione degli eventi enzimatici che sono realmente cruciali nel determinare lo sbilanciamento ossidativo della cellula, permetterà il disegno di strategie terapeutiche efficaci. Questo obiettivo verrà raggiunto attraverso un approccio sperimentale innovativo ed accurato, standardizzato ed uguale per ciascuna UO, che prevede quattro aspetti essenziali distinti anche se temporalmente correlati. Il primo aspetto è il monitoraggio di: i) tutti gli eventi più importanti coinvolti nella genesi e nel controllo dello stress ossidativo; ii) dei cambiamenti in questi eventi indotti da sostanze proossidanti di significato biologico comprovato nelle malattie neurodegenerative; iii) dei cambiamenti in questi eventi indotti da sostanze biologiche note avere un effetto protettivo e possibile base per il disegno di farmaci. Il secondo aspetto è la correlazione di questi parametri con parametri di funzionalità cellulare significativi, quali il bilancio energetico, l'attività mitocondriale, il traffico intracellulare, e la sopravvivenza/morte delle cellule stesse, a breve e lungo termine. Centrale al raggiungimento di quest'obiettivo conoscitivo è l'utilizzo come modelli sperimentali sia di cellule derivate da pazienti sia di linee cellulari innovative, disegnate in modo da esprimere le alterazioni genetiche osservate nei pazienti medesimi,

e quindi il più vicino possibile alla realtà fisiopatologia. Questi dati biochimici saranno resi più facilmente interpretabili attraverso le informazioni ottenute nel terzo approccio previsto, ovvero l'analisi di correlazione genotipo-fenotipo attuata su coorti di pazienti in cui si analizzeranno mutazioni e polimorfismi dei geni oggetto delle analisi biochimiche. Infine, verranno valutate terapie farmacologiche innovative incluso l'approccio di silenziamento genico attraverso interferenza della trascrizione di RNA messaggero (siRNA).

### Obiettivi intermedi previsti

1. Selezione della casistica di patologie neurodegenerative SLA, Parkinson (PD) Alzheimer (AD) e Down (DS) ed analisi di mutazione nelle forme note e correlazione genotipo-fenotipo.
2. Generazione di modelli cellulari di patologie neurodegenerative (ALS2).
3. Trattamento comparato di modelli cellulari noti e quelli di nuova generazione con agenti inducenti fenomeni di stress ossidativo e agenti protettivi.
4. Definizione dei meccanismi molecolari alla base del fenomeno "stress ossidativo" e loro correlazione con background genetico normale e patologico.
5. Effetto dello stress ossidativo sul fenomeno neurodegenerazione e individuazione di elementi modulatori.
6. Valutazione comparativa dei dati e proposta di bersagli efficacy per una terapia farmacologica.

### Metodologia

Il reclutamento della casistica di varie patologie avverrà secondo criteri validati a livello internazionale, in particolare i pazienti AD secondo i criteri NINCDS-ADRDA; i pazienti PD secondo i criteri di Gelb et al., 1999, i pazienti SLA secondo El Escorial revised, 1998 e pazienti DS con deterioramento cognitivo secondo Gedye, 1995.

Estrazione di DNA genomico da sangue e determinazione dei polimorfismi nei geni NOS Mn-SOD, ApoE, VEGF con la metodologia RFLP nei casi di AD sporadica, SLA e PD. I pazienti con SLA familiare verranno analizzati per mutazioni in SOD1 e ALS2 a seconda dell'età di esordio della patologia. L'intera regione codificante dei geni asinucleina, parkina, DJ-1 e PINK-1 verrà analizzata in tutti i casi familiari di soggetti affetti da PD.

L'intera regione codificante dei geni PS 1 e 2 verrà analizzata nei casi di AD familiare. L'analisi

si genetica del DNA mitocondriale permetterà di valutare il carico mutazionale complessivo calcolando il numero di mutazioni nei cloni multipli analizzati diviso il numero totale di basi sequenziate. Le linee cellulari di varia origine, inclusi i linfociti e fibroblasti di pazienti affetti da SLA, PD, AD, e le linee cellulari transfettate mediante Fugene (Quiagen) con i geni mutati di interesse verranno coltivate in condizioni standard. Si misureranno: i) conversione di MTT a formazan da parte delle deidrogenasi mitocondriali (test di funzionalità mitocondriale); ii) livelli di ATP (mediante HPLC); iii) produzione di ROS totali e mitocondriali (mediante saggi colorimetrici); iv) livelli di GSH (tramite monoclorobimane che si lega ad alta affinità al glutatione); v) attività di GSH reduttasi e perossidasi (mediante saggi spettrofotometrici commerciali basati sulla ossidazione del NADPH); vi) marker di apoptosi tra cui: attività di caspasi di inizio ed esecutrici (misurata mediante analisi fluorimetrica del cleavage di substrati specifici); formazione di DNA ipodiploide ed esposizione di fosfatidilserina (mediante citometria a flusso); vii) espressione di parkina ed alfa sinucleina (mediante Western blot ed analisi dei livelli di mRNA mediante RT-PCR); viii) espressione di MAPKinas (ERK1/2, JNK, p38) e PDK1-PKB/Akt (Western blot) e loro stato di attivazione (mediante metodiche ELISA). Il trasporto sodio-dipendente di glutammato, sia in condizioni basali sia dopo esposizione ad agenti ossidanti (HNE, MPTP, paraquat, beta amiloide), antiossidanti quali derivati polifenolici e Trolox, e chelanti del ferro della serie VK-28 (permeabili alla barriera ematoencefalica) verrà testato tramite incubazione delle cellule con [ $H^3$ ]-glu (1-60  $\mu$ M) per vari tempi. Il range di concentrazioni d'uso di ciascuna sostanza verrà stabilito per tutte le UO in esperimenti preliminari da parte di UO1 e UO2. Il trasporto di glu sarà calcolato come differenza tra i valori di radioattività incorporata (misurata in lisati cellulari) ottenuti in presenza ed in assenza di sodio e dei vari trattamenti, ed espresso come pmol/mg prot/10 min.

Il ruolo di NO nei modelli cellulari verrà studiato utilizzando: i) gli inibitori delle NOS L-NAME (non selettivo), ARL17477 (selettivo per NOS neuronale) e GW273629 (selettivo per NOS inducibile); ii) farmaci che rilasciano NO a concentrazioni fisse e controllate nel tempo (DETA-NO e DEA-NO). La generazione di NO verrà valutata con uno specifico elettrodo (Clementi et al., 1998). La nitrosazione verrà misurata mediante saggi fluorimetrici ed anticorpali commerciali.

## Trasferibilità dei risultati e dei prodotti

I risultati generati da questo progetto permetteranno da un lato di tradurre in termini funzionali informazioni genetiche, e quindi di legare risultati della ricerca di base con aspettative della medicina clinica, dall'altro di evidenziare e se possibile quantificare l'influenza del background genetico su fenomeni complessi quali la neurodegenerazione in presenza o meno di induttori o soppressori di stress ossidativo. La dissezione del meccanismo patogenetico alla base dell'effetto dello stress ossidativo ed ancor più i fattori di protezione che in modo alterno e variabile concorrono alla definizione e modulazione del fenotipo "neurodegenerazione", richiede uno studio ad ampio raggio e incentrato sull'utilizzo di modelli cellulari provenienti da diverse patologie neurodegenerative di origine genetica familiare e/o sporadica quale quello proposto nel presente progetto. L'individuazione di fattori "di controllo" e/o di protezione rappresenta la base per la possibile formulazione di strategie terapeutiche innovative. Parallelamente l'estensiva analisi molecolare di pazienti con varie patologie neurodegenerative quali quelle descritte in questa proposta si tradurrà in una ottimizzazione quali-quantitativa del procedimento diagnostico in questa classe di malattie. La diffusione dei risultati conseguiti avverrà attraverso la pubblicazione su riviste internazionali ed attraverso la comunicazione a congressi scientifici.

## Valore aggiunto dell'aggregazione tra soggetti diversi che partecipano al progetto

Come indicato nelle sezioni precedenti l'obiettivo di questo gruppo di ricerca richiede competenze molto diverse, che difficilmente sono raggiungibili da un singolo gruppo di ricerca. In particolare, il successo del progetto dipende da: i) reclutamento di una casistica imponente di pazienti affetti da malattie neurodegenerative di tipo familiare e sporadica; ii) capacità di analisi genetica raffinata; iii) competenza nella costruzione di modelli cellulari contenenti geni mutati e nel generare linee primarie da fibroblasti e linfociti di pazienti; iv) capacità di analisi di parametri cellulari significativi di stress ossidativo, attività mitocondriale, bilancio energetico, vitalità cellulare, trasporto di proteine. Per queste ragioni il progetto si è costituito intorno ad UO con competenze cliniche specifiche, localizzate in strutture note per ricevere un'ampia casistica;

UO con competenze miste cliniche e di ricerca, capaci di formare un ponte culturale e di offrire elementi interpretativi adeguati; ed UO con competenze specifiche di biologia cellulare e metabolismo dei radicali liberi. Infine, il gruppo comprende una UO con competenze specifiche nel campo della analisi genetica. La specificità di competenze di ciascuna UO non potrebbe tuttavia essere di vantaggio sinergico in assenza di rapporti umani e logistici favorevoli. Il gruppo soddisfa ambedue questi criteri. Infatti vi sono fruttiferi rapporti di collaborazione tra le varie UO sia a livello di gruppi che di singoli, documentati anche da pubblicazioni ed attività scientifiche comuni. In particolare, i gruppi hanno già esperienza nello scambiarsi reagenti e protocolli e nella capacità di disegnare procedure standardizzate, tali da rendere la generazione dei dati un processo uniforme, e quindi permettere la confrontabilità dei risultati ottenuti nei diversi laboratori. Questo pare particolarmente importante in un progetto in cui l'analisi comparativa dei dati ottenuti è un elemento strategico. Un esempio di questa standardizzazione è la decisione di utilizzare concentrazioni stabilite ed uguali per tutti di reagenti atti a modificare la risposta ossidativa cellulare, quali HNE, MPTP, paraquat, derivati polifenolici, Trolox, e chelanti del ferro.

## Articolazione del programma

Il progetto si articolerà in 4 fasi :

Fase 1: in questa fase inizierà il reclutamento della casistica da parte delle UO coinvolte previo ottenimento di apposito consenso informato; in particolare, pazienti afferenti all'Unità Valutativa Alzheimer con diagnosi di AD e demenze correlate (secondo i criteri NINCDS-ADRDA) e all'ambulatorio SLA del Dip. di Scienze Neurologiche dell'Ospedale Maggiore di Milano (UO 3); selezione di una casistica di pazienti affetti da AD, PD e SLA afferenti agli Ambulatori Divisionali di Neurologia e ai servizi di Day Hospital; reclutamento ad opera dell'UO2 di 10 pazienti PD (secondo i criteri di Gelb et al., 1999), 10 SLA (secondo El Escorial revised, Wilbourn AJ. 1998), 10 AD (secondo DMS IV e NINCDS-ADRDA) e 10 DS con deterioramento cognitivo (secondo Gedye, 1995) (UO 4). L'UO4 si concentrerà sulla selezione soprattutto di pazienti con SLA familiare ad insorgenza precoce e Parkinson familiare ad insorgenza giovanile. In questo caso tutti i soggetti verranno sottoposti a prelievo ematico (20 ml) e biopsia cutanea in regione sottoscapolare ove necessario ed invia-

ti ai centri di competenza per le analisi come di seguito menzionato. Fase 2: In questa seconda fase continuerà il reclutamento della casistica ed inizierà lo studio di popolazione su pazienti con AD sporadica, SLA e PD: identificazione di mutazioni in geni implicati nel danno ossidativo quali: NOS (inducibile, neuronale ed endoteliale), Mn-SOD, VEGF (SNPs: -2578, -1190, -1154 nel promotore). Successivamente verrà effettuata una valutazione dell'effetto dei polimorfismi sull'espressione genica in PBMC isolati da pazienti con diversi aplotipi, mediante la tecnica di Real-Time PCR (UO3). La stessa UO procederà su pazienti PD, SLA e AD familiari, all'analisi delle regioni codificanti dei geni associati a forme autosomiche dominanti e/o recessive. In particolare, si procederà al sequenziamento diretto:

- dell'intera regione codificante del gene SOD1 in tutti quei soggetti affetti da SLA con una positività familiare ben documentata;
- dell'intera regione codificante dei geni alfa-sinucleina, parkina, DJ-1 e PINK-1 in tutti i casi familiari di soggetti affetti da Morbo di Parkinson.
- dell'intera regione codificante dei geni prenilina 1 e 2 per la AD familiare (con esordio < 65 anni o che abbiano familiarità per la patologia, con almeno 3 soggetti affetti su 2 generazioni) e della proteina tau per i casi di FTD familiare (UO3). Nei linfociti ottenuti da pazienti PD, SLA e AD sporadici e familiari l'espressione di alfa-sinucleina, di markers di stress ossidativo (ROS totali e mitocondriali, livelli di GSH, GSH reduttasi e perossidasi) e di apoptosi (attività di caspasi-3). Infine, nei fibroblasti provenienti dagli stessi pazienti verranno condotte analisi dell'espressione di parkina, di markers di stress ossidativo, di apoptosi e di attivazione di MAPKinasasi (ERK1/2, JNK, p38) e PDK1-PKB/Akt (UO 2). Questa attività proseguirà anche nella fase 3. Contemporaneamente, nelle fasi 2-3, l'UO1 e UO4 in collaborazione inizieranno l'analisi per mutazioni nel gene ALS2 dei casi di SLA familiare ad insorgenza precoce già identificati. Tale analisi rappresenta la continuazione di un lavoro attualmente già in atto e che ha recentemente portato all'identificazione di una nuova mutazione missenso nel gene ALS2. Tale mutazione verrà caratterizzata dal punto di vista funzionale in diversi tipi cellulari neuronali e non, in collaborazione con l'UO2, UO3 e UO4 come sotto specificato. Verrà dapprima sottoclonato il cDNA ALS2 mutato in vettori di espressione per cellule eucariotiche (pCDNA3 Myc-EGFP). Il costrutto verrà inserito inizialmente in cellu-

le HeLa per una caratterizzazione di base che comprende localizzazione e livello di espressione. Si valuterà quindi inizialmente la localizzazione intracellulare di questa forma di ALS2 mutata mediante un approccio in immunolocalizzazione in microscopia confocale, e successivamente elettronica, in cui si verificherà la colocalizzazione di ALS2 con i seguenti specifici marcatori subcellulari: giantina (Golgi); SNAP 23 (membrana plasmatica); EEA-1 (endosomi); DAMP (comparti acidi); lamp-2 e catepsina D (lisosomi); calreticulina e PDI (reticolo endoplasmatico). Tali marcatori verranno identificati mediante specifici anticorpi. Il costrutto contenente ALS mutata verrà di seguito inserito in cellule indifferenziate quali NT2 o di origine neuronale quali SH-SY5Y, SKNBE e CHP 100 per una più completa valutazione degli effetti della mutazione stessa in un background neuronale. Verranno quindi studiate la localizzazione di espressione del gene trasfettato e le conseguenze fenotipiche su parametri funzionali specifici prima e dopo differenziamento in senso neuronale mediante esposizione ad acido retinoico. Per studiare nello specifico gli effetti biochimici e funzionali della interazione tra ALS2 mutata e SOD1 si utilizzerà una linea SHSY5Y stabilmente trasfettata con SOD 1 G93A (modello classico di SLA, linea stabile con il gene SOD1 mutato già disponibile presso l'UO2 e 3). Le linee così preparate (in condizioni permissive e non per espressione di ALS2) verranno stimulate con concentrazioni crescenti di agenti noti mimare la citotossicità in corso di malattia neurodegenerativa (HNE; MPTP;  $\beta$ eta amiloide, paraquat) ed agenti citoprotettivi (antiossidanti quali i derivati polifenolici baicaleina ed epigallocatechin-3-gallato, il Trolox, e chelanti del ferro della serie VK-28) (Mandel et al., 2004; Lee et al., 2003). L'UO2, inoltre, utilizzerà strategie di silenziamento genico mediante SiRNAs. Si valuteranno in parallelo i seguenti parametri: i) indicatori del decorso del processo apoptotico, quali l'esposizione di fosfatidilserina, la comparsa di DNA ipodiploide, la presenza di rotture del DNA (De Nadai et al., 2000); ii) l'attivazione di chinasi proapoptotiche della famiglia MAPK (ERK1/2, JNK, p38) (in collaborazione con UO 2); iii) l'attività di caspasi di inizio alla membrana cellulare e mitocondriale (8 e 9) e caspasi della fase esecutoria (3 e 7), mediante l'utilizzo di substrati fluorescenti specifici (De Nadai et al., 2000); iv) il potenziale di membrana mitocondriale con coloranti potenziometrici (Perrotta et

al., 2004); v) la respirazione mitocondriale ed i suoi parametri funzionali (mediante ossimetria), incluso l'attività dei complessi I, III e IV (mediante spettrofotometria) e la generazione di ATP, ADP, NADH e NAD (mediante HPLC) (Clementi et al., 1998; Beltran et al., 2000); vi) i trasportatori del glutammato (in collaborazioni con UO 2). Il ruolo del nitrossido sugli eventi sopra descritti verrà valutato utilizzando donatori di NO a rilascio controllato (DETA-NO) ed inibitori delle NO sintasi (L-NAME ed L-NIO) (Clementi et al., 1998; Sciorati et al., 1997). Si eseguirà infine una correlazione tra i dati ottenuti e la localizzazione subcellulare della forma mutata di ALS2 come descritto sopra.

I trattamenti farmacologici verranno somministrati alle stesse concentrazioni dalle UO coinvolte, in modo da ottenere dati confrontabili. Similmente, i parametri di funzionalità cellulare indicati verranno studiati con metodologie standardizzate definite sulla base delle specifiche competenze delle UO1-2 come meglio specificato nei modelli 2 bis delle singole UO.

L'UO3 nelle fasi 2-3 del progetto si dedicherà all'analisi di mutazioni del genoma mitocondriale umano (in particolare la regione di controllo della replicazione e una regione codificante comprendente i geni mitocondriali rRNA-16S, tRNA-leu e ND1), il cui accumulo risulta essere di probabile rilevanza patologica sulle popolazioni descritte in precedenza, nonché sulle linee cellulari descritte nel modello generale.

Nelle fasi 3-4, l'UO 3 eseguirà una caratterizzazione dell'espressione a livello genico e proteico delle diverse subunità proteasomali e analisi dell'attività enzimatica del proteasoma in fibroblasti di pazienti affetti da AD, PD e ALS con mutazioni note e in linee cellulari transfettate e sottoposte a stress ossidativo.

Nelle fasi 3-4, l'UO2 valuterà nei linfociti ottenuti da pazienti PD, SLA e AD sporadici e familiari l'espressione di alfa-sinucleina, di markers di stress ossidativo (ROS totali e mitocondriali, livelli di GSH, GSH reduttasi e perossidasi) e di apoptosi (attività di caspasi-3). Infine, nei fibroblasti provenienti dagli stessi pazienti verranno condotte analisi dell'espressione di parkina, di markers di stress ossidativo, di apoptosi e di attivazione di MAPKinasi (ERK1/2, JNK, p38) e PDK1-PKB/Akt (UO2). In questi studi, i parametri di funzionalità cellulare indicati verranno misurati con metodologie standardizzate come descritto sopra, per facilitare la valutazione comparativa dei dati ottenuti con quelli osser-

vati nelle linee cellulari.

Nella fase 4 l'UO1 inizierà la raccolta dei dati dalle varie UO per una valutazione globale degli effetti dei composti sopradescritti studiati nei vari tipi cellulari e nelle diverse condizioni sperimentali testate. Questa analisi sarà finalizzata all'individuazione di possibili bersagli strategici per lo sviluppo di una efficace terapia farmacologica.

Gelb et al., Arch Neurol. 1999 Jan;56(1):33-9.

Wilbourn, J Neurol Sci. 1998 Oct;160 Suppl 1: S25-29.

De Nadai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 5480-5485, 2000

Mandel et al., J. Mol. Neurosci. 24: 401-3016, 2004

Lee et al., Brain Res. 986:103-113, 2003

Perrotta et al., Cancer Res. 64: 3767-3771, 2004

Clementi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7631-7636, 1998.

Beltran et al., Br. J. Pharmacol. 129: 953-960 2000

Sciorati et al., J. Biol. Chem. 272: 23211-23215, 1997

### Output del programma

Il progetto qui presentato si propone di identificare in diverse patologie neurodegenerative aspetti specifici, a valenza diagnostica/terapeutica di patogenesi legati ad alterazioni nella capacità cellulare di controllare lo stress ossidativo utilizzando modelli cellulari di varia origine in presenza di diverse condizioni sperimentali, inclusi farmaci e silenziamento genico.

L'interazione con i colleghi ha creato rapporti con strutture di ricerca anche straniere che permetterà una migliore integrazione di conoscenze ed una crescita culturale reciproca. Inoltre la partecipazione di molte UO a diversi progetti della Comunità Europea focalizzati su tematiche analoghe permetterà una disseminazione in ambito europeo dei protocolli delineati e al tempo stesso beneficerà di informazioni e nuovi risultati che potranno permettere di modificare e migliorare il progetto in corso. All'interno dei progetti EC, co-sponsorizzabili dal Ministero, saranno organizzati, nel secondo anno del progetto, corsi di formazione per specializzandi e addottorandi su aspetti di biologia e clinica delle malattie neurodegenerative. Infine i risultati ottenuti saranno oggetto di pubblicazione su riviste scientifiche specialistiche.

### Cronogramma

Fase 1 (1-6 mese del I anno di attività): reclutamento della casistica che continuerà per tutta la durata del progetto (UO1-4).

Fase 2 (7-12 mese I anno di attività): studio di popolazione su pazienti con AD sporadica, SLA e PD: identificazione di mutazioni in geni implicati nel danno ossidativo quali: NOS (inducibile, neuronale ed endoteliale), Mn-SOD, VEGF (SNPs: -2578, -1190, -1154 nel promotore). Valutazione dell'effetto dei polimorfismi sull'espressione genica in PBMC isolati da pazienti con diversi aplotipi, mediante la tecnica di Real-Time PCR. Analisi delle regioni codificanti dei geni associati a forme autosomiche dominanti e/o recessive nelle AD familiari. Analisi genetica del DNA mitocondriale (UO3).

Caratterizzazione funzionale della mutazione in ALS2 (UO1-4). Trasfezione del costrutto in cellule di origine neuronale e non (UO1-4). Caratterizzazione delle stesse linee in presenza di agenti noti mimare la citotossicità in corso di malattia neurodegenerativa (HNE; MPTP; beta amilodie, paraquat) ed agenti citoprotettivi (derivati polifenolici, Trolox, chelanti del ferro) (UO1-2-4). Applicazione di tecnologie di silenziamento genico (UO2).

Fase 3 (1-6 mese II anno di attività): analisi statistica dei dati di frequenza allelica e genotipica (UO3). Continuazione della caratterizzazione delle linee cellulari trasfettate con ALS2 mutata. Studio interazione ALS2 mutata e SOD1 mutato in una linea cellulare neuronale SHSY5Y stabilmente trasfettata con SOD1-G93A. Studio funzionalità mitocondriale, apoptosi, trasportatori del glutammato, ruolo del nitrossido sugli eventi sopra descritti (UO1-2-4). Analisi dell'attività del proteasoma nei diversi modelli cellulari e in diverse condizioni sperimentali (UO3). Applicazione di tecnologie di silenziamento genico (UO2).

Fase 4 (7-12 mese II anno di attività): conclusione delle attività sperimentali da parte di tutte le UO coinvolte e raccolta dati da parte dell'UO1 per una valutazione complessiva dell'effetto osservato con i diversi fattori citotossici e citoprotettivi nei diversi modelli cellulari.