



**UNIVERSITÀ DI MILANO  
“CENTRO DINO FERRARI”**

PER LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLE MALATTIE  
NEUROMUSCOLARI, NEURODEGENERATIVE E CEREBROVASCOLARI



**FONDAZIONE I.R.C.C.S. CA' GRANDA  
OSPEDALE MAGGIORE POLICLINICO**  
ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE  
SCIENTIFICO DI NATURA PUBBLICA

# **CONSUNTIVO DELLA RICERCA**

## **SCIENTIFICA**

**2022**

COORDINATORE SCIENTIFICO PROF. GIACOMO PIETRO COMI

Via F. Sforza, 35 - 20122 Milano – Tel. 02.5503.3809 - Fax 02.5503.3800

E-mail: giacomo.comi@unimi.it - [centro.dinoferari@policlinico.mi.it](mailto:centro.dinoferari@policlinico.mi.it) - [www.centrodinoferrari.com](http://www.centrodinoferrari.com)

## **SEZIONI DEL “CENTRO DINO FERRARI”**

LABORATORIO DI BIOCHIMICA E GENETICA	Pag. 3
LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA	Pag. 31
U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI E RARE	Pag. 41
LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI	Pag. 51
CENTRO PARKINSON E ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO	Pag. 69
U.O.S.D. MALATTIE NEURODEGENERATIVE	Pag. 77
LABORATORIO DI CELLULE STAMINALI	Pag. 95
STROKE UNIT	Pag. 105
SEDE DISTACCATA DEL “CENTRO DINO FERRARI” PRESSO DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE LABORATORIO Sperimentale DI NEUROSCIENZE ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO IRCCS UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO	Pag. 111
SEDE DISTACCATA DEL CENTRO “DINO FERRARI” PRESSO IL LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE, CITOGENETICA, ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA- IRCCS E. MEDEA	Pag. 141

## **LABORATORIO DI BIOCHIMICA E GENETICA**

### **RESPONSABILE**

Prof. Giacomo Pietro Comi

### **MEDICI**

Prof.sa Stefania Corti

Dott.sa Francesca Magri

Dott.sa Megi Meneri

### **BIOLOGI**

Dott. Roberto Del Bo

Dott.sa Sabrina Lucchiari

Dott.sa Daniela Piga

Dott.sa Domenica Saccomanno

### **BIOTECNOLOGI**

Prof. Dario Ronchi

Dott.sa Serena Pagliarani

### **TECNICI**

Sig. Francesco Fortunato

Sig.ra Manuela Garbellini

Il Laboratorio di Biochimica e Genetica delle Malattie Neuromuscolari fa parte dell’UOC Neurologia della Fondazione Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano ed è sito all’interno della Fondazione in via Francesco Sforza 35. Gli spazi del laboratorio comprendono un’area di 450 mq al piano terra ed al piano seminterrato del Padiglione Ex-Convitto Suore (Direzione Medica di Presidio) e i locali adibiti ad estrazione di DNA ed analisi di sequenza ubicati presso il Padiglione Invernizzi. La missione del Laboratorio è la definizione delle cause biochimiche e genetiche di un ampio gruppo di patologie neurologiche, ed in particolare alcune forme di malattie genetiche neuromuscolari che comprendono, tra le altre, le Distrofinopatie (Distrofia Muscolare di Duchenne e Becker, DMD e BMD), le Distrofie Muscolari dei cingoli (Limb Girdle Muscular Dystrophy, LGMD), le Miopatie Congenite (CM), le miopatie metaboliche con alterazione del metabolismo glucidico (es. Glicogenosi), lipidico e del metabolismo ossidativo (es. Malattie Mitocondriali), le malattie neurodegenerative del motoneurone ad esordio infantile (es. Amiotrofia Spinale SMA5q) ed adulto (es. Sclerosi Laterale Amiotrofica). L’incidenza di queste patologie seppur variabile è comunque inferiore a 1:10000 (malattie rare). Il Laboratorio è punto di riferimento per l’analisi di alcune forme rarissime (neglette) di patologie neuromuscolari dell’infanzia come l’Amiotrofia Spinale con Distress Respiratorio (SMARD1, 1:100.000) e l’Amiotrofia Spinale con Epilessia Mioclonica Progressiva (SMA-PME, 1:1.000.000). Complessivamente le forme monogeniche di malattia neuromuscolare diagnosticate nel Laboratorio sono più di 100, analizzate mediante l’uso di un ampio numero di tecniche molecolari. L’attività di diagnosi molecolare di queste condizioni rare di malattia è stimabile complessivamente in circa 600 prestazioni / anno erogate dal Laboratorio di Biochimica e Genetica dell’UOC di Neurologia.

Il Laboratorio è articolato in un’ampia area di ricerca scientifica come parte del Centro Dino Ferrari, una struttura dell’Università degli Studi di Milano dedicata alla comprensione dell’ezziopatogenesi delle malattie neuromuscolari e neurodegenerative ed alla messa a punto di terapie farmacologiche e molecolari per il loro trattamento. Accanto alla missione scientifica si colloca quella didattica, testimoniata dalla frequentazione del laboratorio di personale universitario (docente e non docente) strutturato convenzionato, di studenti dei corsi di Specializzazione in Neurologia e Genetica Medica, di studenti della Scuola di Dottorato in Medicina Molecolare, di studenti provenienti dai corsi di laurea in Medicina e Chirurgia, Medicina e Chirurgia (PhD), Biotecnologie Mediche e Farmaceutiche, Scienze Biologiche. Tecnico di Laboratorio Biomedico.

Al mondo si calcola che le patologie rare siano più di 8.000, e il 75% riguarda la popolazione pediatrica. Oltre il 50% delle malattie rare è di natura neurologica. L’identificazione del difetto molecolare alla base di queste patologie è rilevante per diverse finalità: i) conferma della diagnosi clinica o biochimica; ii) identificazione di specifici sottotipi della patologia in esame; iii) migliore definizione della prognosi, sulla base di correlazioni genotipo-fenotipo; iv) counselling genetico. Quest’ultimo aspetto rappresenta una sfida complessa. Infatti, nell’ambito delle malattie neurologiche rientrano patologie diverse per ereditarietà, età di esordio ed evoluzione con uno spettro che va da fenotipi ad esordio pediatrico (o neonatale) con aspetti sindromici (es. sindromi metaboliche genetiche) o limitati a specifici distretti (es. distrofie muscolari), fino a malattie dell’adulto, ad andamento progressivo, potenzialmente molto invalidanti (es. malattie neurodegenerative).

L’identificazione del difetto molecolare assume oggi maggiore importanza dato che molti approcci sperimentali vengono sviluppati per la modifica temporanea (es. exon skipping, oligonucleotidi antisenso) o la correzione permanente (terapia genica sostitutiva, editing genomico) del singolo difetto genetico. Inoltre, alcuni farmaci di nuova generazione sono indicati solo in pazienti portatori di uno specifico difetto molecolare rendendo l’identificazione di questo difetto cruciale (es. Ataluren nella Distrofia Muscolare di Duchenne dovuta a mutazioni che causano codoni di STOP prematuri), non solo per la definizione della patologia ma anche per l’accesso alla terapia (o ai trial clinici ad essa preliminari).

La diagnosi molecolare delle malattie neurologiche si avvale ora di una serie eterogena di tecniche di base (Southern blot, MLPA, PCR convenzionale o quantitativa) che trovano il culmine nel

sequezimento di geni malattia. Quest'approccio è particolarmente utile in presenza di opportuni indicatori (clinici, strumentali, biochimici) che possano indirizzare l'analisi molecolare ma non sempre è sufficiente (più geni che causano lo stesso fenotipo, es. distrofie muscolari dei cingoli) o conveniente (screening di geni di grandi dimensioni, es. DMD, NEB). Inoltre, molte patologie neurologiche presentano una elevata sovrapposizione clinica (es. disturbi del movimento) e una eterogeneità genetica tale (es. Sclerosi Laterale Amiotrofica) da rendere questa strategia, "trial and error", poco utile per il paziente (ritardo nella diagnosi, ripetizione di analisi in più centri) e per il sistema sanitario nazionale (aumento del numero degli esami, moltiplicazione dei costi).

L'introduzione di tecniche basate sul sequenziamento di nuova generazione ha migliorato questo scenario con la definizione di pannelli di geni dedicati a specifiche malattie, analizzati in parallelo. Nonostante i vantaggi introdotti, questa strategia (gene panel sequencing) ha già rivelato i suoi limiti con un successo diagnostico rilevante ma incompleto in alcuni gruppi di malattie come le malattie metaboliche mitocondriali (PMC3523805), le atassie genetiche (PMC3784284, PMC3719425) o le distrofie muscolari (PMID25380242), un dato confermato anche presso il nostro centro (PMC4172906).

L'utilizzo di protocolli di sequenziamento di nuova generazione "estesi" all'esoma permette di superare alcuni dei limiti sopra individuati e risponde perfettamente ad alcune delle linee di ricerca affidate all'IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico.

Mentre l'esoma continua ad essere il riferimento per la ricerca di nuovi geni malattia, la sua applicazione in ambito clinico presenta una serie di difficoltà parzialmente legate al costo dell'analisi ma soprattutto derivanti dalla gestione (tecnica, scientifica, logistica) dei dati ottenuti da questi esperimenti. Dobbiamo anche osservare che anche l'uso dei pannelli genici dedicati ad alcune patologie può presentare dei limiti e non di rado lo stesso paziente, privo di diagnosi dopo la somministrazione di un pannello, deve essere riconsiderato per pannelli di altre patologie (magari sovrapponibili in parte con la sua storia clinica) eseguiti nel nostro laboratorio o in pannelli di altre istituzioni (il cui contenuto genico può essere in parte o grandemente diverso dai geni selezionati per le nostre analisi).

Un compromesso è l'uso dell'esoma clinico, uno strumento che indica l'arricchimento e l'analisi dei soli geni-malattia fin qui imputati nelle patologie mendeliane umane. Questo tipo di approccio realizza un pannello universale che consente di affrontare sia i geni di più grandi dimensioni associati ad un fenotipo, sia le cause genetiche associate a condizioni che entrano in diagnosi differenziale con la malattia di interesse. I geni indagati, circa 8000, costituiscono un impegno per la fase di analisi ma più affrontabile rispetto all'approccio più generale dell'esoma completo. Allo stesso tempo l'esoma clinico è compatibile con la strumentazione di automazione acquisita, migliorando la nostra capacità di generare risultati in tempi rapidi.

Nel corso del 2022 abbiamo implementato l'uso dell'esoma clinico come strumento unificato per la diagnosi molecolare di nuova generazione dei pazienti afferenti al Centro Dino Ferrari. Sono 22 i pazienti arruolati per l'analisi con questo strumento negli ultimi mesi: alcuni sono ancora in corso di analisi. Alcuni esempi di casi per cui abbiamo ottenuto una diagnosi molecolare conclusiva sono qui riportati:

- Identificazione di mutazioni in *TPM3* in un paziente affetto da una forma di miopatia congenita nemalinica: questa diagnosi che prima avrebbe richiesto l'invio del campione presso strutture esterne per l'analisi mediante un pannello genico dedicato è ora fattibile presso il nostro centro
- Identificazione di mutazioni nel gene mitocondriale *POLRMT* in una nuova presentazione clinica famiglia di paraparesi spastica
- Identificazione di mutazioni nel gene del beta sarcoglicano in una paziente affetta da distrofia muscolare dei cingoli: questa diagnosi ha preceduto l'esecuzione della biopsia muscolare, ribaltando il classico approccio nel quale si arrivava al gene dopo l'analisi istologica, istochimica e biochimica della biopsia muscolare del probando.

## 1) Distrofie Muscolari

### 1.1 Aggiornamento sul progetto SEQMD

Il progetto SEQMD (“Combining whole exome and RNA sequencing to identify genetic and molecular pathways in muscular disorders and to characterize patient cohorts for gene therapy”) è un programma di ricerca finanziato nel 2021 mediante il bando piattaforme “Call NGS Platform 2020” promosso dall’IRCCS Fondazione Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico. Il referente del progetto (Principal Investigator, PI) è Giacomo Pietro Comi, Professore Ordinario di Neurologia presso la Statale di Milano e Direttore della Struttura Complessa di Neurologia del Policlinico di Milano. Il progetto è realizzato dal personale afferente al Laboratorio di Biochimica e Genetica per le Malattie Neuromuscolari e alla Struttura Semplice per le Malattie Neuromuscolari Rare e si avvale della collaborazione del personale della facility per il sequenziamento di nuova generazione del Policlinico (Direzione Scientifica).

SEQMD si propone di espandere le basi genetiche delle malattie neuromuscolari e in particolare di alcuni gruppi di patologie che interessano prevalentemente il muscolo scheletrico. Nonostante gli obiettivi conseguiti negli ultimi anni, più della metà dei pazienti affetti da queste forme di malattie ereditarie è attualmente privo di una diagnosi molecolare.

L’identificazione di nuovi geni o la scoperta del loro coinvolgimento in nuove presentazioni cliniche consente di superare questo ostacolo (ponendo fine a quelle che per alcuni pazienti diventano odissee diagnostiche) e di stabilire le modalità di trasmissione di queste malattie genetiche un elemento cruciale per il counselling genetico e la definizione del rischio di ricorrenza cioè la probabilità con cui la malattia si può presentare in altri membri della famiglia del paziente. Inoltre, negli ultimi anni, stiamo assistendo ad una “rivoluzione” nel campo delle malattie neuromuscolari legata alla disponibilità di farmaci innovativi il cui meccanismo di azione sfrutta gli aspetti molecolari peculiari di un gene e talvolta delle varianti nel DNA identificate nel singolo paziente.

Il progetto prevede due fasi, la prima delle quali è l’analisi dell’intera sequenza codificante del DNA (esoma) nei pazienti arruolati per lo studio. Questo tipo di approccio espande il perimetro della ricerca dei difetti genetici a tutte le regioni codificantи del genoma, superando i limiti degli approcci tradizionali (analisi sequenziale di più geni) e di quelli più recenti basati sull’analisi simultanea di gruppi (pannelli) di geni affini alla patologia del paziente. Questa strategia consente quindi sia l’identificazione di nuovi geni malattia che l’associazione di geni già identificati a nuove presentazioni cliniche. La seconda fase del progetto prevede l’analisi dei geni effettivamente espressi (trascrittoma) nel tessuto muscolare dei pazienti, collezionato mediante biopsia muscolare diagnostica e conservato nella Biobanca Telethon presso il Centro Dino Ferrari. L’analisi del trascrittoma muscolare ha un duplice scopo: integra e completa l’analisi molecolare del DNA effettuata mediante il sequenziamento dell’esoma e fornisce indicazioni utili relativamente ai meccanismi che si instaurano nel muscolo dei pazienti in seguito a malattia, un elemento utile per comprendere come la malattia si determina (patogenesi) ed identificare nuovi potenziali bersagli terapeutici. Entrambe le analisi vengono svolte grazie alla piattaforma di sequenziamento di nuova generazione Illumina NextSeq 2000 disponibile in Fondazione.

I circa cento pazienti arruolati in questo studio sono suddivisi in tre gruppi: i) pazienti con forme di miopatia congenita o distrofie muscolare rimasti privi di diagnosi genetica dopo l’applicazione di indagini diagnostiche standard svolte nel nostro o in altri Centri; ii) pazienti con difetti primari nel metabolismo ossidativo mitocondriale del muscolo, un gruppo eterogeneo di malattie da anni studiate nei nostri laboratori e per quali abbiamo già contribuito a trovare molte nuove cause genetiche; iii) pazienti affetti da miopatia a corpi inclusi, una rara presentazione neuromuscolare le cui basi molecolari rimangono ancora misteriose e che da pochi anni sono oggetto di studio mediante tecniche di analisi estensive (omiche).

La prima fase del progetto sarà completata entro il mese di dicembre 2022 e sono attualmente in corso le analisi sui dati fin qui raccolti. Abbiamo finora ottenuto una diagnosi in 2/3 dei pazienti con presentazioni neuromuscolari rare studiati e questi risultati sono descritti in prodotti della ricerca, ora in preparazione. Il risultato più rilevante è stata la identificazione di varianti in due geni fin qui non coinvolti nelle patologie umane e che possono spiegare una forma di miopatia con disturbo della conduzione cardiaca e una forma di miopatia congenita con accumulo di corpi nemalinici. L'uso di strumenti bioinformatici ci ha consentito di identificare altri pazienti con mutazioni negli stessi geni e di attivare collaborazioni internazionali per verificare l'impatto delle varianti trovate nei tessuti e nei modelli cellulari derivati dai pazienti.

Nel campo delle disfunzioni mitocondriali primarie sono in corso le analisi per l'identificazione di varianti in geni comuni a più pazienti della coorte analizzata. Nel frattempo, due geni recentemente riportati in letteratura sono stati associati a nuove forme di malattia, allargando l'eterogeneità clinica e genetica che caratterizza le malattie mitocondriali.

Infine, abbiamo completato il sequenziamento dei pazienti con miopatia di corpi inclusi e i dati raccolti saranno utilizzati per la verifica dei geni recentemente implicati in questa patologia e in nuove analisi di singolo paziente e di gruppo sempre finalizzate alla delucidazione di varianti rare in grado di contribuire a questa particolare condizione.

Nei primi mesi del 2023 provvederemo a completare la fase due del progetto con le analisi sul trascrittoma muscolare per cui stiamo attualmente iniziando la fase di preparazione del campione. Nel frattempo, sono in corso le verifiche genetiche, bioinformatiche e biochimiche sulle nuove varianti fin qui identificate, un aspetto fondamentale per rafforzare la solidità dei dati molecolari, traducendoli in risultati "sicuri" da comunicare ai pazienti.

## **1.2 Correzione in vitro di una nuova mutazione che altera lo splicing fisiologico nel gene SGCB del beta-sarcoglicano in un caso di Distrofia Muscolare dei Cingoli**

In questa ricerca abbiamo identificato e caratterizzato una nuova mutazione nel gene *SGCB*, che codifica per la proteina beta-sarcoglicano, in un giovane paziente italiano mediante analisi di sequenziamento di nuova generazione. La nuova variante interessa un pseudoesone che, a seguito del difetto molecolare, viene incluso nel trascritto del gene generando la perdita di funzione del trascritto stesso. La stessa variante è stata identificata in un secondo paziente pubblicato più di venti anni fa ma senza una diagnosi molecolare conclusiva. L'analisi del muscolo scheletrico e del tessuto cardiaco ci ha permesso di chiarire il meccanismo di azione di questo nuovo difetto molecolare e, cosa più importante, di disegnare una sequenza antisenso basata su chimica morfolino per la correzione del difetto di splicing. La somministrazione di questa sequenza alle cellule staminali pluripotenti indotte ottenute a partire dai linfociti del nostro paziente ha consentito di ripristinare parzialmente il normale trascritto del beta-sarcoglicano e di ottenere un guadagno nella stabilità della proteina. Questo approccio rappresenta un esempio di medicina molecolare personalizzata in cui l'identificazione di un difetto raro in un paziente ha consentito di mettere a punto una strategia molecolare mirata. Questi esempi dimostrano l'efficacia delle terapie molecolari basate su oligonucleotidi antisenso per la correzione dei difetti di splicing. Queste terapie saranno complementari agli approcci di terapia genica attualmente in corso.

Magri F, Zanotti S, Salani S, Fortunato F, Ciscato P, Gerevini S, Maggi L, Sciacco M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D. Int

*Antisense Morpholino-Based In Vitro Correction of a Pseudoexon-Generating Variant in the SGCB Gene.*

*J Mol Sci.* 2022 Aug 29;23(17):9817. doi: 10.3390/ijms23179817. IF = 6,208

## **1.3 Misurazione dell'intensità di segnale in immunofluorescenza come strumento semi quantitativo per l'analisi dell'espressione delle proteine del complesso dei sarcoglicani nei campioni di biopsia muscolare**

Le sarcoglicanopatie sono patologie molto eterogenee in termini di progressione di malattia, debolezza muscolare, perdita di deambulazione e coinvolgimento cardiaco e/o respiratorio. La severità clinica di solito è correlata alla quantità di proteina residua; quindi, la quantificazione della proteina residua è molto rilevante ai fini diagnostici. La diagnosi di sarcoglicanopatia è di tipo genetico, ma l'analisi del tessuto muscolare, con tecniche immunoistochimiche e di western blot, è ancora necessaria per un corretto processo diagnostico. Sfortunatamente, l'analisi western blot non può essere effettuata se il campione biotico è scarso. Questo studio fornisce uno strumento sensibile per la semi-quantificazione della quantità residua di sarcoglicani nei pazienti affetti da sarcoglicanopatie. La tecnica è basata sulla colorazione in immunofluorescenza delle sezioni di muscolo scheletrico, l'acquisizione delle immagini e la loro elaborazione computerizzata. Questa metodica è stata applicata allo studio di 11 pazienti con sarcoglicanopatia, 7 pazienti con distrofia muscolare di Becker e 4 controlli. I dati di fluorescenza raccolti dai pazienti e comparati con i controlli hanno mostrato una riduzione significativa dell'espressione del sarcoglicano mutato e una riduzione variabile degli altri sarcoglicani. I dati di fluorescenza normalizzati analizzati in relazione all'età di esordio della patologia mostrano una correlazione negativa tra il segnale di fluorescenza del sarcoglicano  $\alpha$  versus la fibrosi in pazienti con età di esordio precoce e una correlazione negativa tra il segnale del sarcoglicano  $\delta$  e la fibrosi nei gruppi con età di esordio intermedia e tardiva. La disponibilità di un metodo che permette una quantificazione oggettiva delle proteine sarcolemmali, capace di rilevare anche piccole quantità residuali di sarcoglicani con grande sensibilità, più veloce e meno dispendioso del western blot, è estremamente utile per meglio definire sia la prognosi del paziente che l'evoluzione della malattia. Il metodo proposto può essere impiegato anche per monitorare l'efficacia degli interventi terapeutici durante i trial clinici.

Zanotti S, Magri F, Poggetti F, Ripolone M, Velardo D, Fortunato F, Ciscato P, Moggio M, Corti S, Comi GP, Sciacco M.

*Immunofluorescence signal intensity measurements as a semi-quantitative tool to assess sarcoglycan complex expression in muscle biopsy.*

**Eur J Histochem.** 2022 Sep 1;66(3):3418. doi: 10.4081/ejh.2022.3418. PMID: 36047345 Free PMC article. IF = 1,966

#### **1.4 Cambiamenti della funzionalità motoria associate ad età, trattamento con corticosteroidi e sito di mutazione in giovani pazienti affetti da DMD.**

Lo scopo di questo studio era di ricercare un possibile effetto dell'età, del trattamento con corticosteroidi e del coinvolgimento della distrofina cerebrale sulle funzioni motorie in giovani ragazzi affetti da distrofia muscolare di Duchenne di età compresa tra 4 e 7 anni. Nello specifico lo studio si poneva lo scopo di verificare se questi cambiamenti fossero o meno spiegabili sulla base di un modello a variabili multiple esplorando l'impatto di diversi parametri sui valori NSAA. Lo studio ha incluso 951 valutazioni North Star (NSAA) che sono state effettuate in 226 pazienti. I soggetti reclutati sono stati stratificati in sottogruppi sulla base dell'età, della localizzazione (sito) della mutazione, del coinvolgimento delle diverse isoforme di distrofina cerebrale e della durata del trattamento con corticosteroidi. Si è osservata una differenza statisticamente significativa nel punteggio massimo North Star nel sottogruppo dei pazienti con diverse isoforme di distrofina cerebrale ( $p = 0,007$ ). In particolare, i pazienti con coinvolgimento di Dp427, Dp140 e Dp71 avevano punteggi NSAA massimi inferiori rispetto a quelli con coinvolgimento di Dp427 e Dp140 o solo di Dp427. Utilizzando un modello di regressione lineare su tutte le valutazioni, è stato osservato che ciascuna delle tre variabili considerate (età, sito di mutazione e trattamento con corticosteroidi) ha avuto un'influenza sui valori di NSAA e sulla loro progressione nel tempo. Una seconda analisi, esaminando i cambiamenti su un periodo di 12 mesi, ha mostrato che all'interno di questo intervallo di tempo l'entità delle variazioni correlava con il trattamento con corticosteroidi ma non con il sito di mutazione. I risultati ottenuti suggeriscono dunque che ciascuna delle variabili considerate sembra svolgere un ruolo nella progressione dei punteggi NSAA nei pazienti di età compresa tra 4 e 7 anni e

che queste dovrebbero quindi essere attentamente considerate nel disegno di uno studio sui ragazzi in specifico questo range di età.

Coratti G, Lenkowicz J, Norcia G, Lucibello S, Ferraroli E, d'Amico A, Bello L, Pegoraro E, Messina S, Ricci F, Mongini T, Berardinelli A, Masson R, Previtali SC, D'angelo G, Magri F, Comi GP, Politano L, Passamano L, Vita G, Sansone VA, Albamonte E, Panicucci C, Bruno C, Pini A, Bertini E, Patarnello S, Pane M, Mercuri E; Italian DMD study group.

*Age, corticosteroid treatment and site of mutations affect motor functional changes in young boys with Duchenne Muscular Dystrophy.*

**PLoS One.** 2022 Jul 29;17(7):e0271681. doi: 10.1371/journal.pone.0271681. eCollection 2022. PMID: 35905042 Free PMC article. IF = 3,752

### **1.5 MicroRNA utilizzati come biomarcatori sierici nella Distrofia Muscolare di Becker**

La distrofia muscolare di Becker è una patologia neuromuscolare legata al cromosoma X e causata da mutazioni nel gene DMD che codifica per la proteina distrofina. Nonostante presenti un'ampia variabilità clinica, la distrofia muscolare di Becker è caratterizzata da degenerazione muscolare progressiva e debolezza muscolare prossimale. L'espressione di alcuni microRNA muscolo-specifici, chiamati myomirs, risulta deregolata in pazienti affetti da distrofie muscolari, anche se solo pochi studi sono stati condotti sulla distrofia muscolare di Becker. Abbiamo quindi analizzato i livelli di espressione sierica di un gruppo di myomirs in una coorte di 29 pazienti affetti da distrofia muscolare di Becker ancora ambulanti e classificati secondo il grado di alterazioni riscontrate alla biopsia muscolare, e in 11 controlli di età corrispondente. Nella nostra coorte di pazienti con distrofia muscolare di Becker abbiamo trovato una significativa sovraespressione di miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206. I nostri dati supportano il ruolo di questi microRNA nella patofisiologia della malattia, inoltre abbiamo identificato dei livelli sierici che possono fungere da cut-off discriminando i pazienti dai controlli e confermando il potenziale dei microRNA circolanti come promettenti biomarcatori non invasivi. I dati emersi da questo studio dimostrano che i myomirs sierici possono rappresentare uno strumento efficace che può essere utilizzato per stratificare i pazienti, sia per monitorare la progressione di malattia sia per valutare l'efficacia di eventuali terapie nell'ambito di un trial clinico.

Gagliardi D, Rizzuti M, Brusa R, Ripolone M, Zanotti S, Minuti E, Parente V, Dionisio L, Cazzaniga S, Bettica P, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Magri F, Velardo D.

*MicroRNAs as serum biomarkers in Becker muscular dystrophy.*

**J Cell Mol Med.** 2022 Sep;26(17):4678-4685. doi: 10.1111/jcmm.17462. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35880500 Free PMC article. IF = 5,31

### **1.6 Terapia genica mediata da virus adeno-associati per la Distrofia Muscolare di Duchenne: il problema della persistenza del transgene.**

La distrofia muscolare di Duchenne è una patologia recessiva legata al cromosoma X che si manifesta nell'infanzia come una malattia neuromuscolare caratterizzata da progressiva debolezza muscolare e atrofia che causano ritardo dell'acquisizione delle tappe di sviluppo motorio, perdita della deambulazione, insufficienza respiratoria, cardiomiopatia, e morte prematura. La distrofia muscolare di Duchenne è causata da mutazioni nel gene DMD che risultano nella completa mancanza della proteina distrofina. La distrofina è una proteina del citoscheletro che appartiene al complesso delle proteine associate alla distrofina che è coinvolto nella segnalazione cellulare e nella stabilizzazione delle miofibre. Ad oggi, le poche opzioni terapeutiche disponibili si prefiggono di ritardare la progressione di malattia, ma la costante perdita di tessuto muscolare e della sua funzionalità e la morte prematura sono inevitabili. In questo scenario, una delle strategie terapeutiche più promettenti per la distrofia muscolare di Duchenne è rappresentata dalla terapia genica mediata da virus adeno-associati (AAV). La terapia genica per la distrofia muscolare di Duchenne si basa sulla somministrazione di una micro-distrofina esogena, una versione in miniatura della distrofina umana che manca però di alcuni domini non necessari e che codifica per una distrofina più corta ma funzionante. La limitata

persistenza del transgene rappresenta uno dei problemi più significativi che mettono a rischio la traslazione della terapia genica dal laboratorio al letto del paziente. In questo articolo sono stati revisionati tutti gli studi preclinici e clinici riguardanti la terapia genica mediata da virus adeno-associti per la distrofia muscolare di Duchenne, focalizzandosi principalmente sulla persistenza del transgene nei tessuti trasdotti, che può influenzare profondamente l'efficacia e la sostenibilità della terapia genica. Inoltre, viene discusso il ruolo dell'iperattivazione del sistema immunitario dell'ospite nel limitare l'espressione a lungo termine del transgene. In questa prospettiva, ulteriori studi serviranno per meglio comprendere se sia necessaria l'immunosoppressione nei soggetti con distrofia muscolare di Duchenne trattati con AAV per permettere che la terapia possa essere efficace per tutta la vita del paziente.

Manini A, Abati E, Nuredini A, Corti S, Comi GP.

*Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence.*

**Front Neurol.** 2022 Jan 5;12:814174. doi: 10.3389/fneur.2021.814174. eCollection 2021. PMID: 35095747 Free PMC article. Review. IF = 4,003

### **1.7 Analisi dei cambiamenti istologici nei muscoli di pazienti affetti da distrofia muscolare di Becker.**

La distrofia muscolare di Becker (BMD) è una malattia muscolare legata al cromosoma X. Nella sua forma classica la BMD ricalca l'andamento della distrofia muscolare di Duchenne (DMD), così come il fenotipo con ipertrofia dei polpacci e atrofia dei muscoli delle cosce. Rispetto alla DMD, tuttavia, l'esordio è variabile ma sempre più tardivo (indicativamente intorno agli 8 anni) e la progressione più lenta e meno severa. La perdita della deambulazione non avviene in genere prima dei 30 anni e riguarda solo un terzo della popolazione BMD classica. Raramente viene coinvolta in modo significativo la muscolatura respiratoria, mentre resta rilevante il problema cardiaco. L'età di insorgenza, la variabilità clinica, la velocità di progressione e i tessuti interessati mostrano una variabilità molto ampia, rendendo di fatto molto complesso la stesura di un progetto di una sperimentazione clinica per lo sviluppo di farmaci. I cambiamenti istopatologici nel tessuto muscolare scheletrico sono fondamentali per comprendere la patogenesi, ma a tutt'oggi non sono stati ancora completamente chiariti. In questo studio sono state analizzate le biopsie muscolari di un'ampia cohorte di pazienti affetti da BMD, concentrando l'attenzione sui parametri muscolari istopatologici, come fibrosi, sostituzione del grasso, area della sezione trasversale delle fibre, necrosi, fibre rigeneranti, fibre che si dividono, nuclei internalizzati e valutazione della distrofia. I vari parametri istologici sono stati correlati sia con le caratteristiche demografiche che con le valutazioni funzionali cliniche. I risultati più interessanti dello studio sono l'accurata quantificazione del ricambio di tessuto fibro-adiposo e l'identificazione di alcuni aspetti istopatologici che ben si correlano con le performance cliniche. Attraverso l'analisi di correlazione, i pazienti BMD sono stati suddivisi in tre gruppi con caratteristiche istologiche e cliniche ben definite. In conclusione, si tratta del primo studio che analizza in dettaglio le caratteristiche istologiche delle biopsie muscolari in un'ampia cohorte di pazienti con BMD, correlandole a una compromissione funzionale. I dati nella loro totalità rappresentano un valido aiuto per comprendere meglio la progressione istopatologica della malattia e potranno in futuro essere utili per convalidare eventuali studi farmacologici in cui le variazioni a livello della biopsia muscolare siano utilizzate come parametro outcome di misurazione.

Ripolone M, Velardo D, Mondello S, Zanotti S, Magri F, Minuti E, Cazzaniga S, Fortunato F, Ciscato P, Tiberio F, Sciacco M, Moggio M, Bettica P, Comi GP.

*Muscle histological changes in a large cohort of patients affected with Becker muscular dystrophy.*  
**Acta Neuropathol Commun.** 2022 Apr 8;10(1):48. doi: 10.1186/s40478-022-01354-3. PMID: 35395784 Free PMC article. IF = 6,43

## **1.8 Modificatori genetici in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne e loro ruolo sulla funzionalità degli arti superiori**

La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia neuromuscolare caratterizzata da atrofia e debolezza muscolare a progressione rapida, da degenerazione dei muscoli scheletrici, lisci e cardiaci. La DMD colpisce prevalentemente gli uomini con un'incidenza stimata in 1/3.300 nati maschi. Le femmine di solito sono asintomatiche, anche se una piccola parte delle portatrici presenta forme leggere della malattia (forma sintomatica della distrofia muscolare di Duchenne e Becker nelle femmine portatrici; si veda questo termine). L'esordio avviene nella prima infanzia e i bambini affetti possono presentare ritardo nelle tappe dello sviluppo motorio o ritardo globale. I bambini affetti da DMD non sono di solito capaci di correre o saltare. La DMD è una malattia recessiva legata all'X, nella quale il danno muscolare è dovuto all'assenza completa della distrofina, una proteina del sarcolemma, secondaria a mutazioni del gene DMD (Xp21.2).

I modificatori genetici della distrofia muscolare di Duchenne sono delle varianti localizzate in geni diversi dal gene DMD che causa la malattia; tali varianti si possono invece associare a differenze fenotipiche quali l'insorgenza della malattia, la progressione della stessa o la risposta ad uno specifico trattamento. A tutt'oggi, i modificatori descritti sono stati testati principalmente per le eventuali correlazioni/associazioni con la funzione deambulatoria, mentre il loro effetto sulla funzione dell'arto superiore, che è particolarmente rilevante per la qualità della vita e l'indipendenza nei pazienti non deambulanti, è ancora sconosciuto. In questo studio sono stati analizzati i genotipi in diversi loci modificatori noti (SPP1, LTBP4, CD40, ACTN3) per una possibile correlazione con il punteggio ottenuto mediante la scala Performance Upper Limb (PUL) in una coorte multicentrica italiana e con i valori della scala Brooke nel Cooperative International Neuromuscular Group Duchenne Natural History Study (CINRG-DNHS), utilizzando modelli di equazione di stima generalizzata di dati raccolti longitudinalmente, con età e trattamento con glucocorticoidi come covarianti. Lo snp CD40 rs1883832, precedentemente correlato con la perdita della deambulazione, si è rivelato essere anche un modifikatore della funzione dell'arto superiore, influenzando negativamente la spalla e i domini distali come mostrato dai punteggi della scala PUL ( $p = 0,023$  e  $0,018$ , rispettivamente) nella coorte italiana, così come il punteggio di Brooke ( $p = 0,018$ ) nel CINRG-DNHS. Inoltre nello studio sono stati individuati effetti significativi di ACTN3 sul gomito e sulla funzione distale oltre a confermare l'effetto dannoso dell'allele G in SPP1 rs28357094 allele nella coorte di validazione. Nella loro totalità i risultati ottenuti potranno essere utilizzati nella progettazione e nell'interpretazione di specifici studi clinici in pazienti DMD, in particolare laddove verranno studiate specifiche e selezionate coorti di pazienti; inoltre, i modificatori genetici identificati potranno rappresentare potenziali bersagli terapeutici futuri.

Sabbatini D, Fusto A, Vianello S, Villa M, Janik J, D'Angelo G, Diella E, Magri F, Comi GP, Panicucci C, Bruno C, D'Amico A, Bertini E, Astrea G, Battini R, Politano L, Masson R, Baranello G, Previtali SC, Messina S, Vita G, Berardinelli A, Mongini T, Pini A, Pane M, Mercuri E, Hoffman EP, Morgenroth L, Gordish-Dressman H, Duong T, McDonald CM, Bello L, Pegoraro E.

*Genetic modifiers of upper limb function in Duchenne muscular dystrophy.*

**J Neurol.** 2022 Sep;269(9):4884-4894. doi: 10.1007/s00415-022-11133-8. Epub 2022 May 5. PMID: 35513612 Free PMC article. IF = 6,174

## **2) Miopatie congenite**

### **2.1 Un nuovo caso di miopatia congenita megaconiale con mutazioni nel gene CHKB e revisione della letteratura sull'argomento.**

Questo studio include la caratterizzazione clinica, istologica e molecolare di un nuovo caso di miopatia congenita megaconiale legata a mutazioni nel gene della colina chinasi beta. In questo caso, lo studio clinico è stato seguito dalla biopsia muscolare che ha evidenziato la presenza di mitocondri di dimensioni anomale. Questi mitocondri "giganti" possono essere caratterizzati a livello istologico,

istochimico e mediante microscopia elettronica. Questa scoperta ha indirizzato l'analisi genetica verso il sequenziamento del gene *CHKB* con l'identificazione di due varianti biparentali. Una di queste, nella regione intronica, era nuova e la disponibilità di tessuto muscolare del paziente e di linfociti dei genitori ci ha consentito di chiarire il meccanismo patogenetico alla base della disfunzione dell'allele. Questo studio offre una descrizione molto approfondita degli aspetti istologici e ultrastrutturali di questa condizione. L'estensione dell'analisi ai dati di letteratura già pubblicati sull'argomento ci ha consentito di stabilire delle inedite correlazioni tra genotipo (il tipo di mutazione) e fenotipo (il tipo e la gravità dei sintomi), creando una pubblicazione di riferimento per questa rara patologia.

Magri F, Antognozzi S, Rapolone M, Zanotti S, Napoli L, Ciscato P, Velardo D, Scuvera G, Nicotra V, Giacobbe A, Milani D, Fortunato F, Garbellini M, Sciacco M, Corti S, Comi GP, Ronchi D. *Megaconial congenital muscular dystrophy due to novel CHKB variants: a case report and literature review.*

**Skelet Muscle.** 2022 Sep 29;12(1):23. doi: 10.1186/s13395-022-00306-8. IF = 4,912

## **2.2 Nuove varianti missense della Filamina C individuate nel dominio di legame per l'actina determinano fenotipi variabili.**

La Filamina C è una grande proteina dimerica che lega l'actina, è presente prevalentemente a livello dei dischi Z del muscolo cardiaco e scheletrico, dove è coinvolta nella stabilizzazione meccanica del sarcomero e nella trasmissione dei segnali intracellulari, interagendo mediante legami con numerosi partner proteici. Mutazioni eterozigoti dominanti nel gene della *Filamina C* causano diverse forme di miopatia e cardiomiopatia strutturale o aritmogenica. In questo lavoro abbiamo descritto le caratteristiche cliniche e molecolari di due pazienti italiani, in cui abbiamo identificato due nuove varianti missense nel gene della *Filamina C* localizzate all'interno del dominio di legame per l'actina. Nel lavoro abbiamo riportato anche le caratteristiche istologiche, ultrastrutturali e le immagini di risonanza magnetica muscolare. I nostri risultati sottolineano l'estrema variabilità inter- ed intra-familiare delle manifestazioni cliniche, quindi la necessità di estendere l'indagine anche agli altri parenti asintomatici, e la rilevanza di un esteso approccio diagnostico che coinvolga la microscopia elettronica, la risonanza magnetica del muscolo scheletrico e le tecniche di sequenziamento di nuova generazione.

Velardo D, D'Angelo MG, Citterio A, Panzeri E, Napoli L, Cinnante C, Moggio M, Comi GP, Ronchi D, Bassi MT.

*Case Reports: Novel Missense Variants in the Filamin C Actin Binding Domain Cause Variable Phenotypes.*

**Front Neurol.** 2022 Jul 12;13:930039. doi: 10.3389/fneur.2022.930039. eCollection 2022. PMID: 35903116 Free PMC article. IF = 4,086

## **2.3 Espansione dello spettro fenotipico della Miopatia Distale con debolezza faringea e delle corde vocali dovuta alla mutazione p.S85C nel gene MATR3.**

La variante c.254C>G (p.S85C) nel gene *MATR3* causa una Miopatia Distale con debolezza faringea e delle corde vocali (VCPDM), che è caratterizzata da progressiva, asimmetrica debolezza della muscolatura prevalentemente distale, disfonia, disfagia e compromissione respiratoria. In questo lavoro descriviamo un paziente con un fenotipo composito, caratterizzato da VCPDM e da una polineuropatia sensomotoria.

Il probando ha effettuato una valutazione neurologica, con risonanza magnetica muscolare degli arti inferiori, biopsia muscolare e spirometria, che ha evidenziato la presenza di debolezza muscolare distale progressiva, ipotrofia, mialgie, disfonia, disfagia, compromissione respiratoria e anomalie sensoriali. L'analisi neurofisiologica ha rivelato una grave polineuropatia sensomotoria, mentre la biopsia muscolare ha evidenziato delle fibre muscolari caratterizzate da variabilità del calibro, nuclei centrali e vacuoli *nonrimmed*.

Dopo aver escluso le cause genetiche e acquisite più comuni della polineuropatia sensomotoria, un vasto gruppo di geni coinvolti nelle forme ereditarie di neuropatia, miopatia distale e malattie del motoneurone sono stati analizzati mediante sequenziamento di nuova generazione usando pannelli genetici mirati, trovando nel paziente la sostituzione c. 254C>G (p.S85C) nel gene *MATR3*.

Questa scoperta estende lo spettro fenotipico della VCPDM associata a mutazioni in *MATR3* e suggerisce di considerare l'analisi di *MATR3* nelle sospette polineuropatie congenite con caratteristiche strane, che comprendano disfonia, disfagia ed insufficienza respiratoria.

Manini A, Velardo D, Ciscato P, Cinnante C, Moggio M, Comi G, Corti S, Ronchi D.

*Expanding the Phenotypic Spectrum of Vocal Cord and Pharyngeal Weakness With Distal Myopathy due to the p.S85C MATR3 Mutation.*

*Neurol Genet.* 2022 Jul 6;8(4):e200006. doi: 10.1212/NXG.0000000000200006. eCollection 2022 Aug. PMID: 35812165 Free PMC article. IF = 3,663.

#### **2.4 Approccio schematico per definire la prevalenza delle varianti COL-VI nei pazienti analizzati in cinque anni di sequenziamento di nuova generazione.**

Negli ultimi cinque anni sono state raccolte informazioni cliniche e molecolari di 512 pazienti con sintomi neuromuscolari. L'obiettivo di questo lavoro è stato definire la prevalenza delle varianti nei geni del collagene VI nei pazienti non diagnosticati con sospetta malattia neuromuscolare, attraverso un approccio di sequenziamento di nuova generazione, e proporre uno schema diagnostico per stabilire la reale patogenicità di queste varianti.

Lo schema diagnostico multistep ideato ha preso in considerazione il peso bioinformatico delle varianti genetiche, la loro correlazione con le manifestazioni cliniche ed i possibili effetti sulla stabilità ed espressione della proteina.

Nella prima fase sono state identificate delle varianti nei geni associati a COL VI in 48 pazienti, di cui 3 erano varianti omozigoti. Poi si sono selezionate le varianti in base al loro punteggio CADD, ai dati clinici ed agli studi complementari (come risonanza magnetica muscolare, biopsia muscolare e di cute, studio dell'espressione del COL VI nei fibroblasti o nel muscolo). Infine, si è stabilito come le varianti potenzialmente patogeniche (2 bialleliche e 12 monoalleliche) destabilizzano le subunità COL6A1 -A2 -A3. Complessivamente, a 15 su 512 pazienti è stata data priorità basandosi su questo schema ed in 7 pazienti è stata confermata una espressione del collagene VI ridotta o assente all'immucitochimica effettuata sui fibroblasti coltivati da cute o nel tessuto muscolare.

In conclusione, nella diagnostica delle patologie neuromuscolari eterogenee un'integrazione multistep dei dati clinici e molecolari ha permesso l'identificazione di circa il 3% dei pazienti che portano varianti patogenetiche nel collagene VI.

Marinella G, Astrea G, Buchignani B, Cassandrini D, Doccini S, Filosto M, Galatolo D, Gallone S, Giannini F, Lopergolo D, Maioli MA, Magri F, Malandrini A, Mandich P, Mari F, Massa R, Mata S, Melani F, Moggio M, Mongini TE, Pasquariello R, Pegoraro E, Ricci F, Ricci G, Rodolico C, Rubegni A, Siciliano G, Sperti M, Ticci C, Tonin P, Santorelli FM, Battini R.

*A Schematic Approach to Defining the Prevalence of COL VI Variants in Five Years of Next-Generation Sequencing.*

*Int J Mol Sci.* 2022 Nov 23;23(23):14567. doi: 10.3390/ijms232314567. PMID: 36498898 Free PMC article. IF = 6,006

#### **2.6 Espansione dello spettro clinico-patologico e genetico delle Miopatie Congenite con core e minicore associate a mutazioni in RYR1: uno studio sulla popolazione italiana.**

Le mutazioni nel gene *RYR1*, codificante per il recettore 1 della rianodina (RyR1), sono una delle cause di Central Core Disease (CCD) e Multiminicore Disease (MmD). In questo lavoro è stata analizzata una coorte di 153 pazienti con una diagnosi istopatologica di miopatia dovuta alla presenza di core alla biopsia muscolare (*cores* e *minicores*) per ricercare mutazioni nel gene *RYR1*. È stata identificata almeno una mutazione in *RYR1* in 69 pazienti, che sono stati ulteriormente studiati dal punto di vista clinico ed istopatologico. Il fenotipo clinico era altamente eterogeneo, andando

dall'iperCKemia asintomatica o paucisintomatica alla grave debolezza muscolare e deformità scheletrica con perdita della deambulazione. Sono state identificate 68 mutazioni, generalmente missense, nel gene *RYR1* di cui 16 erano nuove. L'analisi combinata della manifestazione clinica, del decorso della malattia e delle analisi bioinformatiche sulla struttura proteica di *RYR1* hanno permesso di associare alcuni fenotipi a mutazioni in domini specifici. In aggiunta, questo lavoro ha sottolineato il potenziale dell'analisi bioinformatica strutturale nella predizione della patogenicità delle mutazioni in *RYR1*. Nel prossimo futuro ci si può aspettare un'ulteriore avanzamento nella comprensione della relazione tra genotipo e fenotipo nelle miopatie: data l'attuale mancanza di una struttura cristallina della proteina RyR1 umana insieme alla presenza di regioni intrinsecamente disordinate e data la frequente presenza di più di una mutazione in *RYR1* nei pazienti con miopatia da *core*, la progettazione di nuove strategie investigative si rende necessaria per comprendere completamente l'effetto delle mutazioni in *RYR1*.

Fusto A, Cassandrini D, Fiorillo C, Codemo V, Astrea G, D'Amico A, Maggi L, Magri F, Pane M, Tasca G, Sabbatini D, Bello L, Battini R, Bernasconi P, Fattori F, Bertini ES, Comi G, Messina S, Mongini T, Moroni I, Panicucci C, Berardinelli A, Donati A, Nigro V, Pini A, Giannotta M, Dosi C, Ricci E, Mercuri E, Minervini G, Tosatto S, Santorelli F, Bruno C, Pegoraro E.

*Expanding the clinical-pathological and genetic spectrum of RYR1-related congenital myopathies with cores and minicores: an Italian population study*

**Acta Neuropathol Commun.** 2022 Apr 15;10(1):54. doi: 10.1186/s40478-022-01357-0. PMID: 35428369. IF = 6,43.

### 3) Malattie mitocondriali e miopatie metaboliche

#### 3.1 Uno studio sul ruolo del gene *TWNK* (elicasi mitocondriale Twinkle) nella malattia di Parkinson

Il nostro laboratorio si occupa da anni dello studio dei difetti dell'alterazione del metabolismo del DNA mitocondriale. In particolare, mutazioni in Twinkle (gene *TWNK*), la principale elicasi mitocondriale, si associano a casi di miopatia mitocondriale con trasmissione autosomico dominante. È interessante osservare che mutazioni nei geni che partecipano alla replicazione e riparazione nel DNA mitocondriale sono sempre più implicate in malattie neurodegenerative e soprattutto la malattia di Parkinson. Dato che il nostro centro si occupa anche di questo disturbo del movimento siamo nella condizione di indagare in modo approfondito questo legame. In questa pubblicazione abbiamo valutato varianti nel gene *TWNK* in 263 pazienti con Parkinson ma senza anomalie mitocondriali evidenti e abbiamo considerato anche un gruppo di pazienti mutati *TWNK* con miopatia mitocondriale e segni di parkinsonismo. Abbiamo identificato sei varianti rare in pazienti Parkinson, dimostrando in questo studio di coorte che varianti nel gene *TWNK* possono predisporre l'insorgenza di questa comune malattia neurodegenerativa anche in assenza di segni mitocondriali specifici.

Percetti M, Franco G, Monfrini E, Caporali L, Minardi R, La Morgia C, Valentino ML, Liguori R, Palmieri I, Ottaviani D, Vizziello M, Ronchi D, Di Berardino F, Cocco A, Macao B, Falkenberg M, Comi GP, Albanese A, Giometto B, Valente EM, Carelli V, Di Fonzo A.

*TWNK in Parkinson's Disease: A Movement Disorder and Mitochondrial Disease Center Perspective Study*

**Mov Disord.** 2022 Sep;37(9):1938-1943. doi: 10.1002/mds.29139. Epub 2022 Jul 6. IF = 10,338

#### 3.2 Nuova mutazione in *RRM2B* associata a sindrome da deplezione del DNA mitocondriale

Le sindromi da deplezione del DNA mitocondriale (MDDS) sono patologie caratterizzate da insorgenza nell'età infantile, rapida e grave progressione della patologia con esito fatale nei primi anni di vita. Questo è dovuto alla drastica perdita della quantità di DNA mitocondriale nei tessuti affetti, che colpisce l'attività della catena respiratoria mitocondriale, compromettendo l'equilibrio energetico di un tessuto specifico (muscolo, fegato e cervello) o di più organi contemporaneamente. Mutazioni che danno perdita di funzione sono state trovate in diversi geni codificanti per proteine

coinvolte nel mantenimento del DNA mitocondriale. Nei tessuti proliferanti la replicazione del DNA mitocondriale si basa sul rifornimento citoplasmatico di deossiribonucleotidi (dNTPs), che nelle cellule postmitotiche è garantito da un gruppo dedicato di enzimi mitocondriali appartenenti alla via di recupero dei dNTPs. La subunità regolatoria p53R2 dell'enzima ribonucleotide reduttasi, codificata dal gene *RRM2B*, prende parte nella conversione citoplasmatica *de novo* dei ribonucleosidi difosfati in deossiribonucleosidi difosfati. Mutazioni bialleliche in *RRM2B* sono state associate principalmente a MDDS miopatica ad insorgenza infantile, ma sono stati descritti anche in casi adulti di encefalopatia neurogastrointestinale e in pazienti con lieve fenotipo miopatico e accumulo di delezioni multiple del DNA mitocondriale nel muscolo scheletrico. In questo lavoro abbiamo descritto le caratteristiche cliniche, molecolari e biochimiche di un paziente che mostrava grave ipotonìa, tubulopatia prossimale e ipoacusia neurosensoriale dopo la nascita. Dall'analisi del DNA mitocondriale è emersa una grave deplezione del DNA mitocondriale ed una ridotta attività della catena respiratoria nel muscolo, causata da due mutazioni nel gene nucleare *RRM2B* (c.686G>T e c.551-2A>G).

Fumagalli M, Ronchi D, Bedeschi MF, Manini A, Cristofori G, Mosca F, Dilena R, Sciacco M, Zanotti S, Piga D, Ardissono G, Triulzi F, Corti S, Comi GP, Salviati L.

*A novel RRM2B mutation associated with mitochondrial DNA depletion syndrome.*

**Mol Genet Metab Rep.** 2022 Jun 18;32:100887. doi: 10.1016/j.ymgmr.2022.100887. eCollection 2022 Sep. PMID: 35756861 Free PMC article. IF = 1,95.

### **3.3 Rare mutazioni omozigoti in *RNASEH1* associate ad Encefalomiopatia mitocondriale ad insorgenza nell'età adulta e delezioni multiple del DNA mitocondriale.**

Le patologie da mantenimento del DNA mitocondriale (mtDNA) comprendono un vasto gruppo di sindromi cliniche distinguibili per la presenza di deplezione del mtDNA e/o delezioni multiple nei tessuti affetti. Tra i geni nucleari associati con le patologie da mantenimento del mtDNA, le mutazioni in *RNASEH1* producono un fenotipo omogeneo, con oftalmoplegia esterna progressiva (PEO), ptosi, debolezza agli arti, atassia cerebellare e disfagia. Il gene codifica per l'enzima ribonucleasi 1, che è coinvolta nella replicazione del mtDNA, la cui compromissione porta ad un rallentamento della replicazione del mtDNA e all'accumulo degli intermedi di replicazione. In questo lavoro abbiamo descritto due pazienti italiani non imparentati, affetti da PEO cronica, ptosi e debolezza muscolare. Un paziente presentava anche alcune caratteristiche cerebellari ed una grave disfagia che ha richiesto la nutrizione enterale. In entrambi i pazienti la biopsia muscolare ha rivelato diffuse anomalie mitocondriali e l'analisi molecolare ha evidenziato le delezioni multiple del mtDNA. L'analisi mirata di sequenziamento di nuova generazione ha mostrato la presenza di due mutazioni in *RNASEH1*, c.129-3C>G nel paziente 1 e c.424G>A nel paziente 2. La sostituzione c.129-3C>G non è stata mai descritta come associata a malattia, tale mutazione era localizzata nel sito di splicing e comportava la perdita dell'esone 2 nel trascritto ottenuto dal muscolo del paziente 1. In conclusione, da questo lavoro emerge l'importanza di aumentare l'utilizzo degli approcci di sequenziamento ad alto rendimento in ambito clinico, per arrivare alla diagnosi genetica nei casi di presentazione clinica sospetta con alterata omeostasi del DNA mitocondriale.

Manini A, Caporali L, Meneri M, Zanotti S, Piga D, Arena IG, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Carelli V, Ronchi D.

*Case Report: Rare Homozygous RNASEH1 Mutations Associated With Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy and Multiple Mitochondrial DNA Deletions.*

**Front Genet.** 2022 May 31;13:906667. doi: 10.3389/fgene.2022.906667. eCollection 2022. PMID: 35711919 Free PMC article. IF = 4,772

### **3.4 Varianti bialleliche nel gene ENDOG sono associate a miopatia mitocondriale con accumulo muscolare di delezioni multiple del DNA mitocondriale.**

Questo studio in collaborazione con l'Istituto Carlo Besta vede l'identificazione di una nuova causa genetica in un paziente affetto da miopatia mitocondriale con compromissione della mobilità della

muscolatura estrinseca dell'occhio. Il nuovo gene, *ENDOG*, codifica per una endonucleasi attiva per la replicazione e la riparazione del DNA mitocondriale. In questo modo ampliamo il numero di difetti genetici coinvolti nelle anomalie del mantenimento del DNA mitocondriale, una linea di ricerca a cui il nostro laboratorio ha dato importanti contributi nel corso degli anni. Il lavoro contiene la descrizione clinica dell'unico paziente finora identificato con mutazioni in questo gene, delle caratteristiche istologiche del suo muscolo e la caratterizzazione della instabilità del DNA mitocondriale su muscolo e cellule primarie ottenute dal paziente. Anche in questo caso il sequenziamento di nuova generazione si è rivelato fondamentale per l'identificazione di questo difetto raro in un caso isolato non familiare. Lo studio mediante esoma dei pazienti con accumulo di delezioni multiple del DNA mitocondriale nel muscolo e privi di diagnosi è ancora in corso e promette di identificare nuovi difetti rari nel corso dei prossimi anni.

Nasca A, Legati A, Meneri M, Ermert ME, Frascarelli C, Zanetti N, Garbellini M, Comi GP, Catania A, Lamperti C, Ronchi D, Ghezzi D.

*Biallelic Variants in ENDOG Associated with Mitochondrial Myopathy and Multiple mtDNA Deletions.*

*Cells.* 2022 Mar 12;11(6):974. doi: 10.3390/cells11060974. PMID: 35326425 Free PMC article. IF = 7,666

### **3.5 Deficit di timidina kinasi 2 (TK2): nuova mutazione associata a Miopatia mitocondriale con insorgenza nell'adolescenza e progressione atipica.**

Il gene nucleare *TK2* codifica per la timidina kinasi mitocondriale, un enzima coinvolto nella fosforilazione dei nucleosidi deossicitidina e deossitimidina. Le mutazioni bialleliche in *TK2* sono associate ad uno spettro di presentazioni cliniche che colpiscono principalmente il muscolo scheletrico e che sono caratterizzate da un'instabilità del DNA mitocondriale (mtDNA). La classificazione corrente include forme ad insorgenza neonatale (< 1 anno), infantile (1-12 anni) e tardiva (> 12 anni). Queste forme differiscono, oltre che per l'età d'insorgenza, anche per la progressione, l'attesa di vita ed i segni d'instabilità del mtDNA (deplezione oppure accumulo delle delezioni multiple). La mancanza di *TK2* ad esordio infantile tipicamente causa una grave compromissione respiratoria ed una miopatia prossimale rapidamente progressiva, che porta alla perdita della deambulazione entro 10 anni dall'insorgenza della malattia. Solitamente la biopsia muscolare mostra una combinazione di miopatia mitocondriale e caratteristiche distrofiche, mentre l'analisi molecolare evidenzia una ridotta quantità del mtDNA. In questo lavoro abbiamo descritto il caso di un paziente italiano con una miopatia mitocondriale ad insorgenza infantile lentamente progressiva, ptosi, ipoacusia, disfonia e disfagia, in cui sono state identificate due varianti in *TK2*, c.278A>G e c.543del, quest'ultima non ancora riportata in letteratura. Rispetto agli altri pazienti *TK2* con insorgenza infantile, il nostro caso mostrava delle caratteristiche atipiche di solito osservate nelle forme tardive, come la debolezza muscolare lentamente progressiva e la mancanza dell'insufficienza respiratoria. Questo lavoro estende le conoscenze genetiche sulle miopatie associate a *TK2*, sottolineando la possibile sovrapposizione clinica tra forme differenti.

Manini A, Meneri M, Rodolico C, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Ronchi D.

*Case Report: Thymidine Kinase 2 (TK2) Deficiency: A Novel Mutation Associated With Childhood-Onset Mitochondrial Myopathy and Atypical Progression.*

*Front Neurol.* 2022 Feb 25;13:857279. doi: 10.3389/fneur.2022.857279. eCollection 2022. PMID: 35280287 Free PMC article. IF = 4,086

### **3.6 Correlazione tra l'alterazione del DNA mitocondriale e la disfunzione dopaminergica: stato dell'arte.**

Scopo di questa review è fare il punto sulle conoscenze sulla correlazione tra l'alterazione del DNA mitocondriale (mtDNA) e la disfunzione dopoaminergica. Il mantenimento dell'omeostasi del mtDNA coinvolge una varietà di differenti processi, quali la replicazione, la riparazione e la sintesi dei nucleotidi del DNA mitocondriale stesso; tutti questi processi sono volti a preservare l'integrità

strutturale e funzionale delle molecole del mtDNA. Le mutazioni in diversi geni nucleari (ad es. POLG, POLG2, TWNK, OPA1, DGUOK, MPV17, TYMP) compromettono il mantenimento del mtDNA, portando a sindromi cliniche caratterizzate da deplezione e/o delezioni del mtDNA nei tessuti colpiti. Negli ultimi decenni, gli studi hanno dimostrato un progressivo accumulo di delezioni multiple del mtDNA nei neuroni dopaminergici della substantia nigra nella popolazione anziana e, in misura maggiore, nei pazienti con malattia di Parkinson. Inoltre, il parkinsonismo è stato spesso descritto come una caratteristica clinica prominente nelle sindromi da instabilità del mtDNA. Tra i neuroni, le cellule dopaminergiche sono esposte a livelli più elevati di stress ossidativo dovuto al metabolismo della dopamina. L'accumulo di ROS può danneggiare direttamente i componenti della fosforilazione ossidativa, portando a maggiore produzione di ROS e creando così un ambiente favorevole per mutazioni del mtDNA. Secondo la teoria mitocondriale dell'invecchiamento, il mtDNA tende ad accumulare cambiamenti dannosi per le cellule durante il processo di invecchiamento, anche se i meccanismi specifici coinvolti non sono ancora stati del tutto chiariti. Il parkinsonismo è stato spesso descritto come una caratteristica clinica prominente nelle sindromi da instabilità del mtDNA. Bisogna inoltre sottolineare come tra i geni correlati alla malattia di Parkinson con un ruolo significativo nella biologia mitocondriale, PARK2 e LRRK2 partecipano specificamente al mantenimento del mtDNA. Inoltre, una varietà di modelli murini (ad esempio "Mutator", "MitoPark", "PD-mitoPstI", "Deletor", "Twinkle-dup" e "TwinkPark") hanno fornito prove in vivo che la stabilità del mtDNA è necessaria per preservare l'integrità nigrostriatale. In conclusione, sono molte le evidenze sperimentali cliniche, genetiche e patologiche che supportano l'associazione tra un'alterata omeostasi del mtDNA, la disfunzione dopaminergica e la degenerazione nigrostriatale.

Manini A, Abati E, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Mitochondrial DNA homeostasis impairment and dopaminergic dysfunction: A trembling balance.*

Ageing Res Rev. 2022 Apr;76:101578. doi: 10.1016/j.arr.2022.101578.

Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114397 Review. IF = 10,895

### **3.7 Coesistenza di canalopatia del sodio e di canalopatia del cloro in un paziente: un fenotipo complicato e una diagnosi impegnativa**

Le canalopatie del cloro e del sodio fanno parte delle miotonie non distrofiche (NMD). Mutazioni nel gene CLCN1 causano sia una forma autosomica dominante sia una forma autosomica recessiva di miotonia congenita. Il sintomo principale è una rigidità che peggiora dopo il riposo e migliora con l'esercizio fisico. I pazienti con la forma recessiva spesso presentano ipertrofia e debolezza transitoria principalmente agli arti inferiori. Mutazioni nel gene SCN4A possono causare paralisi periodica iper-, ipo-, normo-kaliemica, paramiotonia congenita, miotonia del canale del sodio o laringospasmo severo episodico nel neonato (SNEL). La miotonia del canale del sodio spesso presenta rigidità ai muscoli del volto, sensibilità al freddo e dolore muscolare mentre nei pazienti con paramiotonia congenita la miotonia peggiora in seguito alla ripetizione dell'esercizio e al freddo. I pazienti affetti da canalopatia del canale del cloro o del canale del sodio spesso mostrano fenotipi e sintomi simili rendendo più difficile ottenere una diagnosi. In questo articolo presentiamo il caso di una donna in cui coesistono sia la canalopatia del canale del sodio che la canalopatia del canale del cloro causando un fenotipo complesso con caratteristiche tipiche sia della miotonia congenita che della paramiotonia congenita. L'inizio dei disturbi è stato nella seconda decade di vita con la comparsa di astenia, debolezza, rigidità agli arti e fenomeno del warm up. I sintomi sono peggiorati negli anni successivi causando dolore retrosternale, tachicardia, rigidità, e dolore agli arti inferiori. La paziente presenta un severo lid lag, ipertrofia ai quattro arti e scariche miotoniche all'EMG. I sintomi sono scatenati dall'esposizione alle basse temperature e la vita della paziente ne risulta compromessa. I dati clinici e quelli strumentali hanno portato all'ipotesi di paramiotonia congenita e alla somministrazione di mexiletina, poi sostituita con acetazolamide a causa di effetti collaterali gastrointestinali. L'analisi del gene SCN4A ha rilevato una nuova variante, p.Glu1607del. Ciò nonostante, la severità della miotonia agli arti inferiori e la sua rigidità generalizzata hanno fatto ipotizzare che la sola alterazione del canale del sodio muscolare Nav1.4 non potesse spiegare esaurientemente questo fenotipo e quindi

si è ipotizzata una seconda causa genetica. Si è quindi analizzato il gene CLCN1 trovando una mutazione in omozigosi (p.Met485Val). Questo caso evidenzia come la corretta identificazione di segni e sintomi fatta da un neurologo esperto sia cruciale per indirizzare verso la diagnosi genetica e la terapia appropriata.

Pagliarani S, Meola G, Filareti M, Comi GP, Lucchiari S.

*Case report: Sodium and chloride muscle channelopathy coexistence: A complicated phenotype and a challenging diagnosis.*

**Front Neurol.** 2022 Aug 23;13:845383. doi: 10.3389/fneur.2022.845383. eCollection 2022. PMID: 36081873 Free PMC article. IF = 4,086

## **4) Amiotrofia Spinale, Sclerosi Laterale Amiotrofica e altre malattie del motoneurone**

### **4.1 Aspetti genetici della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) – geni causativi e fattori genetici di rischio**

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da una perdita progressiva di motoneuroni che porta a paralisi e morte. Le cause della SLA sono in gran parte sconosciute, sebbene siano stati identificati recentemente, grazie alla diffusione di nuove tecnologie di screening massivo, diversi geni causativi. Nel novembre 2011 l'evidenza tra la presenza dell'espansione intronica nel gene C9orf72 e lo sviluppo della malattia ha cambiato lo scenario fino ad allora conosciuto. Circa il 90% delle forme di SLA sono di tipo sporadico (SALS) e senza alcuna eziologia nota. Le forme familiari (FALS) rappresentano circa il 5%-10% dei casi e sono molto eterogenee dal punto di vista genetico. I meccanismi genetici coinvolti nella SLA sono probabilmente più complessi di quanto inizialmente ipotizzato. Si rende quanto mai necessaria una conoscenza approfondita delle componenti genetiche della SLA per indagare i processi che portano allo sviluppo della malattia e per fornire nello stesso tempo nuovi bersagli terapeutici molecolari.

L'attività di ricerca è stata volta a caratterizzare geneticamente un'ampia cohorte di pazienti affetti da SLA reclutati presso l'ambulatorio malattie del motoneurone afferente alla Unità di Neurologia del Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti dell'Università degli Studi di Milano. Il Dipartimento rappresenta un centro di riferimento per la diagnosi e il trattamento delle malattie del motoneurone.

Nel corso del 2022 sono stati analizzati geneticamente 21 nuovi pazienti affetti da SLA probabile (12 pazienti interni e 9 inviati da altri centri). L'attività di laboratorio prevede in una prima rapida fase l'analisi molecolare tramite PCR e sequenziamento diretto con metodica Sanger del gene SOD1, l'esone 6 del gene TARDBP e gli esoni codificanti la porzione carbossi terminale del gene FUS (esoni 13, 14 e 15). Successivamente viene caratterizzata l'eventuale espansione del gene C9orf72. Nel caso di negatività delle analisi genetiche sopra descritte si procede al successivo step di studi genetici mediante metodiche di Next Generation Sequencing. Tali analisi molecolari hanno portato ad individuare in un paziente "sporadico" la mutazione del gene TARDBP p.Ala382Thr. Si tratta di una mutazione già nota e ampiamente caratterizzata in letteratura.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'espansione del gene C9orf72 è in corso la validazione del kit commerciale Asuragen Amplidex PCR/CE C9orf72. Il kit permette un'accurata analisi del numero di ripetizioni soprattutto in mancanza di espansione e quindi di risalire al corretto genotipo del paziente. Sarà quindi possibile individuare la presenza di eventuali pre-expansioni che potranno essere correlate a vari aspetti fenotipici della malattia (ad esempio durata, sito di insorgenza, severità, etc).

A tutt'oggi sono conservati presso la nostra banca 576 DNA estratti da pazienti affetti da malattia del motoneurone, tutti caratterizzati geneticamente per quanto riguarda i 4 geni principali causativi di SLA. Nel corso del 2022 abbiamo caratterizzato la sottopolazione di pazienti portatori di mutazione nel gene SOD1. 19/576 (3.3%) pazienti presentano una mutazione del gene SOD1; di questi, 15 sono pazienti con familiarità (78.9%) e 4 classificabili come sporadici (21.1%). Il sito di

insorgenza per tutti i pazienti è spinale, mentre la durata della malattia è assai variabile (8 mesi – 30 anni). Un totale di 12 diverse mutazioni caratterizza la nostra coorte di pazienti, incluso una mutazione non ancora riportata in letteratura p.Pro67Leu; tutte le varianti sono state classificate come patogeniche o probabile patogeniche in accordo alle linee guida del “American Collage of Medical Genetic and Genomics”. Causa la recente autorizzazione all'utilizzo di una terapia genica con oligo antiseno SOD1 – diretti, un rapido e preciso screening del gene SOD1 in tutti i pazienti risulta essere altamente raccomandato. I dati inclusi in questo studio sono in fase di pubblicazione.

I DNA conservati presso il nostro laboratorio sono stati utilizzati per indagare geneticamente una possibile correlazione tra la Malattia di Huntington e la SLA stessa. La causa genetica della malattia di Huntington è una mutazione nel gene HTT (localizzato sul cromosoma 4) che produce una ripetizione anomala patogenetica di una specifica sequenza di DNA. L'espansione del tratto trinucleotidico CAG porta alla formazione della proteina Huntingina mutata, caratterizzata quindi da una lunga coda di glutamine. La malattia viene trasmessa in forma autosomica dominante. Nelle persone sane la coda contiene fino a 35 unità di glutammina (per la precisione CAG < 27 considerato range di normalità; 27 < CAG < 35 considerata pre-expansione intermedia). Quando le unità di glutammina aumentano, la malattia si manifesta: la proteina, infatti, risulta tossica per le cellule nervose, i neuroni, provocandone la morte in alcune aree del cervello.

Le stesse espansioni sono state recentemente riportate in letteratura in una minoranza di pazienti affetti da demenza frontotemporale (FTD) / sclerosi laterale amiotrofica (SLA) (0,12%). Partendo da queste premesse e con lo scopo di indagare il ruolo della Huntingina, abbiamo quindi analizzato le ripetizioni HTT CAG in una coorte italiana di pazienti affetti da SLA geneticamente non definiti (n = 467, età media insorgenza della malattia 60,6 anni); le stesse ripetizioni sono state quindi analizzate in quasi 300 soggetti italiani sani (età media al prelievo >60 anni). Le differenze osservate tra il gruppo controllo e il gruppo pazienti non hanno raggiunto la significatività statistica; dunque, la frequenza della lunghezza delle ripetizioni era simile tra i due gruppi analizzati sia per quanto riguarda il sottogruppo CAG < 27 che il sottogruppo “intermedio” 27 < CAG < 35 (test di Fisher, p > 0,05). Il dato più interessante era la presenza di un paziente SLA portatore di entrambi gli alleli nel gene HTT pre-expansi (rispettivamente 42 e 37 ripetizioni CAG). L'assenza dei sintomi tipici della malattia di Huntington e il quadro clinico compatibile con la SLA, corroborati dall'accertamento diagnostico, apparentemente escludevano una diagnosi errata di malattia Huntington. In conclusione, nella totalità i dati ottenuti tendono ad escludere un ruolo diretto delle espansioni del gene HTT nella patogenesi della SLA, sebbene sia possibile ritenere la malattia di Huntington e la SLA come facenti parte di un possibile continuum neurodegenerativo.

Manini A, Gagliardi D, Meneri M, Antognozzi S, Del Bo R, Scaglione C, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Analysis of HTT CAG repeat expansion in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022 Nov;9(11):1820-1825. doi: 10.1002/acn3.51673. Epub 2022 Oct 25. PMID: 36285345 Free PMC article. IF = 4,511

#### **4.2 Valutazione di efficacia e sicurezza del farmaco Risdiplam in pazienti affetti da Amiotrofia Spinale di tipo 2 e di tipo 3 non deambulanti: studio SUNFISH, parte 2.**

Questo lavoro riporta i risultati di uno studio clinico multicentrico su pazienti affetti da Amiotrofia Spinale di tipo 2 e di tipo 3 (non deambulanti) trattati con il farmaco ad uso orale Risdiplam. Questo farmaco promuove l'inclusione dell'esone 7 nel trascritto di SMN2 consentendo un recupero della funzione della proteina SMN. Questa terapia orale si affianca all'uso di oligonucleotidi antiseno per via intratecale e alla terapia genica mediante somministrazione sistemica, offrendo una strategia di intervento alternativa e con ottima compliance (in considerazione della somministrazione orale del farmaco). I pazienti sono stati stratificati in cieco in due gruppi con differenti dosi giornalieri e in un gruppo controllo che ha assunto placebo. Lo studio è durato 12 mesi. Non sono stati osservati eventi avversi significativamente diversi nel numero tra i gruppi considerati. I pazienti in trattamento con farmaco hanno mostrato un significativo miglioramento valutato mediante una scala per le funzioni

motorie. Questa ricerca dimostra il miglioramento motorio di pazienti trattati SMA di tipo 2 e 3 dopo trattamento con Risdiplam. L'analisi del sottogruppo mostra come i miglioramenti siano più evidenti nei pazienti più giovani rispetto a quelli con età superiore (il range di età considerato nello studio varia da 2 a 25 anni). Lo studio clinico è ancora in corso e analisi successiva saranno necessarie per confermare i risultati promettenti ottenuti in questo studio.

Mercuri E, Deconinck N, Mazzone ES, Nascimento A, Oskoui M, Saito K, Vuillerot C, Baranello G, Boespflug-Tanguy O, Goemans N, Kirschner J, Kostera-Pruszczyk A, Servais L, Gerber M, Gorni K, Khwaja O, Kletzl H, Scalco RS, Staunton H, Yeung WY, Martin C, Fontoura P, Day JW; SUNFISH Study Group.

*Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial.*

**Lancet Neurol.** 2022 Jan;21(1):42-52. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00367-7. PMID: 34942136. IF = 59,935

#### **4.3 Prevalenza dell'Amiotrofia Spinale in Italia: una indagine sul numero di pazienti seguiti e la terapia a cui sono sottoposti.**

Questa pubblicazione è il risultato dell'analisi di una serie di dati raccolti presso I centri italiani di riferimento per la diagnosi e il trattamento dell'Amiotrofia Spinale. Il nostro centro è un punto di riferimento per questa patologia a livello nazionale ed internazionale. Il centro è impegnato nella diagnosi clinica, strumentale molecolare ma anche nella ricerca traslazionale e clinica in questa patologia. I pazienti SMA seguiti in Italia risultano essere più di 1200 con una prevalenza stimata di 2 su 100.000. Sono stati identificati anche i sottotipi clinici di SMA e sono stati censiti i trattamenti che questi pazienti stanno facendo. Risulta in trattamento l'85% dei pazienti SMA con percentuali che decrescono con la gravità della condizione clinica. Questo studio rappresenta una fotografia dello stato attuale dei pazienti SMA in Italia ed un riferimento per monitorare i cambiamenti di scenario mano a mano che le terapie attuali si rendono più accessibili e se ne introducono nuove.

Coratti G, Ricci M, Capasso A, D'amico A, Sansone V, Bruno C, Messina S, Ricci F, Mongini T, Coccia M, Siciliano G, Pegoraro E, Turri M, Filosto M, Comi G, Masson R, Maggi L, Bruno I, D'Angelo MG, Trabacca A, Vacchiano V, Donati M, Simone I, Ruggiero L, Varone A, Verriello L, Berardinelli A, Agosto C, Pini A, Maioli MA, Passamano L, Brighina F, Carboni N, Garibaldi M, Zuccarino R, Gagliardi D, Siliquini S, Previtali S, Taruscio D, Boccia S, Pera MC, Pane M, Mercuri E; ITASMAC working group.

*Prevalence of Spinal Muscular Atrophy in the Era of Disease-Modifying Therapies: An Italian Nationwide Survey.*

**Neurology.** 2022 Dec 2:10.1212/WNL.0000000000201654.

doi: 10.1212/WNL.0000000000201654. Online ahead of print. PMID: 36460469. IF = 12,258

#### **4.4 Sicurezza ed efficacia di Risdiplasm in pazienti affetti da Amiotrofia Spinale di tipo 1: la seconda parte dello studio Firefish**

Questa pubblicazione include gli studi della seconda parte dello studio Firefish, disegnato per valutare la sicurezza e l'efficacia della terapia orale Risdiplam per il trattamento di pazienti con Amiotrofia Spinale di tipo I, confrontati con una coorte storica di controlli (non trattati) a 24 mesi. Lo studio voleva primariamente valutare la capacità dei bambini trattati di stare seduti per almeno 5 secondi dopo 12 mesi di trattamento con Risdiplam. Dei 41 bambini arruolati, dopo 24 mesi 38 pazienti erano ancora inclusi nello studio e 18 di questi erano in grado di sedersi senza supporto per almeno trenta secondi. Nessun paziente era in grado di stare in piedi senza supporto o camminare. I tre principali eventi avversi registrati sono stati: infezioni respiratorie, polmonite e distress respiratorio, in ordine decrescente. Il trattamento con Risdiplam ha dimostrato di migliorare la funzione motoria e consentire di migliorare le tappe motorie raggiunte nel corso del trattamento. Lo studio di espansione open label consentirà di verificare su un più ampio numero di pazienti la sicurezza e l'efficacia di Risdiplam.

Masson R, Mazurkiewicz-Bełdzińska M, Rose K, Servais L, Xiong H, Zanoteli E, Baranello G, Bruno C, Day JW, Deconinck N, Klein A, Mercuri E, Vlodavets D, Wang Y, Dodman A, El-Khairi M, Gorni K, Jaber B, Kletzl H, Gaki E, Fontoura P, Darras BT; FIREFISH Study Group.

*Safety and efficacy of risdiplam in patients with type 1 spinal muscular atrophy (FIREFISH part 2): secondary analyses from an open-label trial.*

**Lancet Neurol.** 2022 Dec;21(12):1110-1119. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00339-8. Epub 2022 Oct 14. PMID: 36244364 Clinical Trial. IF = 59,935

#### **4.5 Uno studio di storia naturale in pazienti adulti con Amiotrofia Spinale mostra un effetto di genere sulla malattia.**

Questo studio retrospettivo multicentrico ha voluto investigare aspetti poco conosciuti della storia naturale della Amiotrofia Spinale come la funzione motoria nelle differenti età, in classi differenti di malattia e dopo una stratificazione basata s genere. Sono stati considerati i pazienti SMA adulti con diagnosi molecolare confermata di SMA2, SMA3 o SMA4. Le valutazioni cliniche eseguite nei pazienti hanno confermato un effetto di genere a vantaggio di quello femminile rispetto a quello maschile su età di mantenimento della deambulazione, punteggio alla scala clinica di Hammersmith e percentuale di pazienti in grado di sedersi rispetto a quelli in grado di camminare nei sottotipi di SMA considerati. Lo studio pertanto ha verificato l'esistenza di questo effetto di genere particolarmente evidente nelle fasce di età inferiore e nei pazienti con SMA di tipo III.

Maggi L, Bello L, Bonanno S, Govoni A, Caponnetto C, Passamano L, Grandis M, Trojsi F, Cerri F, Gardani A, Ferraro M, Gadaleta G, Zangaro V, Caumo L, Maioli M, Tanel R, Saccani E, Meneri M, Vacchiano V, Ricci G, Sorarù G, D'Errico E, Bortolani S, Pavesi G, Gellera C, Zanin R, Corti S, Silvestrini M, Politano L, Schenone A, Previtali SC, Berardinelli A, Turri M, Verriello L, Coccia M, Mantegazza R, Liguori R, Filosto M, Marrosu G, Tiziano FD, Siciliano G, Simone IL, Mongini T, Comi G, Pegoraro E.

*Adults with spinal muscular atrophy: a large-scale natural history study shows gender effect on disease.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2022 Dec;93(12):1253-1261. doi: 10.1136/jnnp-2022-329320. Epub 2022 Oct 11. PMID: 36220341 IF = 13,654

#### **4.6 Storia naturale dell'atrofia muscolare spinale di tipo 1: uno studio retrospettivo, globale e multicentrico**

ANCHOVY è uno studio multicentrico globale il cui scopo è stato quello di descrivere la storia naturale dell'atrofia spinale muscolare di tipo 1 (SMA) in un'ampia area geografica e fornire la contestualizzazione dei risultati dello studio interventistico FIREFISH ([NCT02913482](#)) sul trattamento con risdiplam nella SMA di tipo 1. I dati sono stati estratti dalle schede mediche dei pazienti i cui primi sintomi erano attribuibili alla SMA di tipo 1 tra i 28 giorni di vita e i tre mesi di vita, con conferma genetica di SMA, e conferma di due copie di survival of motor neuron 2 o numero di copie sconosciuto. Lo studio è iniziato alla data del 1 gennaio 2008 per tutti i siti partecipanti, mentre la data di conclusione è variabile per ciascun sito e dipende dalla locale disponibilità del trattamento. Gli endpoint primari hanno incluso tempo intercorso fino alla morte e/o alla ventilazione permanente e proporzione dei pazienti che raggiungeva le tappe di sviluppo motorio. Gli endpoint secondari hanno incluso tempo intercorso fino all'inizio del supporto respiratorio e nutrizionale. Sono stati analizzati i dati di 60 pazienti provenienti da 9 paesi dell'Asia, dell'Europa e del Nord e Sud America. L'età mediana (interquartile range [IQR]) alla morte o alla ventilazione permanente è stata ~ 7.3 (5.9-10.5) mesi. L'età mediana (IQR) alla ventilazione permanente è stata ~ 12.7 (6.9-16.4) mesi e alla morte ~ 41.2 (7.3-not applicable) mesi. Nessun paziente è stato in grado di imparare a stare seduto senza supporto o ha raggiunto qualsiasi livello di gattonare, stare in piedi o camminare. I risultati dello studio ANCHOVY sono comparabili con i dati pubblicati sulla storia naturale della SMA di tipo 1 dimostrando la progressione devastante di questa patologia, che differisce

marcatamente da quella dei bambini trattati con risdiplam (FIREFISH Part 2). I risultati forniscono aggiunte significative alla letteratura, inclusa una più ampia rappresentazione geografica.

*Natural history of Type 1 spinal muscular atrophy: a retrospective, global, multicenter study.*

Cances C, Vlodavets D, Comi GP, Masson R, Mazurkiewicz-Beldzińska M, Saito K, Zanoteli E, Dodman A, El-Khairi M, Gorni K, Gravestock I, Hoffart J, Scalco RS, Darras BT; ANCHOVY Working Group.

**Orphanet J Rare Dis.** 2022 Jul 29;17(1):300. doi: 10.1186/s13023-022-02455-x. PMID: 35906608 Free PMC article. IF = 3,778

#### **4.7 Inibizione della miostatina e i suoi pathway del segnale per il trattamento dell'atrofia muscolare nella malattia del motoneurone**

La miostatina è un regolatore negativo della crescita del muscolo scheletrico secreto dai miociti scheletrici. Negli anni passati, l'inibizione della miostatina ha acceso l'interesse della comunità scientifica per il suo potenziale di indurre la crescita del muscolo scheletrico e di ridurre o perfino prevenire l'atrofia. Queste caratteristiche ne fanno un promettente target per il trattamento dell'atrofia muscolare nelle malattie del motoneurone, in particolare la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e l'atrofia spinale muscolare (SMA), che sono patologie neurologiche rare, in cui la degenerazione dei motoneuroni porta alla progressiva perdita del muscolo e alla paralisi. Queste malattie comportano un enorme carico di morbilità e mortalità ma, nonostante questo scenario sfavorevole, negli ultimi anni sono stati compiuti diversi progressi terapeutici. Infatti, sono state approvate diverse terapie curative per la SMA, portando a una rivoluzione nell'aspettativa di vita e negli esiti dei pazienti affetti da SMA. Allo stesso modo, tofersen, un oligonucleotide antisenso è ora testato in un trial clinico per l'uso nei pazienti SLA che hanno la mutazione nel gene SOD1. Comunque, queste terapie non sono in grado di fermare completamente o revertire la progressione del danno muscolare. Recentemente, in seguito ai risultati positivi degli studi preclinici è stato avviato un trial per valutare gli effetti di apitegromab, un inibitore della miostatina, in pazienti SMA. In questo contesto, l'inibizione della miostatina può rappresentare un'utile strategia per affrontare i sintomi motori in questi pazienti. Lo scopo di questa revisione è quello di descrivere il pathway della miostatina e il suo ruolo nelle malattie del motoneurone e di riassumere e discutere criticamente gli studi preclinici e clinici degli inibitori della miostatina nella SMA e nella SLA. In seguito, evidenzieremo le promesse e le insidie correlate all'uso degli inibitori della miostatina negli esseri umani per aiutare la comunità scientifica nello sviluppo di futuri trial clinici.

Abati E, Manini A, Comi GP, Corti S.

*Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases.*

**Cell Mol Life Sci.** 2022 Jun 21;79(7):374. doi: 10.1007/s00018-022-04408-w. PMID: 35727341 Free PMC article. Review. IF = 9,261

#### **4.8 Caratterizzazione clinica e genetica di una coorte di pazienti affetti da neuropatia associata a MFN2.**

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una rara neuropatia assonale sensitivo-motoria su base ereditaria causata da mutazioni nel gene MFN2; MFN2 codifica per la mitofusina 2, una proteina trans-membrana localizzata sulla membrana mitocondriale esterna. Insieme al suo omologo mitofusina 1 (MFN1), MFN2 è direttamente coinvolta nel mantenimento dell'equilibrio tra la fusione e la fissione mitocondriale, giocando dunque un ruolo fondamentale nel controllo della qualità mitocondriale, nella risposta cellulare mediata da stress e nel processo di apoptosi. A tutt'oggi sono state descritte oltre 100 mutazioni in pazienti affetti da CMT2A. Lo scopo dello studio è eseguire un'analisi trasversale retrospettiva su tredici pazienti portatori di mutazioni sul gene MFN2, appartenenti a dieci famiglie indipendenti, descrivendone le caratteristiche cliniche e genetiche. I pazienti valutati presentavano un'età di insorgenza variabile (1-69 anni, media 18.5) e un ampio spettro fenotipico, con la maggior parte dei pazienti caratterizzato da un fenotipo grave. In particolare,

i pazienti aventi un'età di insorgenza <20 anni (early-onset) erano mediamente caratterizzati da un quadro fenotipico più severo rispetto ai pazienti con età di insorgenza nella fase adulta (late-onset). Interessante il fatto che tutti e tre i pazienti con fenotipo late-onset erano portatori della stessa mutazione (p.R280H). Lo studio molecolare delle famiglie ha permesso di individuare inoltre una nuova variante missenso eterozigote sull'esone 11, p.K357E. Tale mutazione localizza in una posizione altamente conservata della proteina e viene descritta come patogenica mediante l'analisi "in silico". A livello clinico, il paziente portatore della mutazione p.K357E evidenzia una grave neuropatia assonale di tipo early-onset. In conclusione, lo studio effettuato amplia lo spettro genetico della CMT2A, rivelando una mutazione ancora non riportata in letteratura e il relativo effetto clinico; inoltre, è stata eseguita una descrizione dettagliata delle caratteristiche cliniche/fenotipiche osservate in una coorte selezionata di pazienti con mutazioni sul gene MFN2. Ottenere una diagnosi genetica precisa nelle famiglie affette è fondamentale sia per la pianificazione familiare e la diagnosi prenatale, sia in una prospettiva terapeutica personalizzata per le malattie a base genetica.

Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Rizzo F, Moggio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S.

*Clinical and genetic features of a cohort of patients with MFN2-related neuropathy.*

**Sci Rep.** 2022 Apr 13;12(1):6181. doi: 10.1038/s41598-022-10220-0. PMID: 35418194 Free PMC article. IF = 4,996

#### **4.9 Sicurezza ed efficacia di una dose giornaliera di risdiplam in pazienti con atrofia spinale muscolare di tipo 2 e di tipo 3 non deambulanti (SUNFISH parte 2): uno studio di fase 3, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo**

Risdiplam è una piccola molecola a somministrazione orale approvata per il trattamento di pazienti con atrofia spinale muscolare (SMA), con l'approvazione per l'uso in pazienti con SMA tipo 2 e tipo 3 ricevuta sulla base di dati non pubblicati. Il farmaco modifica lo splicing del pre-mRNA del gene SMN2 per aumentare la produzione di una proteina SMN funzionante. Lo scopo di questo studio è quello di verificare la sicurezza e l'efficacia di risdiplam in pazienti con SMA di tipo 2 o in pazienti con SMA tipo 3 non deambulanti.

Questo è uno studio di fase 3, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo su pazienti con età 2-25 anni con diagnosi genetica confermata di SMA 5q autosomica recessiva di tipo 2 o di tipo 3 reclutati in 42 ospedali in 14 paesi tra Europa, Nord e Sud America e Asia. I pazienti eligibili erano non deambulanti, capaci di sedersi indipendentemente e con un punteggio di almeno 2 nell'item A del Revised Upper Limb Module. I pazienti sono stati stratificati per età e assegnati random (2:1) per ricevere giornalmente risdiplam per via orale con una dose di 5,00 mg (per soggetti di peso  $\geq 20$  kg) o 0,25 mg/kg (per soggetti di peso  $< 20$  kg), o per ricevere giornalmente una dose di placebo (corrispondente a risdiplam in colore e sapore). L'endpoint primario era il cambio rispetto al punteggio iniziale relativo all'item 32 del Motor Function Measure total score a 12 mesi. Il trattamento con risdiplam è risultato in un miglioramento significativo della funzionalità motoria comparato con il trattamento con placebo in pazienti con età tra 2 e 25 anni con SMA di tipo 2 o SMA di tipo 3 non deambulanti. Le nostre analisi esplorative dei sottogruppi hanno mostrato che la funzione motoria era generalmente migliorata nei soggetti più giovani e stabilizzata nei soggetti più grandi, ma questi dati richiedono conferme da altri studi. SUNFISH parte 2 è in corso e fornirà ulteriori prove sulla sicurezza e l'efficacia a lungo termine di risdiplam.

Mercuri E, Deconinck N, Mazzone ES, Nascimento A, Oskoui M, Saito K, Vuillerot C, Baranello G, Boespflug-Tanguy O, Goemans N, Kirschner J, Kostera-Pruszczyk A, Servais L, Gerber M, Gorni K, Khwaja O, Kletzl H, Scalco RS, Staunton H, Yeung WY, Martin C, Fontoura P, Day JW; SUNFISH Study Group.

*Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial.*

**Lancet Neurol.** 2022 Jan;21(1):42-52. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00367-7. PMID: 34942136 IF = 59,935

## 5) Malattie Cerebrovascolari

### 5.1 Valutazione dell'efficacia e della sicurezza del propranololo in pazienti con angiomasosi cavernosa cerebrale familiare: i risultati dello studio Treat-CCM

Questa ricerca include i risultati dello studio di fase clinica sull'uso del farmaco propranololo in pazienti con la forma familiare di angiomasosi cavernosa cerebrale (CCM). I cavernomi cerebrali sono lesioni dovute alla eccessiva proliferazione degli endoteli dei vasi sanguigni cerebrali e, nonostante siano spesso asintomatici, possono provocare sintomi neurologici acuti e potenzialmente letali o in grado di condurre a grave morbidità. Il nostro laboratorio si occupa da anni della diagnosi di questa condizione e della loro caratterizzazione molecolare mediante l'analisi dei tre geni che si associano alla forma familiare di questa condizione. Questo studio intendeva valutare l'efficacia di un farmaco comune, il propranololo, nel trattamento dei CCM dopo che evidenze sporadiche erano emerse da alcuni studi in letteratura. Lo studio clinico, finanziato da AIFA, ha visto il Policlinico come coordinatore clinico (Dr.sa Lanfranconi) e coordinatore della valutazione neuroradiologica (Dr.sa Scola). Il nostro laboratorio ha partecipato con l'analisi molecolare del più ampio gruppo di pazienti coinvolti in questo studio multicentrico. Lo studio non ha evidenziato significativi benefici sulla fase sintomatica o la prevenzione di eventi secondari nei pazienti trattati con farmaco rispetto al placebo. Miglioramenti si sono però osservati nel rallentamento della progressione della patologia. I risultati raccolti giustificano uno studio di estensione su un più ampio numero di pazienti per valutare meglio l'efficacia del farmaco nella fase sintomatica. Il farmaco si è anche dimostrato ben tollerato e con scarsi effetti collaterali che hanno richiesto la sospensione in un numero limitato di casi. Lo studio è stato pubblicato sulla prestigiosa rivista *Lancet Neurology*.

Lanfranconi S, Scola E, Meessen JMTA, Pallini R, Bertani GA, Al-Shahi Salman R, Dejana E, Latini R; Treat\_CCM Investigators.

*Safety and efficacy of propranolol for treatment of familial cerebral cavernous malformations (Treat\_CCM): a randomised, open-label, blinded-endpoint, phase 2 pilot trial.*

**Lancet Neurol.** 2023 Jan;22(1):35-44. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00409-4. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36403580 Clinical Trial. IF = 59,935

### 5.2 Nuove conoscenze sulle malattie cerebrovascolari ottenute da studi con risoluzione a singola cellula: Prospettive sulla ricerca dei meccanismi e lo sviluppo di terapie.

Questa rassegna passa in esame le ricerche degli ultimi anni sull'utilizzo delle tecniche omiche per lo studio delle malattie cerebrovascolari, la principale causa di disabilità nel mondo. In particolare, ci siamo concentrati sull'utilizzo delle tecniche di sequenziamento massivo dell'RNA applicato allo studio delle singole cellule del sangue e dei vasi sanguigni sia nei pazienti che nei modelli animali. Questa nuova tecnologia consente l'inedita analisi delle singole componenti della placca aterosclerotica ma anche del microambiente in cui si forma e delle popolazioni linfocitarie e macrofagiche che vengono reclutate nella sede della lesione. Queste conoscenze approfondiscono la conoscenza della patogenesi dei fenomeni acuti e cronici alla base delle malattie cerebrovascolari e consentono di fornire nuovi dati per la messa a punto di strategie terapeutiche innovative.

Meneri M, Bonato S, Gagliardi D, Comi GP, Corti S.

*New Insights into Cerebral Vessel Disease Landscapes at Single-Cell Resolution: Pathogenetic and Therapeutic Perspectives.*

**Biomedicines.** 2022 Jul 13;10(7):1693. doi: 10.3390/biomedicines10071693. PMID: 35884997 Free PMC article. Review. IF = 4,757

## **6) Sperimentazioni cliniche nelle patologie neuromuscolari**

La ricerca scientifica per la cura delle malattie neuromuscolari viene condotta dal gruppo afferente al Laboratorio di Biochimica e Genetica del Centro Dino Ferrari anche tramite la partecipazione a numerose sperimentazioni cliniche, con specifico indirizzo per le patologie neuromuscolari.

In particolare, nel 2022 sono proseguite le sperimentazioni cliniche già iniziate negli anni precedenti in pazienti affetti da distrofinopatie (Distrofia muscolare di Duchenne DMD), Amiotrofia Spinale (SMA), Glicogenosi di tipo II, Polineuropatia Cronica infiammatoria Demielinizzante e Miastenia gravis.

A questi si sono aggiunti uno studio di terapia genica in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne, uno studio farmacologico per pazienti affetti da Glicogenosi tipo III e uno studio di storia naturale nelle sarcoglicanopatie. Sono state inoltre poste le basi per la partecipazione ad altre sperimentazioni farmacologiche in pazienti affetti da Distrofia Muscolare dei cingoli (LGMD), in particolare nelle sarcoglicanopatie e nelle forme da deficit di Fukutin Related Protein.

Le sperimentazioni svolte nel corso del 2022 includono:

### **6.1 Sperimentazioni in pazienti affetti da distrofinopatie (Distrofia Muscolare di Becker e Duchenne)**

- PTC124-GD-025o-DMD Long term observational study of Translarna Safety and effectiveness in Usual Care
- DSC/14/2357/51 “Open label, long-term safety, tolerability, and efficacy study of GIVINOSTAT in all DMD patients who have been previously treated in one of the GIVINOSTAT studies”
- SRP-9001-301 A Phase 3 Multinational, Randomized, Double-Blind, Placebo Controlled Systemic Gene Delivery Study to Evaluate the Safety and Efficacy of SRP 9001 in Subjects With Duchenne Muscular Dystrophy”

Nel corso del 2022 è proseguita la sperimentazione con farmaco Givinostat nei pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne e la raccolta dei dati nel registro Stride per i pazienti in terapia con farmaco Ataluren.

Accanto a queste due sperimentazioni è inoltre iniziato uno studio di terapia genica in pazienti DMD deambulanti.

Per quanto riguarda la Distrofia Muscolare di Becker è proseguita l'analisi dei dati della recente sperimentazione. I risultati ad un anno di trattamento hanno evidenziato una modifica nel quadro di RMN muscolare mentre non sono state evidenziate modificazioni significative sui parametri biotecnici e sulle performance funzionali. I risultati sono in corso di pubblicazione.

#### **6.1.1 Studio Embark - Terapia genica con vettore virale adeno-associato (AAV) in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne**

Nel corso del 2022 abbiamo terminato l'iter burocratico per l'accreditamento per la terapia genica fase 1-3. Il nostro centro è stato selezionato per partecipare a uno studio di terapia genica sponsorizzato da Sarepta Therapeutics con vettore virale adeno-associato (AAV) codificante per microdistrofina in pazienti pediatrici affetti da DMD. Lo studio è uno studio placebo/controllo che prevede l'inclusione di pazienti deambulanti di età compresa tra i 5 e gli 8 anni. Il farmaco viene somministrato per via endovenosa in un'unica somministrazione, seguita da un monitoraggio settimanale dei parametri di sicurezza ed efficacia. Il protocollo sperimentale è particolarmente complesso ed ha richiesto un notevole impegno e un attento coordinamento di varie figure specialistiche.

Presso il nostro Centro nel mese di agosto abbiamo trattato 3 pazienti che attualmente stanno effettuando le valutazioni di follow-up per la valutazione dell'efficacia e di sicurezza.

È questo un passo molto importante nella ricerca di una terapia per la DMD, in quanto è il primo farmaco che agirebbe direttamente sulla causa della patologia, mirando al ripristino della distrofina, proteina mancante nei soggetti affetti.

Il nostro centro è stato inoltre selezionato anche per lo studio Envision, studio non ancora iniziato, che impiega la stessa molecola in soggetti non deambulanti.

### **6.1.2 EPYDYS: Valutazione di efficacia di Givinostat, un inibitore dell'istone deacetilasi nella Distrofia Muscolare di Duchenne**

Lo studio sperimentale internazionale a cui partecipiamo valuta l'attività della molecola Givinostat in bambini affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne. Questo farmaco è in fase di studio presso il nostro centro dal 2017. Abbiamo partecipato a un primo studio preliminare di fase II attualmente concluso e allo studio multicentrico di fase III placebo/controllo che ha incluso 110 pazienti e che si è concluso lo scorso anno. È attesa la pubblicazione dei risultati. Attualmente 6 nostri pazienti che avevano partecipato ai precedenti studi sono arruolati in uno di estensione per consentire la raccolta di dati di sicurezza ed efficacia a lungo termine. Oltre ad essere uno studio su un farmaco innovativo, è anche il primo studio clinico farmacologico, nella Distrofia Muscolare di Duchenne, che utilizza la Risonanza Magnetica Muscolare come misura di outcome.

### **6.1.3 Registro Stride**

Prosegue presso il nostro Centro la raccolta dei dati clinici per lo studio osservazionale a lungo termine (PTC124-GD-025o-DMD) in pazienti affetti da Distrofia Muscolare di Duchenne portatori di mutazioni puntiformi trattati con Ataluren. Questo farmaco è un farmaco già approvato da AIFA. La molecola è in grado di promuovere il *reading through* di mutazioni responsabili di stop codon patologici. Al momento attuale sono arruolati presso il nostro Centro 8 pazienti. L'analisi intermedia dei dati raccolti nel registro conferma l'efficacia del farmaco nel posticipare la perdita della deambulazione e la compromissione degli arti superiori e respiratoria. A inizio 2023 è prevista un'ulteriore analisi dei dati raccolti.

## **6.2 Sperimentazioni in pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale**

- BP39056 “A Two Part Seamless, Open-label, Multicenter Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of RO7034067 in Infants With Type 1 Spinal Muscular Atrophy”
- BP39055 “A Two-Part Seamless, Multi-Center Randomized, Placebo-Controlled, Doubleblind Study to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Efficacy of RO7034067 in Type 2 and 3 Spinal Muscular Atrophy Patients”
- BP39054 “An open label study to investigate the safety, tolerability, and pharmacokinetics/ Pharmacodynamics of RO7034067 in adult and pediatric patients with spinal muscular atrophy”
- A Long-term Follow-up Study of Patients in the Clinical Trials for Spinal Muscular Atrophy Receiving”. AVXS-101-LT-002. NCT04042025.

### **6.2.1 Studi Firefish, Sunfish, Jewelfish nella Atrofia Muscolare Spinale**

Presso il nostro centro seguiamo da più di 4 anni 17 pazienti arruolati in differenti sperimentazioni cliniche internazionali multicentriche con la molecola Risdiplam (Evrysdi).

Risdiplam è una molecola somministrata per via orale che agisce come modificatore di splicing del gene SMN2.

L'atrofia muscolare spinale è infatti una malattia neurodegenerativa relativamente frequente causata dalla mutazione del gene SMN1. Questo gene è responsabile della produzione della proteina di sopravvivenza dei motoneuroni (Survival Motor Neuron, SMN). Negli individui affetti da atrofia

muscolare spinale, entrambe le copie del gene *SMN1* sono delete o mutate e ciò provoca la riduzione della produzione della proteina SMN. Il gene *SMN2* differisce dal gene *SMN1* per pochi nucleotidi, tra cui un nucleotide specifico nell'esone 7 che causa un'alterazione di splicing. Di conseguenza è prodotto solo il 10% della proteina full-length e il restante 90% è un trascritto privo dell'esone 7 (*SMNΔ7*) non funzionale. Pur con qualche eccezione, la gravità della malattia correla inversamente con il numero delle copie del gene *SMN2*.

Numerosi approcci farmacologici, tra cui Risdiplam e Nusinersen, un farmaco somministrato per via intratecale, sono volti alla modulazione dello splicing di *SMN2* con l'obiettivo di determinare la produzione di una proteina full-length e funzionante.

Risdiplam, approvato in Agosto 2020 negli USA e ad aprile 2021 dall'EMA, è attualmente in commercio con indicazione al trattamento di pazienti con SMA 5q di età uguale o superiore a 2 mesi con diagnosi clinica di SMA di tipo 1, 2 o 3.

Le sperimentazioni, tuttavia sono proseguiti per consentire la raccolta dei dati di sicurezza ed efficacia a lungo termine.

Tre pazienti stanno invece assumendo presso il nostro centro il farmaco commerciale, con monitoraggio periodico delle misure di sicurezza ed efficacia.

## **6.2.2 Terapia genica con vettore virale adeno-associato (AAV) in bambini affetti da Amiotrofia Spinale**

Dal 2018 e al 2020 è stato inoltre condotta la sperimentazione clinica con terapia genica per pazienti affetti da Atrofia Muscolare Spinale di tipo I di particolare importanza per il carattere di innovazione della metodica utilizzata.

Presso il nostro Centro sono stati trattati 4 pazienti con la forma di SMA di tipo I. È attualmente in corso lo studio di estensione che prevede un follow up neurologico, cardiologico, pneumologico e funzionale per 15 anni degli stessi pazienti. Due dei pazienti arruolati presso il nostro centro hanno accettato di partecipare. Il follow-up attuale evidenzia una stabilizzazione del quadro clinico.

## **6.3 Sperimentazioni in pazienti affetti da glicogenosi**

- GSD” UX053-CL101“Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of UX053 in Patients With Glycogen Storage Disease Type III “

### **6.3.1 Studio con molecola UX053 in pazienti con Glicogenosi di tipo III.**

La glicogenosi di tipo III è un disordine del metabolismo dovuto alla mancanza o grave deficit di un enzima coinvolto nel metabolismo del glicogeno, una molecola che rappresenta una forma di deposito di zuccheri in molti tessuti. In particolare, si tratta dell'enzima che deramifica la catena del glicogeno (enzima deramificante). La sua mancanza determina un accumulo di glicogeno anormale in diversi organi, principalmente nel fegato e nel muscolo. Questo si traduce in epatomegalia, episodi di ipoglicemia, intolleranza allo sforzo e debolezza muscolare. Alcuni pazienti possono sviluppare nel tempo una cardiopatia. I sintomi si presentano con una gravità molto variabile.

Attualmente è disponibile solo una terapia sintomatica atta a controllare le crisi ipoglicemiche nei pazienti infantili. È inoltre consigliata una dieta ricca di proteine, allo scopo di mantenere stabile i valori glicemici.

UX053 è una terapia sostitutiva costituita da un mRNA che codifica per l'enzima deramificante incapsulato in una particella lipidica. Questo farmaco dovrebbe consentire il ripristino dell'enzima mancante nei soggetti affetti.

Lo studio in oggetto è uno studio di fase I, condotto per la prima volta nell'uomo, che prevede la somministrazione di dosi ascendenti di UX053 al fine di valutarne la sicurezza e definirne il dosaggio. La glicogenosi III è una malattia rara. Nel corso del 2022 abbiamo provveduto a uno screening ad ampio raggio di pazienti affetti da Glicogenosi di tipo III seguiti presso il nostro centro e altri centri di riferimento neuromuscolari italiani. Lo screening ha consentito di individuare un paziente che presentava i criteri di inclusione. Questo paziente è stato arruolato in settembre e trattato nel mese di

novembre. Il follow-up del paziente è ancora in corso. Trattandosi di uno studio di fase I si tratta di uno studio molto delicato che precede un accurato monitoraggio clinico e laboratoristico.

#### **6.4 Sperimentazioni in pazienti affetti da Polineuropatia Cronica infiammatoria Demielinizzante (CIDP)**

- Phase 2 trial to evaluate the efficacy, safety, and tolerability of efgartigimod PH20 SC in adult patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP)". ARGX-113-1802.
- Open-label Extension of the ARGX-113-1802 Trial to Investigate the Long-term Safety, Tolerability, and Efficacy of Efgartigimod PH20 SC in Patients with Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy (CIDP). ARGX-113-1902

Nel 2021 è partita presso la nostra UO una sperimentazione di fase 2, prospettica, multicentrica volta a valutare l'efficacia, la sicurezza, la tollerabilità, l'immunogenicità, la farmacocinetica e la farmacodinamica di efgartigimod (ARGX-113) associato a ialuronidasi umana ricombinante PH20 (rHuPH20) (efgartigimod PH20 SC) somministrata per via sottocutanea (SC) in pazienti affetti da polineuropatia demielinizzante infiammatoria cronica (CIDP). Lo studio è volto a valutare se il farmaco abbia una maggiore efficacia rispetto alle terapie più convenzionali, che sono spesso non completamente soddisfacenti. Gli stretti criteri di inclusione rendono difficile l'arruolamento dei pazienti.

Al momento attuale un paziente è stato arruolato nello studio ed è attualmente seguito nella fase di estensione. Il reclutamento per lo studio è ancora in corso.

#### **6.5 Sperimentazioni in pazienti affetti da Miastenia Gravis**

- MG (Viela Bio) Medpace A Randomized, Double-Blind, Multicenter, Placebo-Controlled Phase 3 Study with Open-Label Period to Evaluate the Efficacy and Safety of Inebilizumab in Adults with Myasthenia Gravis.

La miastenia grave (MG) è una rara malattia autoimmune della giunzione neuromuscolare ed è principalmente caratterizzata da una debolezza generalizzata ed esauribilità dei muscoli volontari. La terapia è una terapia immunosoppressiva, ma non sempre i pazienti rispondono in modo ottimale alle terapie convenzionali. Lo studio in oggetto si propone di testare l'efficacia e la sicurezza di Inebilizumab, un anticorpo monoclonale, in soggetti affetti da MG. A causa dei criteri di selezione molto stretti non siamo ancora stati in grado di arruolare pazienti in questo studio. Il reclutamento è ancora attivo.

#### **6.6 Sperimentazioni in pazienti affetti da Distrofia Muscolare dei Cingoli (LGMD)**

- SRP-LGMD-501-NHS - A Multi-Center, Longitudinal Study of the Natural History of Subjects with Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD) Type 2E (LGMD2E/R4), Type 2D (LGMD2D/R3), and Type 2C (LGMD2C/R5)". SRP-LGMD-501-NHS.

Le Distrofie Muscolari dei Cingoli (LGMD) sono un gruppo eterogeno di patologie caratterizzate da un progressivo sviluppo di debolezza muscolare localizzata prevalentemente al cingolo pelvico e scapolare associato a variabile interessamento cardiaco e respiratorio.

Queste forme presentano un elevata variabilità clinica e genetica. Al momento attuale sono state descritte più di 25 forme e le proteine coinvolte presentano differenti funzioni all'interno nella fibra muscolare.

Le sarcoglicanopatie sono un sottogruppo di Distrofie Muscolari dei Cingoli dovute a mutazioni in uno dei 4 geni che codificano per i sarcoglicani, proteine strutturali del sarcolemma.

Al momento attuale non esistono terapie specifiche per questo gruppo di patologie. Tuttavia, potenziali nuovi approcci terapeutici sono all'orizzonte, soprattutto nelle sarcoglicanopatie , forme per le quali, in analogia con quanto sta avvenendo per la Distrofia Muscolare di Duchenne, sono stati proposti approcci di terapia genica.

Al fine di garantire una buona riuscita delle sperimentazioni cliniche è tuttavia fondamentale conoscere la storia naturale di queste patologie e definire potenziali misure di outcome. La rarità di queste forme ha tuttavia finora reso difficile la raccolta sistematica e prospettica di tali dati.

Questo studio si propone di definire la storia naturale delle sarcoglicanopatie. Prevede la raccolta di dati clinici, funzionali, morfologici di pazienti affetti da sarcoglicanopatia per la durata di 3 anni con frequenza semestrale. Viene valutato il grado di compromissione muscolare tramite scale funzionali, il coinvolgimento cardiaco e quello respiratorio e la loro velocità di progressione nel tempo. I pazienti saranno sottoposti a RMN cardiaca, RMN muscolare e laddove possibile a biopsia muscolare.

Al momento attuale il nostro centro risulta il centro che ha reclutato il maggior numero di pazienti. Seguiamo infatti 16 pazienti che effettuano un regolare follow-up.

È auspicabile che la raccolta di questi dati possa essere funzionale alla definizione in tempi brevi di trial di terapia genica per queste forme, come finora prospettato per la forma da deficit di beta-sarcoglicano.

Nel corso del 2022 siamo stati inoltre contattati come potenziale centro partecipante per uno studio con farmaco ribitolo in pazienti affetti da Distrofia Muscolare dei cingoli da deficit di Fukutin Related Protein. Questo enzima svolge un ruolo chiave nella glicosilazione dell'alfa-sarcoglicano, e l'utilizzo di ribitolo dovrebbe agire sul meccanismo di glicosilazione migliorando il fenotipo clinico di questi pazienti.



# LABORATORIO DI NEUROIMMUNOLOGIA CLINICA

Prof. Giacomo P. Comi  
Dott.ssa Domenica Saccomanno

Neurologo  
Biologa

Laboratorio di Neuroimmunologia: Certificazione di qualità INSTAND (europeo) anno 2022 inerente la diagnostica delle neuropatie periferiche disimmuni e delle sindromi neurologiche paraneoplastiche.

## Attività diagnostica

Il Laboratorio di Neuroimmunologia si occupa del dosaggio dei principali anticorpi associati a neuropatie periferiche (NP) disimmuni quali: polineuropatia cronica infiammatoria demielinizzante (CIDP), neuropatia motoria multifocale (MMN), neuropatia sensitivo-motoria demielinizzante associata a gammopathia monoclonale IgM, sindrome di Guillain Barré (GBS), sue varianti e la sindrome di Miller Fisher (MFS). Si occupa altresì del dosaggio di anticorpi anti-neurone/cervelletto associati alle sindromi neurologiche paraneoplastiche e non, quali: Sindrome di Stiff-person, Atassia cerebellare, Encefalite limbica, Encefalomielite e la Lambert-Eaton Myasthenic Syndrom (LEMS) mediante tecniche di immunofluorescenza indiretta (IIF) ed Immunoblot (IB). Presso il nostro laboratorio è possibile eseguire la ricerca dei seguenti anticorpi: anti- HuD, Yo, Ri, CV2, Amfifisina, Ma1, Ma2, SOX1, Tr, Zic4 e GAD65. Anticorpi anti-MAG ed anticorpi anti-gangliosidi.

## Attività di ricerca

### Dosaggio degli anticorpi anti-GAD65 nella Stiff-Person-Syndrome (SPS)

La SPS è una rara patologia del sistema nervoso centrale caratterizzata da rigidità muscolare, spasmi dolorosi ed alti titoli di anticorpi contro l'enzima decarbossilasi dell'acido glutammico (GAD). In particolare, quella associata agli anticorpi anti-GAD è una sindrome neurologica nella maggior parte dei casi non paraneoplastica. Anticorpi diretti contro la GAD sono riscontrabili anche in pazienti affetti da Diabete di tipo 1 (IDDM), ma vi sono differenze di reattività con l'enzima tra gli anticorpi presenti nel siero di questi pazienti e quelli dei pazienti con SPS, verosimilmente dovute al riconoscimento di diversi epitopi dell'antigene GAD65 che suggeriscono meccanismi autoimmunitari diversi delle due patologie.

Esistono in commercio metodiche quantitative specifiche per il dosaggio degli anticorpi in pazienti affetti da IDDM, quali il ChemiLuminescent ImmunoAssay (CLIA) e la Emzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). In entrambe le metodiche la curva standard è costruita utilizzando come calibratori, i campioni dei pazienti affetti da IDDM ed anche questo, potrebbe spiegare la discordanza riscontrata negli ultimi anni con le metodiche qualitative in uso nel nostro laboratorio e specifiche per le sindromi neurologiche; Immunofluorescenza Indiretta (IIF) su cervelletto di scimmia ed Immunoblot (IB) con la proteina ricombinante GAD65, sempre allineate alla RadioImmunoAssay (RIA), la metodica quantitativa utilizzata in passato per il dosaggio degli anticorpi anti-GAD.

La disponibilità di una metodica quantitativa specifica per la SPS permetterebbe di dosare gli anticorpi anti-GAD alla diagnosi di SPS e di monitorare la risposta del paziente alla terapia. A tale scopo è stata adattata una metodica ELISA in commercio per il dosaggio degli autoanticorpi diretti contro l'isoforma 65 della glutammato decarbossilasi (Euroimmun, Germany). Tutti i campioni di siero della nostra piccola corte di pazienti affetti da SPS (9), afferenti alla Neurologia della nostra Fondazione dal 2012 al 2021 e risultati positivi alle metodiche qualitative sono stati testati con la metodica ELISA utilizzando per la costruzione della curva standard solo i calibratori in dotazione con valori più alti. E' stato necessario effettuare diverse diluizioni del siero, fino ad una diluizione massima di 1:10.000 per alcuni campioni, riscontrando una positività agli anticorpi anti-GAD65 ad altissimo titolo, a conferma dei dati di letteratura. La lettura della piastra ad una lunghezza d'onda di 405nm ha permesso di discriminare valori più alti dei calibratori.

Per determinare la riproducibilità della metodica ELISA sono stati eseguiti intra-test assay e inter-test assay ottenendo un coefficiente di variazione (CV) rispettivamente < 9% e < 10%.

## Elenco delle Pubblicazioni Scientifiche

Coratti G, Ricci M, Capasso A, D'amico A, Sansone V, Bruno C, Messina S, Ricci F, Mongini T, Coccia M, Siciliano G, Pegoraro E, Turri M, Filosto M, Comi G, Masson R, Maggi L, Bruno I, D'Angelo MG, Trabacca A, Vacchiano V, Donati M, Simone I, Ruggiero L, Varone A, Verriello L, Berardinelli A, Agosto C, Pini A, Maioli MA, Passamano L, Brighina F, Carboni N, Garibaldi M, Zuccarino R, Gagliardi D, Siliquini S, Previtali S, Taruscio D, Boccia S, Pera MC, Pane M, Mercuri E; ITASMAC working group.

*Prevalence of Spinal Muscular Atrophy in the Era of Disease-Modifying Therapies: An Italian Nationwide Survey.*

**Neurology.** 2022 Dec 2:10.1212/WNL.00000000000201654.

doi: 10.1212/WNL.00000000000201654. Epub ahead of print. PMID: 36460469. [IF = 12,258]

Lanfranconi S, Scola E, Meessen JMTA, Pallini R, Bertani GA, Al-Shahi Salman R, Dejana E, Latini R; Treat\_CCM Investigators.

*Safety and efficacy of propranolol for treatment of familial cerebral cavernous malformations (Treat\_CCM): a randomised, open-label, blinded-endpoint, phase 2 pilot trial.*

**Lancet Neurol.** 2023 Jan;22(1):35-44. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00409-4. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36403580. [IF = 59,935]

Manini A, Gagliardi D, Meneri M, Antognozzi S, Del Bo R, Scaglione C, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Analysis of HTT CAG repeat expansion in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022 Nov;9(11):1820-1825. doi: 10.1002/acn3.51673. Epub 2022 Oct 25. PMID: 36285345; PMCID: PMC9639631. [IF = 4,511]

Yahya V, Spagnolo F, Di Maggio G, Leopizzi E, De Marco P, Fortunato F, Comi GP, Rini A, Monfrini E, Di Fonzo A.

*Juvenile-onset dystonia with spasticity in Leigh syndrome caused by a novel NDUFA10 variant.*

**Parkinsonism Relat Disord.** 2022 Nov;104:85-87. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.10.016. Epub 2022 Oct 14. PMID: 36270260. [IF = 5,081]

Masson R, Mazurkiewicz-Beldzińska M, Rose K, Servais L, Xiong H, Zanoteli E, Baranello G, Bruno C, Day JW, Deconinck N, Klein A, Mercuri E, Vlodavets D, Wang Y, Dodman A, El-Khairi M, Gorni K, Jaber B, Kletzl H, Gaki E, Fontoura P, Darras BT; FIREFISH Study Group.

*Safety and efficacy of risdiplam in patients with type 1 spinal muscular atrophy (FIREFISH part 2): secondary analyses from an open-label trial.*

**Lancet Neurol.** 2022 Dec;21(12):1110-1119. doi:10.1016/S1474-4422(22)00339-8. Epub 2022 Oct 14. PMID: 36244364. [IF = 59,935]

Maggi L, Bello L, Bonanno S, Govoni A, Caponnetto C, Passamano L, Grandis M, Trojsi F, Cerri F, Gardani A, Ferraro M, Gadaleta G, Zangaro V, Caumo L, Maioli M, Tanel R, Saccani E, Meneri M, Vacchiano V, Ricci G, Sorarù G, D'Errico E, Bortolani S, Pavesi G, Gellera C, Zanin R, Corti S, Silvestrini M, Politano L, Schenone A, Previtali SC, Berardinelli A, Turri M, Verriello L, Coccia M, Mantegazza R, Liguori R, Filosto M, Marrosu G, Tiziano FD, Siciliano G, Simone IL, Mongini T, Comi G, Pegoraro E.

*Adults with spinal muscular atrophy: a large-scale natural history study shows gender effect on disease.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2022 Dec;93(12):1253-1261. doi: 10.1136/jnnp-2022-329320. Epub 2022 Oct 11. PMID: 36220341. [IF = 13,654]

Magri F, Antognozzi S, Rapolone M, Zanotti S, Napoli L, Ciscato P, Velardo D, Scuvera G, Nicotra V, Giacobbe A, Milani D, Fortunato F, Garbellini M, Sciacco M, Corti S, Comi GP, Ronchi D. *Megaconial congenital muscular dystrophy due to novel CHKB variants: a case report and literature review.*

**Skelet Muscle.** 2022 Sep 29;12(1):23. doi: 10.1186/s13395-022-00306-8. PMID: 36175989; PMCID: PMC9524117. [IF = 4,912]

Pagliarani S, Meola G, Filareti M, Comi GP, Lucchiari S.

*Case report: Sodium and chloride muscle channelopathy coexistence: A complicated phenotype and a challenging diagnosis.*

**Front Neurol.** 2022 Aug 23;13:845383. doi: 10.3389/fneur.2022.845383. PMID: 36081873; PMCID: PMC9447429. [IF = 4,086]

Magri F, Zanotti S, Salani S, Fortunato F, Ciscato P, Gerevini S, Maggi L, Sciacco M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D.

*Antisense Morpholino-Based In Vitro Correction of a Pseudoexon-Generating Variant in the SGCB Gene.*

**Int J Mol Sci.** 2022 Aug 29;23(17):9817. doi:10.3390/ijms23179817. PMID: 36077211; PMCID: PMC9456520. [IF = 6,009]

Zanotti S, Magri F, Poggetti F, Rapolone M, Velardo D, Fortunato F, Ciscato P, Moggio M, Corti S, Comi GP, Sciacco M.

*Immunofluorescence signal intensity measurements as a semi-quantitative tool to assess sarcoglycan complex expression in muscle biopsy.*

**Eur J Histochem.** 2022 Sep 1;66(3):3418. doi: 10.4081/ejh.2022.3418. PMID: 36047345; PMCID: PMC9471914. [IF = 1,772]

Riboldi GM, Vialle RA, Navarro E, Udine E, de Paiva Lopes K, Humphrey J, Allan A, Parks M, Henderson B, Astudillo K, Argyrou C, Zhuang M, Sikder T, Oriol Narcis J, Kumar SD, Janssen W, Sowa A, Comi GP, Di Fonzo A, Crary JF, Frucht SJ, Raj T.

*Transcriptome deregulation of peripheral monocytes and whole blood in GBA-related Parkinson's disease.*

**Mol Neurodegener.** 2022 Aug 17;17(1):52. doi: 10.1186/s13024-022-00554-8. PMID: 35978378; PMCID: PMC9386994. [IF = 18,879]

Cances C, Vlodavets D, Comi GP, Masson R, Mazurkiewicz-Bełdzińska M, Saito K, Zanoteli E, Dodman A, El-Khairi M, Gorni K, Gravestock I, Hoffart J, Scalco RS, Darras BT; ANCHOVY Working Group.

*Natural history of Type 1 spinal muscular atrophy: a retrospective, global, multicenter study.*

**Orphanet J Rare Dis.** 2022 Jul 29;17(1):300. doi: 10.1186/s13023-022-02455-x. PMID: 35906608; PMCID: PMC9336055. [IF = 4,123]

Coratti G, Lenkowicz J, Norcia G, Lucibello S, Ferraroli E, d'Amico A, Bello L, Pegoraro E, Messina S, Ricci F, Mongini T, Berardinelli A, Masson R, Previtali SC, D'angelo G, Magri F, Comi GP, Politano L, Passamano L, Vita G, Sansone VA, Albamonte E, Panicucci C, Bruno C, Pini A, Bertini E, Patarnello S, Pane M, Mercuri E; Italian DMD study group.

*Age, corticosteroid treatment and site of mutations affect motor functional changes in young boys with Duchenne Muscular Dystrophy.*

**PLoS One.** 2022 Jul 29;17(7):e0271681. doi:10.1371/journal.pone.0271681. PMID: 35905042; PMCID: PMC9337636. [IF = 3,752]

Velardo D, D'Angelo MG, Citterio A, Panzeri E, Napoli L, Cinnante C, Moggio M, Comi GP, Ronchi D, Bassi MT.

*Case Reports: Novel Missense Variants in the Filamin C Actin Binding Domain Cause Variable Phenotypes.*

**Front Neurol.** 2022 Jul 12;13:930039. doi: 10.3389/fneur.2022.930039. PMID: 35903116; PMCID: PMC9315448. [IF = 4,086]

Meneri M, Bonato S, Gagliardi D, Comi GP, Corti S.

*New Insights into Cerebral Vessel Disease Landscapes at Single-Cell Resolution: Pathogenetic and Therapeutic Perspectives.*

**Biomedicines.** 2022 Jul 13;10(7):1693. doi: 10.3390/biomedicines10071693. PMID: 35884997; PMCID: PMC9313091. [IF = 4,757]

Gagliardi D, Rizzuti M, Brusa R, Ripolone M, Zanotti S, Minuti E, Parente V, Dioni L, Cazzaniga S, Bettica P, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Magri F, Velardo D.

*MicroRNAs as serum biomarkers in Becker muscular dystrophy.*

**J Cell Mol Med.** 2022 Sep;26(17):4678-4685. doi: 10.1111/jcmm.17462. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35880500; PMCID: PMC9443944. [IF = 5,31]

Manini A, Velardo D, Ciscato P, Cinnante C, Moggio M, Comi G, Corti S, Ronchi D.

*Expanding the Phenotypic Spectrum of Vocal Cord and Pharyngeal Weakness With Distal Myopathy due to the p.S85C MATR3 Mutation.*

**Neurol Genet.** 2022 Jul 6;8(4):e200006. doi: 10.1212/NXG.0000000000200006. PMID: 35812165; PMCID: PMC9258980. [IF = 3,663]

Percetti M, Franco G, Monfrini E, Caporali L, Minardi R, La Morgia C, Valentino ML, Liguori R, Palmieri I, Ottaviani D, Vizziello M, Ronchi D, Di Bernardino F, Cocco A, Macao B, Falkenberg M, Comi GP, Albanese A, Giometto B, Valente EM, Carelli V, Di Fonzo A.

*TWNK in Parkinson's Disease: A Movement Disorder and Mitochondrial Disease Center Perspective Study.*

**Mov Disord.** 2022 Sep;37(9):1938-1943. doi: 10.1002/mds.29139. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35792653; PMCID: PMC9544864. [IF = 9,698]

Lazzeri G, Franco G, Difonzo T, Carandina A, Gramigna C, Vergari M, Arienti F, Naci A, Scatà C, Monfrini E, Dias Rodrigues G, Montano N, Comi GP, Saetti MC, Tobaldini E, Di Fonzo A.

*Cognitive and Autonomic Dysfunction in Multiple System Atrophy Type P and C: A Comparative Study.*

**Front Neurol.** 2022 Jun 16;13:912820. doi: 10.3389/fneur.2022.912820. PMID: 35785342; PMCID: PMC9243310. [IF = 4,086]

Fumagalli M, Ronchi D, Bedeschi MF, Manini A, Cristofori G, Mosca F, Dilena R, Sciacco M, Zanotti S, Piga D, Ardissono G, Triulzi F, Corti S, Comi GP, Salviati L.

*A novel RRM2B mutation associated with mitochondrial DNA depletion syndrome.*

**Mol Genet Metab Rep.** 2022 Jun 18;32:100887. doi: 10.1016/j.ymgmr.2022.100887. PMID: 35756861; PMCID: PMC9218228. [IF = 1,949]

Abati E, Manini A, Comi GP, Corti S.

*Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases.*

**Cell Mol Life Sci.** 2022 Jun 21;79(7):374. doi: 10.1007/s00018-022-04408-w. PMID: 35727341; PMCID: PMC9213329. [IF = 9,261]

Manini A, Caporali L, Meneri M, Zanotti S, Piga D, Arena IG, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Carelli V, Ronchi D.

**Case Report: Rare Homozygous *RNASEH1* Mutations Associated With Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy and Multiple Mitochondrial DNA Deletions.**

Front Genet. 2022 May 31;13:906667. doi: 10.3389/fgene.2022.906667. PMID: 35711919; PMCID: PMC9194440. [IF = 4,772]

Olivero M, Gagliardi D, Costamagna G, Velardo D, Magri F, Triulzi F, Conte G, Comi GP, Corti S, Meneri M.

*Newly Diagnosed Hepatic Encephalopathy Presenting as Non-convulsive Status Epilepticus: A Case Report and Literature Review.*

**Front Neurol.** 2022 May 12;13:880068. doi: 10.3389/fneur.2022.880068. PMID: 35645984; PMCID: PMC9133409. [IF = 4,086]

Sabbatini D, Fusto A, Vianello S, Villa M, Janik J, D'Angelo G, Diella E, Magri F, Comi GP, Panicucci C, Bruno C, D'Amico A, Bertini E, Astrea G, Battini R, Politano L, Masson R, Baranello G, Previtali SC, Messina S, Vita G, Berardinelli A, Mongini T, Pini A, Pane M, Mercuri E, Hoffman EP, Morgenroth L, Gordish-Dressman H, Duong T, McDonald CM, Bello L, Pegoraro E.

*Genetic modifiers of upper limb function in Duchenne muscular dystrophy.*

**J Neurol.** 2022 Sep;269(9):4884-4894. doi: 10.1007/s00415-022-11133-8. Epub 2022 May 5. PMID: 35513612; PMCID: PMC9363325. [IF = 6,682]

Fusto A, Cassandrini D, Fiorillo C, Codemo V, Astrea G, D'Amico A, Maggi L, Magri F, Pane M, Tasca G, Sabbatini D, Bello L, Battini R, Bernasconi P, Fattori F, Bertini ES, Comi G, Messina S, Mongini T, Moroni I, Panicucci C, Berardinelli A, Donati A, Nigro V, Pini A, Giannotta M, Dosi C, Ricci E, Mercuri E, Minervini G, Tosatto S, Santorelli F, Bruno C, Pegoraro E.

*Expanding the clinical-pathological and genetic spectrum of RYR1-related congenital myopathies with cores and minicores: an Italian population study.*

**Acta Neuropathol Commun.** 2022 Apr 15;10(1):54. doi: 10.1186/s40478-022-01357-0. PMID: 35428369; PMCID: PMC9013059. [IF = 6,43]

Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Rizzo F, Moggio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S.

*Clinical and genetic features of a cohort of patients with MFN2-related neuropathy.*

**Sci Rep.** 2022 Apr 13;12(1):6181. doi: 10.1038/s41598-022-10220-0. PMID: 35418194; PMCID: PMC9008012. [IF = 4,996]

Ripolone M, Velardo D, Mondello S, Zanotti S, Magri F, Minuti E, Cazzaniga S, Fortunato F, Ciscato P, Tiberio F, Sciacco M, Moggio M, Bettica P, Comi GP.

*Muscle histological changes in a large cohort of patients affected with Becker muscular dystrophy.*

**Acta Neuropathol Commun.** 2022 Apr 8;10(1):48. doi: 10.1186/s40478-022-01354-3. PMID: 35395784; PMCID: PMC8994373. [IF = 6,43]

Gagliardi D, Pagliari E, Meneri M, Melzi V, Rizzo F, Comi GP, Corti S, Taiana M, Nizzardo M. *Stathmins and Motor Neuron Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Targets.*

**Biomedicines.** 2022 Mar 19;10(3):711. doi: 10.3390/biomedicines10030711. PMID: 35327513; PMCID: PMC8945549. [IF = 4,757]

Nasca A, Legati A, Meneri M, Ermert ME, Frascarelli C, Zanetti N, Garbellini M, Comi GP, Catania A, Lamperti C, Ronchi D, Ghezzi D. Biallelic

*Variants in ENDOG Associated with Mitochondrial Myopathy and Multiple mtDNA Deletions.*

**Cells.** 2022 Mar 12;11(6):974. doi: 10.3390/cells11060974. PMID: 35326425; PMCID: PMC8946636. [IF = 7,666]

Rizzuti M, Melzi V, Gagliardi D, Resnati D, Meneri M, Dioni L, Masrori P, Hersmus N, Poesen K, Locatelli M, Biella F, Silipigni R, Bollati V, Bresolin N, Comi GP, Van Damme P, Nizzardo M, Corti S.

*Insights into the identification of a molecular signature for amyotrophic lateral sclerosis exploiting integrated microRNA profiling of iPSC-derived motor neurons and exosomes.*

**Cell Mol Life Sci.** 2022 Mar 14;79(3):189. doi: 10.1007/s00018-022-04217-1. PMID: 35286466; PMCID: PMC8921154. [IF = 9,261]

Manini A, Meneri M, Rodolico C, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Ronchi D.

*Case Report: Thymidine Kinase 2 (TK2) Deficiency: A Novel Mutation Associated With Childhood-Onset Mitochondrial Myopathy and Atypical Progression.*

**Front Neurol.** 2022 Feb 25;13:857279. doi: 10.3389/fneur.2022.857279. PMID: 35280287; PMCID: PMC8914305. [IF = 4,086]

Contardo M, De Gioia R, Gagliardi D, Comi GP, Ottoboni L, Nizzardo M, Corti S.

*Targeting PTB for Glia-to-Neuron Reprogramming In Vitro and In Vivo for Therapeutic Development in Neurological Diseases.*

**Biomedicines.** 2022 Feb 7;10(2):399. doi: 10.3390/biomedicines10020399. PMID: 35203608; PMCID: PMC8962309. [IF = 4,757]

Manini A, Abati E, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Mitochondrial DNA homeostasis impairment and dopaminergic dysfunction: A trembling balance.*

**Ageing Res Rev.** 2022 Apr;76:101578. doi: 10.1016/j.arr.2022.101578. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35114397. [IF = 10,895]

Manini A, Abati E, Nuredini A, Corti S, Comi GP.

*Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence.*

**Front Neurol.** 2022 Jan 5;12:814174. doi:10.3389/fneur.2021.814174. PMID: 35095747; PMCID: PMC8797140. [IF = 4,086]

Taiana M, Govoni A, Salani S, Kleinschmidt N, Galli N, Saladini M, Ghezzi SB, Melzi V, Bersani M, Del Bo R, Muehlemann O, Bertini E, Sansone V, Albamonte E, Messina S, Mari F, Cesaroni E, Porfiri L, Tiziano FD, Vita GL, Sframeli M, Bonanno C, Bresolin N, Comi G, Corti S, Nizzardo M. *Molecular analysis of SMARD1 patient-derived cells demonstrates that nonsense-mediated mRNA decay is impaired.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2022 Aug;93(8):908-910. doi:10.1136/jnnp-2021-326425. Epub 2022 Jan 27. PMID: 35086940; PMCID: PMC9304090. [IF = 13,654]

Mercuri E, Deconinck N, Mazzone ES, Nascimento A, Oskoui M, Saito K, Vuillerot C, Baranello G, Boespflug-Tanguy O, Goemans N, Kirschner J, Kostera-Pruszczyk A, Servais L, Gerber M, Gorni K, Khwaja O, Kletzl H, Scalco RS, Staunton H, Yeung WY, Martin C, Fontoura P, Day JW; SUNFISH Study Group.

*Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy (SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo-controlled trial.*

**Lancet Neurol.** 2022 Jan;21(1):42-52. [IF = 59,935]

Comi GP, Niks EH, Cinnante CM, Kan HE, Vandeborne K, Willcocks RJ, Velardo D, Ripolone M, van Benthem JJ, van de Velde NM, Nava S, Ambrosoli L, Cazzaniga S, Bettica PU.

*Characterization of patients with Becker muscular dystrophy by histology, magnetic resonance imaging, function, and strength assessments.*

**Muscle Nerve.** 2022 Mar;65(3):326-333. doi: 10.1002/mus.27475. Epub 2021 Dec 30. PMID: 34918368; PMCID: PMC9302983. [IF = 3,852]

Monfrini E, Spagnolo F, Canesi M, Seresini A, Rini A, Passarella B, Percetti M, Seia M, Goldwurm S, Cereda V, Comi GP, Pezzoli G, Di Fonzo A.

*VPS13C-associated Parkinson's disease: Two novel cases and review of the literature.*

**Parkinsonism Relat Disord.** 2022 Jan;94:37-39. doi:10.1016/j.parkreldis.2021.11.031. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34875562. [IF = 5,081]

Longo M, Meroni M, Paolini E, Erconi V, Carli F, Fortunato F, Ronchi D, Piciotti R, Sabatini S, Macchi C, Alisi A, Miele L, Soardo G, Comi GP, Valenti L, Ruscica M, Fracanzani AL, Gastaldelli A, Dongiovanni P.

*TM6SF2/PNPLA3/MBOAT7 Loss-of-Function Genetic Variants Impact on NAFLD Development and Progression Both in Patients and in In Vitro Models.*

**Cell Mol Gastroenterol Hepatol.** 2022;13(3):759-788. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.11.007. Epub 2021 Nov 23. PMID: 34823063; PMCID: PMC8783129. [IF = 9,225]

Bersani M, Rizzuti M, Pagliari E, Garbellini M, Saccomanno D, Moulton HM, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

*Cell-penetrating peptide-conjugated Morpholino rescues SMA in a symptomatic preclinical model.* Mol Ther. 2022 Mar 2;30(3):1288-1299. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.11.012. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34808387; PMCID: PMC8899506. [IF = 10,183]

Messina S, Sframeli M, Maggi L, D'Amico A, Bruno C, Comi G, Mercuri E.

*Spinal muscular atrophy: state of the art and new therapeutic strategies.*

**Neurol Sci.** 2022 Dec;43(Suppl 2):615-624. doi: 10.1007/s10072-021-05258-3. Epub 2021 Apr 19. PMID: 33871750. [IF = 3,495]

### **Abstract presentati a congressi scientifici nazionali e internazionali**

Ronchi D., Garbellini M., Magri F., Meneri M., Menni F., Bedeschi M.F., Dilena R., Cecchetti V., Piccioli I., Furlan F., Polimeni V., Salani S., Fortunato F., Rapolone M., Zanotti S., Napoli L., Ciscato P., Sciacco M., Iascone M., Corti S., Comi G.P.

*Mutations in COX18 cause isolated complex IV deficiency associated with neonatal hypertrophic cardiomyopathy and hypotonia.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Magri F., Antognozzi S., Zanotti S., Ciscato P., Fortunato F., Corti S., Comi G.P., Ronchi D.

*Milan. Mutations in Popeye domain containing (POPDC) gene family associated to neuromuscular disorders.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Magri F.; Zanotti S.; Salani S.; Ronchi D.; Fortunato F.; Ciscato P.; Napoli L.; Velardo D.; D'Angelo M. G.; Gualandi F.; Nigro V.; Comi G. P.; Piga D.

*Evidence of extracellular matrix disorganization due to novel variants discovered in COL6 related myopathy patients.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Velardo D, Magri F., Kan H., Vandeborne K., Willcocks R., Cinnante C., Rapolone M., Van Benthem J., Van de Velde N., Nava S., Ambrosoli L., Cazzaniga S., Niks E., Bettica P., Comi G.P. *Givinostat in ambulant patients with Becker muscular dystrophy: A phase 2, double-blind, randomized, placebo-controlled study.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Sabbatini D., Penzo M., Vianello S., Fusto A., Berardinelli A., Parravicini S., Bruno C., Panicucci C., Comi G.P., Magri F., D'Amico A., Catteruccia M., Travaglioni L., D'Angelo G., Sansone V., Di Bari A., Mongini T., Brusa C., Maggi L., Canioni E., Gallone A., Pane M., Leone D., Politano L., Picillo E., Nigro V., Messina S., Vita G., Sorarù G., Bello L., Pegoraro E.

*Genome-Wide Association Study for identification and characterization of genetic modifiers of Duchenne muscular dystrophy.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Cassandrini D., Rubegni A., Astrea G., Bacci C., Bruno C., Fiorillo C., Galatolo D., Lopergolo D., Magri F., Maioli M.A., Malandrini A., Matà S., Orsucci D., Ponzalino V., Piga D., Sebastiano B., Tonin P., Traverso M., Vattemi G., Santorelli F.M.

*SCN4A mutations: new variants and different phenotypes.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Mancuso M., Montano V., Lopriore P., Gruosso F., Carelli V., Comi G.P., Filosto M., Lamperti C., Mongini T., Musumeci O., Servidei S., Tonin P., Toscano A., Primiano G., Valentino M.L., Bortolani S., Marchet S., G. Ricci, Modenese A., Cotti Piccinelli S., Risi B., Meneri M., Arena I.G., Siciliano G.

*Primary mitochondrial myopathy: 12-month follow-up results of an Italian cohort.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Abati E., Bono S., Ruepp M.D., Salani S., Ottoboni L., Melzi V., Cordigliero C., Pagliarani S., De Gioia R., Anastasia A., Taiana M., Garbellini M., Lodato S., Kunderfranco P., Cazzato D., Cartelli D., Lonati C., Bresolin N., Comi G., Nizzardo M., Corti S., Rizzo F.

*Combined RNA interference and gene replacement therapy targeting MFN2 for the treatment of Charcot-Marie-Tooth type 2A.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

Vicino A., Bello L., Bonanno S., Govoni A., Caponnetto C., Grandis M., Cerri F., Ferraro M., Bozzoni V., Caumo L., Meneri M., Vacchiano V., Ricci G., Soraru' G., D'Errico E., Tramacere I., Bortolani S., Zanin R., Silvestrini M., Schenone A., Previtali S.C., Berardinelli A., Turri M., Coccia M., Mantegazza R., Liguori R., Filosto M., Marrosu G., Siciliano G., Simone I.L., Mongini T., Comi G., Pegoraro E., Maggi L.

*Respiratory function in adult spinal muscular atrophy patients: a cross-sectional study.*

XXII Congresso della Associazione Italiana di Miologia 19-22 Ottobre 2022 Matera.

D. Ronchi, L. Caporali, M. Meneri, M. Valentino, L. Bello, G. Primiano, G. Vattemi, D. Ghezzi, M. Mancuso, E. Pegoraro, S. Servidei, A. Malandrini, P. Tonin, M. Sciacco, C. Lamperti, V. Carelli, G. Comi.

*Clinicopathologic and molecular spectrum of MGME1-related mitochondrial disease in a cohort of adult patients from the italian network.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

M. Percetti, G. Franco , E. Monfrini , L. Caporali , R. Minardi , C. Lamorgia, M. Valentino, R. Liguori, I. Palmieri, D. Ottaviani, M. Vizziello, D. Ronchi, D. Di Bernardino, A. Cocco, B. Macao, M. Falkenberg, G. Comi, A. Albanese, B. Giometto, E. Valente, V. Carelli, A. Di Fonzo.

*TWNK in Parkinson's Disease: a movement disorder and mitochondrial disease center perspective study.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

D. Gagliardi, A. Manini, M. Meneri, S. Antognozzi, R. Del Bo, G. Comi, S. Corti, D. Ronchi.

*Analysis of HTT CAG and NOTCH2NLC GCC repeat expansions in italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

V. Yahya, F. Spagnolo, E. Monfrini, G. Di Maggio, E. Leopizzi, P. De Marco, F. Fortunato, G. Comi, A. Rini, A. Di Fonzo. Late-onset Leigh syndrome with dystonic-spastic tetraparesis caused by a novel NDUFA10 variant: a case report. 52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

S. Scarcella, G. Conte, D. Gagliardi, D. Velardo, F. Magri, E. Mauri, G. Costamagna, G. Comi, S. Corti, M. Meneri

*Neurosarcoidosis presenting as isolated myelitis.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

G. Lazzeri, G. Franco, A. Carandina, C. Gramegna, F. Arienti, M. Vergari, A. Naci, E. Monfrini, N. Montano, G. Comi, M. Saetti, E. Tobaldini, A. Di Fonzo.

*Cognitive and autonomic dysfunction in Multiple System Atrophy.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

V. Montano, P. Lopriore, G. Ricci, V. Carelli, G. Comi, M. Filosto, C. Lamperti, T. Mongini, O. Musumeci, S. Servidei, A. Toscano, A. Modenese, G. Primiano, M. Valentino, S. Bortolani, S. Marchet, M. Meneri, I. Arena, G. Siciliano, R. Barbara, P. Tonin, S. Cotti Piccinelli, F. Gruosso, M. Valentino, M. Mancuso

*Primary Mitochondrial Myopathy: 12-month follow-up results of an italian cohort.*

52° Congresso della Società Italiana di Neurologia, Milano, 3-6 Dicembre 2022.

### **Collaborazioni scientifiche in atto con istituti nazionali ed internazionali**

- Prof. Valerio Carelli, Università di Bologna
- Prof. Daniele Ghezzi, Istituto Neurologico Carlo Besta Milano
- Dott. Lorenzo Maggi, Istituto Neurologico Carlo Besta Milano
- Prof. Enrico Silvio Bertini, Ospedale Pediatrico Bambin Gesù
- Prof. Antonio Toscano, Università di Messina
- Prof. Michelangelo Mancuso, Università di Pisa
- Prof. Gabriele Siciliano, Università di Pisa
- Prof. Carlo Minetti, Università di Genova
- Prof. Paola Tonin, Università di Verona
- Prof. Serenella Servidei, Università Cattolica del Sacro Cuore
- Prof. Eugenio Mercuri, Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS
- Prof. Carsten G. Bönnemann, NIH, Bethesda, USA
- Prof. Michio Hirano, Columbia University, New York, USA
- Prof. Connie Bezzina, Amsterdam UMC, Amsterdam, Olanda

### **Finanziamenti per progetti di ricerca ottenuti da enti pubblici o private**

SEQMD (“Combining whole exome and RNA sequencing to identify genetic and molecular pathways in muscular disorders and to characterize patient cohorts for gene therapy”), programma di ricerca finanziato mediante il bando piattaforme “Call NGS Platform 2020” promosso dall’IRCCS Fondazione Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico.

Progetto “National Center for Gene Therapy and Drugs based on RNA Technology”, codice identificativo MUR CN00000041 nell’ambito del PNRR Missione 4, Componente 2, Investimento 1.4 “Potenziamento strutture di ricerca e creazione di "campioni nazionali di R&S" su alcune Key Enabling Technologies”. Topic: mRNA Therapeutics for the Treatment of Mitochondrial Hepato-Encephalopathies.



## **U.O.S.D. MALATTIE NEUROMUSCOLARI e RARE**

### **RESPONSABILE**

Prof. Giacomo Pietro Comi

### **MEDICI**

Dott. Monica Sciacco  
Dott. Daniele Velardo  
Dott. Maurizio Moggio (Consulente)

### **BIOLOGI**

Dott. Gigliola Fagiolari (Consulente)  
Dott. Laura Napoli  
Dott. Simona Zanotti  
Dott. Michela Rapolone

### **TECNICI**

Sig.ra. Patrizia Ciscato

### **AMMINISTRATIVI**

Dott. Alessandra Pedrazzini

La UOD Neurologia-Malattie Neuromuscolari e Rare, all'interno della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, collabora con il "Centro Dino Ferrari" dell'Università degli Studi di Milano, nell'ambito di condivise attività assistenziali e di ricerca.

L'Unità Operativa è costituita da:

1. Ambulatori e Day Hospital per pazienti affetti da malattie rare neuromuscolari
2. Laboratori di diagnostica morfologica (microscopia ottica ed elettronica)
3. Banca di tessuto muscolare, nervo periferico, DNA e colture cellulari

L'attività della UO è finalizzata alla diagnosi, all'assistenza ed allo studio di pazienti affetti da malattie rare neuromuscolari.

Queste malattie sono, fra quelle rare, le più frequenti in assoluto e sono quasi sempre malattie geneticamente determinate. Tra le malattie seguite nel nostro centro vi sono: le Distrofinopatie (Distrofia Muscolare di Duchenne e Becker, DMD e BMD), le Distrofie Muscolari dei cingoli (Limb Girdle Muscular Dystrophy, LGMD), le Miopatie Congenite (CM), le miopatie metaboliche con alterazione del metabolismo glucidico (es. Glicogenosi), lipidico e del metabolismo ossidativo (es. Malattie Mitocondriali), le malattie neurodegenerative del motoneurone ad esordio infantile (Amiotrofia Spinale SMA5q) ed adulto (Sclerosi Laterale Amiotrofica).

Il nostro Centro, uno dei pochissimi in Italia specializzato nell'assistenza di questi pazienti, ha la peculiarità di assisterli sia sotto il profilo ambulatoriale e di Day Hospital sia sotto quello diagnostico di laboratorio mediante analisi bioptiche muscolari e di nervo periferico.

Il Centro riceve numerosi pazienti e biopsie anche da altri ospedali siti in tutto il territorio nazionale. L'Unità è certificata ISO 9001 dall'agosto 2002 da parte di DNV e dal luglio 2005 da parte di BVQI per: "Progettazione ed erogazione di servizi di diagnostica morfologica e ricerca nell'ambito di malattie rare neuromuscolari, in regime di degenza, ambulatoriale e in convenzione per enti terzi. Gestione di una Banca di tessuto muscolare, nervo periferico e DNA".

### **Attività del Laboratorio per la diagnosi e lo studio delle Malattie Neuromuscolari**

Durante l'anno 2022 sono state studiate e refertate 1114 biopsie muscolari e 7 biopsie di nervo.

Tutte le biopsie di pazienti col sospetto clinico di distrofia sono state studiate anche con metodiche immunologiche con anticorpi contro le varie proteine coinvolte in queste patologie (distrofina, merosina, sarcoglicani, disferlina, caveolina, emerina, alfadistroglicano, miotilina, desmina, etc.).

Tutte le biopsie di pazienti col sospetto di patologia infiammatoria sono state studiate mediante specifici markers immunocitochimici. In particolare, sono stati utilizzati anticorpi anti-HLA 1 (A,B,C), anti-Membrane Attack Complex, anti-linfociti T (CD4 e CD8) e anti-B (CD 19).

Le biopsie con il sospetto di IBM sono state studiate con la colorazione Rosso Congo.

In totale, relativamente a quanto sopra specificato, sono stati eseguiti 1661 test.

Le biopsie muscolari sono state studiate con metodiche ultrastrutturali quando ritenuto necessario.

In particolare, sono state studiate tutte le biopsie di pazienti affetti da miopatie dismetaboliche per la conferma delle seguenti diagnosi: glicogenosi, lipidosi, mitocondriopatie, miopatie a corpi inclusi e miopatie congenite. Sono state infine analizzate tutte le biopsie nelle quali gli studi istologici, istoenzimologici, biochimici e genetici non sono risultati indicativi di una particolare miopatia.

I prelievi bioptici di nervo periferico sono stati studiati su sezioni criostatiche con le comuni metodiche istologiche e su sezioni semifini incluse in resina per la microscopia elettronica colorate con blu di toluidina.

Per ogni campione è stata eseguita una valutazione quantitativa della densità delle fibre mieliniche con apposito analizzatore di immagini su sezioni semifini, è stata inoltre allestita un'apposita preparazione atta all'analisi di singole fibre nervose isolate (metodica del teasing).

Nelle biopsie di nervo con sospetto di patologia infiammatoria vengono inoltre eseguiti studi immunoistochimici con Abs anti HLA, MAC e linfociti.

I prelievi bioptici afferiscono al laboratorio della UOSD Malattie Neuromuscolari e Rare della Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico provenienti da:

- UOC di Neurologia
- UOSD Malattie Neuromuscolari e Rare
- Dipartimento di Medicina della Fondazione
- Altri Dipartimenti della Fondazione
- Altri Ospedali quali: Ospedale S. Gerardo di Monza, Istituto Auxologico-Ospedale San Luca, Istituto Mondino di Pavia, Istituto Humanitas, Istituto Don Gnocchi di Milano, Ospedale San Paolo, Ospedale Sacco, Ospedale Valduce di Como, Ospedale Cantonale di Lugano, Ospedale di Niguarda, Ospedale di Desio, Ospedale di Lugo di Romagna, Ospedale di Faenza, Ospedale di Gallarate, Ospedale di Busto Arsizio, Ospedale di Melegnano, Ospedale di Vimercate, Ospedale di Legnano, Ospedale Policlinico di Pavia, Ospedale Santa Corona di Garbagnate e occasionalmente da altre strutture ospedaliere.

Regolari Convenzioni o regime di “fatturazione” intercorrono fra il Servizio di Diagnostica e i citati Enti ospedalieri.

#### **Attività della “Banca di tessuti muscolari, nervo periferico, DNA e colture cellulari”, partner della “European Biological Resources Network for Rare Diseases”**

- Sono state effettuate spedizioni di campioni biologici di pazienti affetti da malattie Rare Neuromuscolari a n. 5 centri di diagnostica e ricerca sia nazionali, sia internazionali.
- Sono state effettuate spedizioni per un totale di n. 20 campioni biologici (tessuti muscolari, DNA, colture).

Il laboratorio provvede alla tecnicazione delle biopsie, alla refertazione delle medesime, alla loro conservazione nella Biobanca della UOSD e alla spedizione dei referti ai vari enti ospedalieri.

- Dall’anno 1999 il Laboratorio ha avuto il riconoscimento di “Biobanca Telethon di tessuto muscolare scheletrico, nervo periferico, DNA e colture cellulari”. I diversi campioni biologici stoccati nella banca sono a disposizione dei ricercatori italiani e stranieri interessati e sono elencati in un dedicato sito web: <http://www.centrodinoferrari.com/laboratori/u-o-d-diagnostica-malattie-neuromuscolari-e-rare/>.
- Dall’anno 2001 la banca è parte dell’EuroBiobank, un network di banche di Istituti scientifici di diversi paesi della Comunità Europea.
- Dall’anno 2002 la banca è anche parte del Progetto Finalizzato dell’Ospedale Maggiore “Biorepository”.
- Da Luglio 2002 l’Unità operativa ha ottenuto la certificazione ISO 9001:2000 per “Progettazione ed erogazione di servizi di diagnostica morfologica e ricerca nell’ambito di malattie rare neuromuscolari, in regime di degenza, ambulatoriale e in convenzione per enti terzi. Gestione di una Banca di tessuto muscolare, nervo periferico e DNA”.
- Dal 2008 è partner del “Telethon Network of Genetic Biobanks”.
- Da Luglio 2013 è entrata a far parte dell’Infrastruttura di ricerca europea Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI).
- Dal 2013 la Biobanca è parte di RD-Connect.

## ATTIVITA' DI RICERCA

Attività di ricerca:

- **Programma di ricerca sulle malattie rare neuromuscolari:**

L'attività di ricerca è mirata allo studio eziopatogenetico e ai nuovi approcci terapeutici per le malattie rare neuromuscolari.

Inoltre, è attiva una biobanca dedicata alla raccolta dei tessuti muscolari, dei nervi periferici, del DNA e delle colture cellulari provenienti da pazienti affetti da queste patologie.

- **Analisi Ultrastrutturali:**

In ambito microscopia elettronica, sono in corso progetti di collaborazione con altri laboratori della Fondazione mirati all'analisi ultrastrutturale di tessuti epatici sia umani, sia murini.

## PROGETTI IN CORSO

- **Progetto Pompe Star**

- Progetto mirato ad ampliare la caratterizzazione della Malattia di Pompe sul territorio. La UOSD Malattie Neuromuscolari e Rare è stata selezionata tra i Centri di riferimento per il nord Italia, la Dott.ssa Monica Sciacco la rappresenta in qualità di Docente e Tutor.

- **Analisi Ultrastrutturale di biopsie epatiche di pazienti affetti da NAFLD**

- In collaborazione con l'Unità Operativa di Medicina Interna ad Indirizzo Metabolico, sono state raccolte le biopsie epatiche di pazienti affetti da NAFLD. Tali pazienti saranno stratificati in base alla presenza delle tre principali varianti di rischio nei geni PNPLA3, TMC4 e TM6SF2. Le biopsie saranno studiate mediante microscopia elettronica, allo scopo di valutare il livello di steatosi, il possibile danno al reticolo, il numero e la morfologia dei mitocondri.

- **Analisi Ultrastrutturale di biopsie epatiche provenienti da modelli murini affetti da NAFLD**

- In collaborazione con l'Unità Operativa di Medicina Interna ad Indirizzo Metabolico, sono in corso studi di caratterizzazione di modelli murini affetti da NAFLD e sottoposti a dieta. Campioni di biopsie epatiche saranno studiate mediante microscopia elettronica, allo scopo di valutare il livello di steatosi, il possibile danno al reticolo, il numero e la morfologia dei mitocondri.

- **Analisi Ultrastrutturale di biopsie epatiche provenienti da modelli murini nell'ambito di un modello preclinico che utilizza la Machine Perfusion.**

- La tecnologia definita Machine Perfusion, consente di trattare, fuori dall'organismo, un organo, prelevato a scopo di trapianto, prima che l'organo stesso venga impiantato nel paziente ricevente.
- È una tecnica già utilizzata nel nostro ospedale per valutare e migliorare la qualità di organi che inizialmente non soddisfano i criteri di idoneità al trapianto. In collaborazione con l'UOC di Chirurgia Generale e Trapianti, verranno studiate biopsie epatiche provenienti da Fegati prelevati da ratti e sottoposti a diversi protocolli di perfusione. I campioni saranno studiati mediante analisi

ultrastrutturale in microscopia elettronica, allo scopo di valutare la morfologia e la qualità del tessuto.

- **Identificazione di specifici profili di microRNA in differenti forme di distrofie dei cingoli (LGMDs)**

- Questo studio viene condotto su una cohorte di pazienti con mutazioni note in geni (calpaina, disferlina,  $\alpha$ -sarcoglicano e  $\beta$ -sarcoglicano) causativi di differenti forme di distrofia dei cingoli. I microRNA sono investigati sia per definire profili caratteristici associabili alla patologia, sia per identificare possibili biomarcatori non-invasivi da analizzare nel corso della progressione della patologia o nel corso di trial clinici, sia come possibili target terapeutici. A questo scopo, nei pool di pazienti LGMD e di controlli di pari età, è stata valutata l'espressione sierica utilizzando un pannello che permette la simultanea valutazione di 179 miRNAs espressi nel siero e nel plasma. L'analisi dei dati ottenuti in Real-Time PCR per identificare le differenze di espressione tra pazienti e controlli sarà effettuata tramite software GeneGlobe Data Analysis. La valutazione dei geni target associati ai miRNAs differentemente espressi, e dei corrispondenti pathway coinvolti, sarà eseguita attraverso la consultazione di differenti software e database. La validità dei miRNAs identificati come biomarcatori sarà valutata tramite analisi statistica di correlazione con i dati clinici. La sensibilità e la specificità di eventuali miRNA identificati sarà definita tramite la valutazione delle curve ROC.

## PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA ANNO 2022

L'attività di ricerca è stata condotta utilizzando gli stessi laboratori e apparecchi impiegati per la diagnostica neuromuscolare. Anche i reagenti utilizzati sono, almeno per l'80%, quelli comunemente impiegati per la diagnostica.

L'attività di ricerca ha prodotto nel 2022 i seguenti risultati:

### **Pubblicazioni 2022 UO Malattie Neuromuscolari e Rare**

Gang Q, Bettencourt C, Brady S, Holton JL, Healy EG, McConville J, Morrison PJ, Ripolone M, Violano R, Sciacco M, Moggio M, Mora M, Mantegazza R, Zanotti S, Wang Z, Yuan Y, Liu WW, Beeson D, Hanna M, Houlden H.

*Genetic defects are common in myopathies with tubular aggregates.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022

IF: 4.511

Nonostante alcuni geni siano già associati a miopatie con aggregati tubulari, molti casi rimangono ancora privi di una conferma genetica. In questo studio multicentrico, sono stati raccolti i campioni bioptici muscolari di 33 pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di miopatia con aggregati tubulari. È stato eseguito per ogni caso il sequenziamento dell'intero esoma che ha portato alla rilevazione di varianti patogene o probabili varianti patogene nei seguenti geni: STIM1, ORAI1, PGAM2, SCN4A, CASQ1 and ALG14. Lo studio ha portato alla luce anche due nuove varianti. I risultati hanno inoltre confermato che mutazioni nei geni legati alle vie di segnalazione del calcio e alla via delle glicosilazione N-linked sono frequentemente coinvolti in miopatie da aggregati tubulari.

Šušnjar U, Škrabar N, Brown AL, Abbassi Y, Phatnani H; NYGC ALS Consortium, Cortese A, Cereda C, Bugiardini E, Cardani R, Meola G, **Ripolone M, Moggio M**, Romano M, Secrier M, Fratta P, Buratti E.

*Cell environment shapes TDP-43 function with implications in neuronal and muscle disease.*

**Commun Biol.** 2022 Apr 5;5(1):314.

IF: 5.489

L'aggregazione e la ridistribuzione della proteina TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) sono riconosciute come segni distintivi della sclerosi laterale amiotrofica e della demenza frontotemporale. Poiché le inclusioni di TDP-43 sono state recentemente descritte anche nel muscolo dei pazienti con miosite da corpi inclusi, ciò evidenzia la necessità di comprendere il ruolo di TDP-43 oltre al sistema nervoso centrale. In questo studio applicando la tecnica dell'RNA-seq in cellule murine muscolari (C2C12) e neuronali (NSC34) sono stati individuati degli specifici sottoinsiemi di mRNA targets cellula -specifici e di mRNA regolati in modo comune nelle due linee cellulari.

In particolare sono stati analizzati splicing alterati conseguenti alla riduzione dei livelli di TDP-43 sia in pazienti con demenza fronto-temporale che in pazienti con IBM, dimostrando che alterazioni dello splicing si possono manifestare in differenti tessuti affetti da patologie TDP-43-dipendenti. Questo lavoro mostra come alterazioni dello splicing di TDP-43 rappresentino una solida indicazione di una condizioni patologiche sia nel muscolo scheletrico di pazienti con IBM che nel cervello di pazienti affetti da demenza fronto-temporale.

Meroni M, Longo M, Paolini E, Tria G, Ripolone M, Napoli L, Moggio M, Fracanzani AL, Dongiovanni P.

*Expanding the phenotypic spectrum of non-alcoholic fatty liver disease and hypertriglyceridemia.*

**Front Nutr.** 2022 Sep 15;9:967899.

IF: 6.59

In questo lavoro viene presentato il caso di una donna di 40 anni con una forma precoce ed aggressiva di steatosi epatica non alcolica. La paziente si presenta riportando epatomegalia, ipertrigliceridemia ed aumento dei livelli di transaminasi. L'analisi genetica ha rilevato la presenza di un cluster di varianti in geni implicati nell'omeostasi lipidica e nella funzionalità mitocondriale. Dato il particolare assetto ereditario presentato dalla paziente che influenza la funzionalità e la struttura mitocondriale è stata condotta una approfondita valutazione ultrastrutturale dei mitocondri epatici. La microscopia elettronica ha evidenziato la presenza di mitocondri giganti con distribuzione atipica della membrana. Lo studio ha dimostrato che varianti genetiche che hanno impatto sull'omeostasi lipidica possono essere causative di una forma severa di ipertrigliceridemia in pazienti affetti da steatosi epatica non alcolica. L'accumulo di lipidi negli epatociti in associazioni a mutazioni che compromettono la funzionalità mitocondriale potrebbe agire come concuse nell'aggravamento della patologia.

Ripolone M, Velardo D, Mondello S, Zanotti S, Magri F, Minuti E, Cazzaniga S, Fortunato F, Ciscato P, Tiberio F, Sciacco M, Moggio M, Bettica P, Comi GP.

*Muscle histological changes in a large cohort of patients affected with Becker muscular dystrophy.*

**Acta Neuropathol Commun.** 2022 Apr 8;10(1):48.

IF: 6.43

La distrofia muscolare di Becker è una grave forma di distrofia muscolare X linked. È caratterizzata da una grande variabilità sia nell'età di esordio della patologia, sia nell'età di perdita della deambulazione e nell'evoluzione clinica. Tutto ciò rende veramente complessa la progettazione di trial clinici. I cambiamenti istopatologici nel tessuto muscolare scheletrico sono fondamentali per la patogenesi, ma non sono stati ancora completamente chiariti. In questo lavoro abbiamo analizzato le biopsie muscolari di un'ampia coorte di pazienti affetti da BMD, concentrando la nostra attenzione sui parametri muscolari istopatologici, quali fibrosi, sostituzione adiposa, fibre in necrosi, fibre in rigenerazione, centralizzazioni nucleari. Abbiamo correlato i parametri istologici sia con le

caratteristiche demografiche che con le valutazioni funzionali cliniche. I risultati più interessanti del nostro studio sono l'accurata quantificazione della sostituzione del tessuto muscolare con tessuto fibroadiposo e l'identificazione di alcuni aspetti istopatologici che ben correlano con le prestazioni cliniche. Attraverso l'analisi di correlazione, abbiamo diviso i nostri pazienti in tre gruppi con caratteristiche istologiche e cliniche ben definite. In conclusione, questo è il primo studio che analizza in dettaglio le caratteristiche istologiche delle biopsie muscolari in un'ampia coorte di pazienti affetti da BMD, correlandole a una compromissione funzionale. La raccolta di questi dati è importante per comprendere meglio la progressione istopatologica della malattia e potrà essere utile per convalidare futuri studi farmacologici in cui saranno valutati i cambiamenti a livello della biopsia muscolare.

Zanotti S, Magri F, Poggetti F, Ripolone M, Velardo D, Fortunato F, Ciscato P, Moggio M, Corti S, Comi GP, Sciacco M.

*Immunofluorescence signal intensity measurements as a semi-quantitative tool to assess sarcoglycan complex expression in muscle biopsy.*

**Eur J Histochem.** 2022 Sep 1;66(3):3418.

IF: 1.966

Le sarcoglicanopatie si manifestano con un fenotipo eterogeneo. La loro gravità clinica di solito è correlata alla quantità residua di proteina espressa. La diagnosi di sarcoglicanopatia è genetica, ma l'analisi del muscolo scheletrico - mediante immunoistochimica e Western blot è ancora obbligatoria per stabilire il corretto processo diagnostico. Questo studio fornisce uno strumento sensibile per la semi-quantificazione della quantità residua dei sarcoglicani basato sulla tecnica di immunofluorescenza su sezioni muscolari scheletriche, acquisizione di immagini ed elaborazione con specifico software. Questo protocollo è stato applicato a undici sarcoglicanopatie, sette distrofie muscolari di Becker e quattro controlli di pari età. I dati di fluorescenza normalizzati e in relazione all'età di esordio della malattia hanno mostrato una correlazione negativa con la fibrosi. Il metodo proposto potrebbe essere impiegato anche per monitorare l'efficacia degli interventi terapeutici e durante gli studi clinici.

Ripolone M, Napoli L, Mantero V, Sciacco M, Zanotti S.

*Peculiar histological and ultrastructural skeletal muscle alterations in a patient with CMV infection and autoimmune myositis: case evaluation and brief literature review.*

**Acta Myol.** 2022 Mar 31;41(1):41-47.

IF: 1.54

Riportiamo il caso di una giovane donna con infezione da CMV e miopatia. La biopsia muscolare eseguita presso la nostra Unità ha evidenziato la presenza di sparsi infiltrati infiammatori ed un'alterazione dell'attività enzimatica NADH. Sono stati eseguiti approfondimenti di morfologia ultrastrutturale in microscopia elettronica che hanno evidenziato alterazioni della struttura sarcomerica e grandi inclusioni di filamenti sottili. L'approfondimento in immunofluorescenza ha evidenziato un'alterazione dell'espressione di desmina, actina e  $\alpha$ B-cristallino. L'esposizione di questo caso peculiare è stato lo spunto anche per un approfondimento della letteratura relativa all'infezioni virali e miopatia, sottolineando la necessità di considerare l'infezione da CMV nella diagnosi differenziale della miopatia con eziologia non nota.

Velardo D, D'Angelo MG, Citterio A, Panzeri E, Napoli L, Cinnante C, Moggio M, Comi GP, Ronchi D, Bassi MT.

*Case Reports: Novel Missense Variants in the Filamin C Actin Binding Domain Cause Variable Phenotypes.*

**Front Neurol.** 2022 Jul 12;13:930039.

IF: 4.086

In questo lavoro vengono descritti due pazienti italiani nei quali sono stati identificate due nuove varianti missense nel gene della Filamina C nel dominio di legame con l'actina. La filamina C è espressa nel muscolo scheletrico e cardiaco e partecipa alla stabilizzazione meccanica del sarcomero e nella trasmissione di segnali intracellulari interagendo con numerosi partners. Le mutazioni eterozigoti dominanti nel gene della Filamina C causano diverse forme di miopatia e di cardiomiopatia aritmogenica. I due pazienti sono descritti clinicamente, radiologicamente e attraverso la valutazione di aspetti istologici ed ultrastrutturali della biopsia muscolare. Questo studio ha contribuito ad espandere il numero delle varianti nel dominio di legame della Filamina C con l'actina e l'eterogeneità delle manifestazioni fenotipiche dei pazienti affetti da filaminopatia. Lo studio ha messo in risalto l'importanza degli approfondimenti morfologici ultrastrutturali a livello della biopsia muscolare, anche in assenza di evidenti alterazioni in microscopia ottica.

## **Elenco delle Pubblicazioni Scientifiche in Collaborazione con l'UO Neurologia-Laboratorio di Biochimica e Genetica.**

Gagliardi D, Rizzuti M, Brusa R, Ripolone M, Zanotti S, Minuti E, Parente V, Dioni L, Cazzaniga S, Bettica P, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Magri F, Velardo D.

*MicroRNAs as serum biomarkers in Becker muscular dystrophy.*

**J Cell Mol Med.** 2022 Sep;26(17):4678-4685.

Magri F, Antognozzi S, **Ripolone M**, **Zanotti S**, **Napoli L**, **Ciscato P**, **Velardo D**, Scuvera G, Nicotra V, Giacobbe A, Milani D, Fortunato F, Garbellini M, **Sciacco M**, Corti S, **Comi GP**, Ronchi D.

*Megaconial congenital muscular dystrophy due to novel CHKB variants: a case report and literature review.*

**Skelet Muscle.** 2022 Sep 29;12(1):23. Review.

Comi GP, Niks EH, Cinnante CM, Kan HE, Vandenborne K, Willcocks RJ, Velardo D, Ripolone M, van Benthem JJ, van de Velde NM, Nava S, Ambrosoli L, Cazzaniga S, Bettica PU.

*Characterization of patients with Becker muscular dystrophy by histology, magnetic resonance imaging, function, and strength assessments.*

**Muscle Nerve.** 2022 Mar;65(3):326-333.

Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Rizzo F, Moggio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S.

*Clinical and genetic features of a cohort of patients with MFN2-related neuropathy.*

**Sci Rep.** 2022 Apr 13;12(1):6181.

Pasca L, Gardani A, Paoletti M, **Velardo D**, Berardinelli A.

*Good response to the late treatment with ataluren in a boy with Duchenne muscular dystrophy: could the previous mild course of the disease have affected the outcome?*

**Acta Myol.** 2022 Sep 30;41(3):121-125.

Magri F, Zanotti S, Salani S, Fortunato F, Ciscato P, Gerevini S, Maggi L, Sciacco M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D.

Antisense Morpholino-Based In Vitro Correction of a Pseudoexon-Generating Variant in the SGCB Gene.

**Int J Mol Sci.** 2022 Aug 29;23(17):9817.

Ricci G, Guillou F, Catizone A, Mele VG, **Moggio M**, Chioccarelli T, Diano N, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G, Chianese R, Manfreola F.

*KISS1R and ANKRD31 Cooperate to Enhance Leydig Cell Gene Expression via the Cytoskeletal-Nucleoskeletal Pathway.*

**Front Cell Dev Biol.** 2022 Jun 23;10:877270.

Manini A, Velardo D, Ciscato P, Cinnante C, Moggio M, Comi G, Corti S, Ronchi D.  
*Expanding the Phenotypic Spectrum of Vocal Cord and Pharyngeal Weakness With Distal Myopathy due to the p.S85C MATR3 Mutation.*  
**Neurol Genet.** 2022 Jul 6;8(4):e200006.

Musumeci O, Pugliese A, Oteri R, Volta S, Ciranni A, **Moggio M**, Rodolico C, Toscano A.  
*A new phenotype of muscle glycogen synthase deficiency (GSD0B) characterized by an adult onset myopathy without cardiomyopathy.*  
**Neuromuscul Disord.** 2022 Jul;32(7):582-589.

Fumagalli M, Ronchi D, Bedeschi MF, Manini A, Cristofori G, Mosca F, Dilena R, Sciacco M, Zanotti S, Piga D, Ardissino G, Triulzi F, Corti S, Comi GP, Salviati L.  
*A novel RRM2B mutation associated with mitochondrial DNA depletion syndrome.*  
**Mol Genet Metab Rep.** 2022 Jun 18;32:100887.

Attardo S, Musumeci O, Velardo D, Toscano A.  
*Statins Neuromuscular Adverse Effects.*  
**Int J Mol Sci.** 2022 Jul 28;23(15):8364.

Olivero M, Gagliardi D, Costamagna G, Velardo D, Magri F, Triulzi F, Conte G, Comi GP, Corti S, Meneri M.  
*Newly Diagnosed Hepatic Encephalopathy Presenting as Non-convulsive Status Epilepticus: A Case Report and Literature Review.*  
**Front Neurol.** 2022 May 12;13:880068.

Gagliardi D, Pagliari E, Meneri M, Melzi V, Rizzo F, Comi GP, Corti S, Taiana M, Nizzardo M.  
*Stathmins and Motor Neuron Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Targets.*  
**Biomedicines.** 2022 Mar 19;10(3):711. Review.

Manini A, Abati E, Comi GP, Corti S, Ronchi D.  
*Mitochondrial DNA homeostasis impairment and dopaminergic dysfunction: A trembling balance.*  
**Ageing Res Rev.** 2022 Apr;76:101578. Review.

Bersani M, Rizzuti M, Pagliari E, Garbellini M, Saccomanno D, Moulton HM, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.  
*Cell-penetrating peptide-conjugated Morpholino rescues SMA in a symptomatic preclinical model.*  
**Mol Ther.** 2022 Mar 2;30(3):1288-1299.

Nasca A, Legati A, Meneri M, Ermert ME, Frascarelli C, Zanetti N, Garbellini M, Comi GP, Catania A, Lamperti C, Ronchi D, Ghezzi D.  
*Biallelic Variants in ENDOG Associated with Mitochondrial Myopathy and Multiple mtDNA Deletions.*  
**Cells.** 2022 Mar 12;11(6):974.

Longo M, Meroni M, Paolini E, Erconi V, Carli F, Fortunato F, Ronchi D, Piciotti R, Sabatini S, Macchi C, Alisi A, Miele L, Soardo G, **Comi GP**, Valenti L, Ruscica M, Fracanzani AL, Gastaldelli A, Dongiovanni P.  
*TM6SF2/PNPLA3/MBOAT7 Loss-of-Function Genetic Variants Impact on NAFLD Development and Progression Both in Patients and in In Vitro Models.*  
**Cell Mol Gastroenterol Hepatol.** 2022;13(3):759-788.

Rizzuti M, Melzi V, Gagliardi D, Resnati D, Meneri M, Dioni L, Masrori P, Hersmus N, Poesen K, Locatelli M, Biella F, Silipigni R, Bollati V, Bresolin N, **Comi GP**, Van Damme P, Nizzardo M, Corti S.

*Insights into the identification of a molecular signature for amyotrophic lateral sclerosis exploiting integrated microRNA profiling of iPSC-derived motor neurons and exosomes.*

**Cell Mol Life Sci.** 2022 Mar 14;79(3):189.

Manini A, Meneri M, Rodolico C, Corti S, Toscano A, **Comi GP**, Musumeci O, Ronchi D.

*Case Report: Thymidine Kinase 2 (TK2) Deficiency: A Novel Mutation Associated With Childhood-Onset Mitochondrial Myopathy and Atypical Progression.*

**Front Neurol.** 2022 Feb 25;13:857279.

## **LABORATORIO CELLULE STAMINALI NEURALI**

### **RESPONSABILE:**

**Prof. Stefania Corti**

### **MEDICI:**

Dott. Irene Faravelli  
Dott. Delia Gagliardi  
Dott. Elena Abati  
Dott. Gianluca Costamagna

### **BIOLOGI:**

Dott. Sabrina Salani  
Dott. Federica Rizzo  
Dott. Valeria Parente  
Dott. Linda Ottoboni  
Dott. Lorenzo Brambilla  
Dott. Jessica Ongaro  
Dott. Alessia Anastasia  
Dott. Andrea D'Angelo

### **BIOTECNOLOGI:**

Dott. Mafalda Rizzuti  
Dott. Michela Taiana  
Dott. Valentina Melzi  
Dott. Noemi Galli  
Dott. Elisa Pagliari  
Dott. Luca Sali  
Dott. Lorenzo Quetti  
Dott. Francesca Beatrice  
Dott. Francesca Sironi

### **TECNICI DI LABORATORIO:**

Dott. Manuela Garbellini:

Il Laboratorio di Cellule Staminali Neurali svolge la propria attività di ricerca nell’ambito dello studio dei meccanismi patogenetici e dello sviluppo di strategie terapeutiche cellulari e molecolari per le malattie del motoneurone, neurodegenerative e neuromuscolari. In particolare le patologie oggetto di studio sono l'Atrofia Muscolare Spinale (SMA), l'Atrofia Muscolare Spinale con Distress Respiratorio (SMARD1), entrambe ad esordio infantile, la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), ad esordio adulto, e le neuropatie ereditarie come la Malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A). Al fine di analizzare i meccanismi molecolari delle patologie e le potenzialità terapeutiche delle nuove strategie sviluppate, sono utilizzati modelli cellulari *in vitro* 2D e 3D derivati da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) ottenute mediante la riprogrammazione di cellule somatiche adulte; tale strategia permette di poter utilizzare modelli cellulari paziente specifici. Le iPSC inoltre sono utilizzate come sorgente cellulare per strategie di tipo cellulo-mediato: il trapianto di cellule staminali risulta infatti essere un possibile approccio terapeutico per le malattie neurodegenerative, che agisce sia mediante la sostituzione cellulare che con meccanismi di tipo neuroprotettivo. Nel nostro laboratorio sono inoltre sviluppate strategie di terapia genica che prevedono l’utilizzo di vettori adeno-associati (AAV) e di terapia molecolare con oligonucleotidi antisenso con chimica morfolino (MO).

Sono qui presentati in sintesi i risultati ottenuti dalle nostre ricerche nel 2022.

### **L’analisi molecolare delle cellule derivanti da pazienti SMARD1 dimostra che la degradazione dell’mRNA è alterata nella patologia. (Taiana et al, 2022)**

Le mutazioni bialleliche nel gene per la proteina 2 legante l’immunoglobulina μ (IGHMBP2) portano alla degenerazione dei motoneuroni (MN) nel tronco encefalico e nelle corna anteriori del midollo spinale, causando atrofia muscolare spinale fatale con distress respiratorio di tipo I (SMARD1). I pazienti presentano un certo grado di variabilità fenotipica che non è stato spiegato. Attualmente non è disponibile alcuna terapia efficace e la comprensione della funzione dell’IGHMBP2 è fondamentale per l’identificazione di bersagli specifici della malattia. IGHMBP2 è una DNA/RNA-elicasi coinvolta in diversi processi cellulari, ma la sua precisa funzione è sconosciuta. IGHMBP2 mostra somiglianze con il regolatore umano dei trascritti nonsense UPF1, che fa parte del complesso centrale richiesto per la degradazione dell’mRNA mediato da un nonsense (NMD), un percorso di degradazione dell’RNA dipendente dalla traduzione, implicato in diversi sottotipi di sclerosi laterale amiotrofica (SLA). Abbiamo analizzato i fibroblasti, le cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) e i loro MN derivati da otto pazienti con SMARD1 portatori di diverse mutazioni in *IGHMBP2*. Tutti i tipi di cellule hanno mostrato una marcata carenza di proteina IGHMBP2 ma non di mRNA. Abbiamo inoltre dimostrato che il trascritto *IGHMBP2* è regolato dal pathway NMD, che risulta inibito nella condizione SMARD1. È importante sottolineare che la riattivazione del pathway NMD è stata in grado di preservare la lunghezza dell’assone e prevenire l’apoptosi nei MN colpiti, a supporto dell’ipotesi che NMD sia un potenziale bersaglio, come precedentemente suggerito per altri disturbi dei MN. Pertanto saranno necessari ulteriori indagini sui farmaci che possono modulare l’attività di NMD per un potenziale uso terapeutico nelle neuropatie motorie ereditarie che condividono lo stesso meccanismo molecolare patologico.

Taiana M, Govoni A, Salani S, Kleinschmidt N, Galli N, Saladini M, Ghezzi S, Melzi V, Bersani M, Del Bo R, Muehlemann O, Bertini E, Sansone V, Albamonte E, Messina S, Mari F, Cesaroni E, Tiziano FD, Vita G, Sframeli M, Bnn C, Bresolin N, Comi G, Corti S\*, Nizzardo M\*.

*Molecular analysis of SMARD1 patient-derived cells demonstrates that nonsense-mediated impairment mRNA decay is impaired.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 2022 Jan 27:jnnp-2021-326425. ISSN: 00223050 doi: 10.1136/jnnp2021-326425 PMID: 35086940.

## **Modulazione di PTB per la riprogrammazione da glia a neurone *in vitro* e *in vivo* per lo sviluppo terapeutico nelle malattie neurologiche. (Contardo M et al, 2022)**

La riprogrammazione cellulare *in vivo* delle cellule gliali rappresenta una strategia promettente per generare nuovi neuroni nel sistema nervoso dei mammiferi adulti. Questo approccio potrebbe compensare la perdita neuronale che avviene nelle malattie neurologiche, ma sono necessari strumenti clinicamente validi per far avanzare questa strategia dalla ricerca preclinica all'applicazione in clinica. Un lavoro pubblicato recentemente ha descritto la riuscita della conversione neuronale di cellule gliali attraverso la repressione di un singolo gene, *Ptbp1*, che codifica per la proteina 1 legante il tratto polipirimidinico, proteina chiave che lega l'RNA. I neuroni appena convertiti non solo esprimono i marcatori corretti, ma si integrano anche funzionalmente nei circuiti cerebrali endogeni e modificano i sintomi della malattia in modelli *in vivo* di malattie neurodegenerative. Tuttavia, sono stati sollevati dubbi sulla natura dei neuroni "convertiti", in particolare *in vivo*, secondo i dati di tracciamento di geni reporter nelle cellule convertite. È necessaria una tracciatura della linea più robusta delle cellule riprogrammate per trarre conclusioni definitive sull'affidabilità di questa strategia. La riprogrammazione *in vivo* e la possibilità di utilizzare approcci che potrebbero essere traslati in clinica come oligonucleotidi antisenso contro *Ptbp1* sono attualmente di grande interesse per la comunità scientifica e ulteriori indagini con metodi e criteri di valutazione rigorosi saranno necessari per l'utilizzo di questa strategia per il trattamento delle malattie neurologiche.

Contardo M, De Gioia R, Gagliardi D, Comi GP, Ottoboni L, Nizzardo M, Corti S.

*Targeting PTB for Glia-to-Neuron Reprogramming In Vitro and In Vivo for Therapeutic Development in Neurological Diseases.*

**Biomedicines**, 2022 Feb 7;10(2):399. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines10020399. PMID: 35203608.

## **Identificazione di un profilo molecolare specifico per la sclerosi laterale amiotrofica attraverso l'analisi integrata dell'espressione dei microRNA nei motoneuroni e negli esosomi derivati da iPSC. (Rizzuti M et al, 2022)**

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una rara malattia neurodegenerativa caratterizzata da una progressiva degenerazione dei motoneuroni (MN). La maggior parte dei casi è sporadica, mentre il 10% è familiare. I meccanismi patologici alla base della malattia sono solo parzialmente compresi, ma è sempre più riconosciuto che nella SLA si verificano alterazioni nel metabolismo dell'RNA ed in particolare è presente la deregolazione dell'espressione dei microRNA (miRNA). In questo studio, abbiamo eseguito l'analisi del profilo di espressione dei miRNA di MN derivati da iPSC e dei relativi esosomi ottenuti da pazienti con SLA familiare e soggetti sani. Abbiamo identificato la disregolazione dell'espressione di miR-34a, miR-335 e miR-625-3p sia nei MN che negli esosomi. Questi miRNA regolano geni e pathway correlati alla patogenesi della malattia, suggerendo che lo studio della deregolazione dei miRNA possa contribuire alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base della malattia. Abbiamo anche analizzato il profilo di espressione di questi miRNA nel liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti familiari (fALS) e sporadici (sALS) e abbiamo identificato una significativa disregolazione dei livelli di miR-34a-3p e miR-625-3p nella SLA rispetto a controlli. Nel complesso, tutti questi risultati suggeriscono che l'analisi dei miRNA eseguita simultaneamente in diversi campioni biologici umani potrebbe rappresentare uno strumento molecolare promettente per comprendere l'eziopatogenesi della SLA e per sviluppare nuove potenziali strategie terapeutiche molecolari basate sui miRNA.

Rizzuti M, Melzi V, Gagliardi D, Resnati D, Meneri M, Dioni L, Masrori P, Hersmus N, Poesen K, Locatelli M, Biella F, Silipigni R, Bollati V, Bresolin N, Comi GP, Van Damme P, Nizzardo M, Corti S.

*Insights into the identification of a molecular signature for amyotrophic lateral sclerosis exploiting integrated microRNA profiling of iPSC-derived motor neurons and exosomes.*

**Cell Mol Life Sci**, 2022 Mar 14;79(3):189. ISSN: 1420682X. doi: 10.1007/s00018-022-04217-1. PMID: 35286466.

### **Statmine e malattie dei motoneuroni: fisiopatologia e obiettivi terapeutici. (Gagliardi et al, 2022)**

Le malattie dei motoneuroni (MND) sono un gruppo di malattie neurodegenerative fatali con diversa eziologia, decorso clinico e manifestazione, causate dalla perdita dei motoneuroni superiori e inferiori (MN). I MN sono cellule altamente specializzate dotate di lunghi processi assonali; i difetti assonali sono alla base della patogenesi di questi disturbi. I microtubuli sono componenti chiave del citoscheletro neuronale caratterizzato da instabilità dinamica, passando da una rapida polimerizzazione alla depolarizzazione. Le proteine della famiglia delle statmine influenzano la dinamica dei microtubuli regolando l'assemblaggio e lo smantellamento della tubulina. Statmina-2 (*STMN2*) è uno dei geni più abbondantemente espressi nei MN. Dopo il danno assonale, l'espressione di *STMN2* è aumentata e la proteina viene trasportata verso i coni di crescita degli assoni in rigenerazione. *STMN2* ha un ruolo fondamentale nel mantenimento assonale e la sua disregolazione gioca un ruolo importante nei processi neurodegenerativi. Statmina-1 (*STMN1*) è una proteina ubiquitaria altamente espressa durante lo sviluppo del sistema nervoso e la sua fosforilazione controlla la dinamica dei microtubuli. Nella presente review, abbiamo riassunto ciò che è attualmente noto sul coinvolgimento delle alterazioni delle statmine nelle MND e sul potenziale effetto terapeutico della loro modulazione, focalizzandoci in particolare sulle forme più comuni di MND, la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e l'atrofia muscolare spinale (SM).

Gagliardi D, Pagliari E, Meneri M, Melzi V, Rizzo F, Comi GP, Corti S, Taiana M, Nizzardo M. *Statmins and Motor Neuron Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Targets. Biomedicines*, 2022 Mar 19;10(3):711. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines10030711. PMID: 35327513.

### **Caratteristiche cliniche e genetiche di una coorte di pazienti con neuropatia correlata a MFN2. (Abati et al, 2022)**

La malattia di Charcot-Marie-Tooth di tipo 2A (CMT2A) è una rara neuropatia assonale ereditaria causata da mutazioni nel gene *MFN2* che codifica per la mitofusina 2, una proteina transmembrana della membrana mitocondriale esterna. Abbiamo eseguito un'analisi trasversale su tredici pazienti portatori di mutazioni in *MFN2*, appartenenti a dieci famiglie, descrivendone le caratteristiche cliniche e genetiche. I pazienti valutati presentavano un'età di insorgenza variabile e un ampio spettro fenotipico, per la maggior parte grave. È stata rilevata una nuova variante missenso eterozigote, p.K357E, che si trova in una posizione altamente conservata e prevista come patogena dagli strumenti *in silico*. A livello clinico, il portatore di p.K357E mostra una grave neuropatia assonale sensomotoria. In conclusione, il nostro lavoro amplia lo spettro genetico della CMT2A, rivelando una nuova mutazione e il relativo effetto clinico, e fornisce una descrizione dettagliata delle caratteristiche cliniche di una coorte di pazienti con mutazioni *MFN2*. Ottenere una diagnosi genetica precisa nelle famiglie affette è fondamentale sia per la pianificazione familiare per la diagnosi prenatale, sia in una prospettiva terapeutica, nell'ottica dello sviluppo di terapie personalizzate per le malattie genetiche. Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Rizzo F, Moggio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S. *Clinical and genetic features of a cohort of patients with MFN2-related neuropathy. Sci Rep*, 2022 Apr 13;12(1):6181. ISSN: 20452322. doi: 10.1038/s41598-022-10220-0. PMID: 35418194 1.

### **Inibizione della miostatina e delle vie di segnalazione correlate per il trattamento dell'atrofia muscolare nelle patologie del motoneurone. (Abati et al, 2022)**

La miostatina è un regolatore negativo della crescita del muscolo scheletrico ed è secreta dai miociti. Negli ultimi anni, l'inibizione della miostatina ha suscitato l'interesse della comunità scientifica per

il suo potenziale nell'aumentare la crescita muscolare e nel ridurre, o addirittura prevenire, l'atrofia muscolare. Tali caratteristiche la rendono un target promettente per il trattamento dell'atrofia muscolare nelle patologie del motoneurone, in particolare nella sclerosi laterale amiotrofica (SLA) e nell'atrofia muscolare spinale (SMA), che sono malattie neurologiche rare in cui la degenerazione dei motoneuroni causa progressiva perdita di massa muscolare e paralisi. Queste patologie hanno un enorme impatto sulla morbidità e sulla mortalità ma, nonostante tale scenario sfavorevole, negli ultimi anni sono stati compiuti numerosi progressi terapeutici. Infatti, sono state approvate diverse terapie per la SMA, che hanno rivoluzionato l'aspettativa di vita e l'outcome clinico dei pazienti. Allo stesso modo il Tofersen, un oligonucleotide antisenso, è attualmente in fase di sperimentazione clinica per pazienti affetti da SLA portatori della mutazione SOD1. Tuttavia, tali terapie non sono in grado di arrestare o revertire del tutto la progressione del danno muscolare. Recentemente è stato avviato per pazienti SMA uno studio che valuta l'efficacia terapeutica dell'Apitegromab, un inibitore della miostatina, in seguito ai risultati positivi degli studi preclinici. In questo contesto, l'inibizione della miostatina potrebbe rappresentare una strategia utile per affrontare i sintomi motori in tali pazienti. Lo scopo della review è di descrivere il pathway della miostatina e il suo ruolo nelle patologie del motoneurone, e di discutere in modo critico gli studi preclinici e clinici sugli inibitori della miostatina nella SMA e nella SLA. Vengono inoltre evidenziate le potenzialità e le insidie legate all'uso degli inibitori della miostatina nell'uomo che la comunità scientifica dovrà considerare per lo sviluppo di futuri studi clinici.

Abati E, Manini A, Comi GP, Corti S. *Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases.*

**Cell Mol Life Sci**, 2022 Jun 21;79(7):374. ISSN: 1420682X. Doi: 10.1007/s00018-022-04408-w. PMID: 35727341; PMCID: PMC9213329.

**MicroRNA come marcatori sierici nella distrofia muscolare di Becker. (Gagliardi et al, 2022)**  
La distrofia muscolare di Becker (BMD) è un disturbo neuromuscolare X-linked dovuto ad una mutazione del gene DMD, che codifica per la distrofina. Nonostante l'ampia variabilità clinica, la BMD è caratterizzata da progressiva degenerazione muscolare e da debolezza dei muscoli prossimali. Anche se sono stati condotti pochi studi sulla BMD, è interessante notare che è stata riscontrata una disregolazione nell'espressione di microRNA (miRNA) specifici per il muscolo, definiti myomirs, in pazienti affetti da distrofie muscolari. In questo lavoro è stata analizzata l'espressione sierica di un sottoinsieme di myomirs in una coorte di 29 individui affetti da BMD che sono stati ulteriormente classificati in base al grado di alterazioni rilevato dalla biopsia muscolare e in 11 controlli sani di età corrispondenti. È stata riscontrata un significativo aumento dell'espressione di miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206 nel siero nella coorte di pazienti affetti da BMD, confermando il loro ruolo nella patofisiologia della malattia, e sono stati identificati i cut-off dei livelli sierici che discriminano pazienti e controlli sani, confermando il potenziale dei miRNA circolanti come biomarkers non invasivi promettenti. Inoltre, i livelli sierici di miR-133b sono risultati associati a fibrosi, mediante biopsia muscolare, e alle prestazioni motorie dei pazienti, suggerendo che esso potrebbe essere un utile marcitore prognostico. Nel complesso, i nostri dati hanno mostrato che questi myomirs sierici possono rappresentare uno strumento efficace per la stratificazione dei pazienti affetti da BMD, offrendo l'opportunità di monitorare la progressione della malattia e di valutare l'efficacia del trattamento nel contesto di studi clinici.

Gagliardi D, Rizzuti M, Brusa R, Ripolone M, Zanotti S, Minuti E, Parente V, Dionis L, Cazzaniga S, Bettica P, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Magri F\*, Velardo D\*.

*MicroRNAs as serum biomarkers in Becker Muscular Dystrophy.*

**J Cell Mol Med**, 2022 ISSN: 15821838. Doi: 10.1111/jcmm.17462. PMID: 35880500.

### **Analisi di varianti rare di miRNA nella Sclerosi Laterale Amiotrofica e previsione *in silico* dei loro effetti biologici. (Brusati et al, 2022)**

La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) è una patologia neurodegenerativa che colpisce i motoneuroni superiori e/o inferiori caratterizzata da un'eziologia complessa. I casi familiari mostrano elevata eterogeneità genetica e i casi sporadici (90%) sono associati a diversi fattori di rischio genetici e ambientali. Tra i fattori di rischio genetici, il contributo degli elementi non codificanti come i microRNA (miRNA) alla suscettibilità alla SLA rimane in gran parte ancora sconosciuto. Questo lavoro mira a identificare varianti rare nei geni dei miRNA in pazienti affetti da forme sporadiche di SLA (sALS), che potrebbero causare una maturazione difettosa dei miRNA o un alterato riconoscimento del gene bersaglio, attraverso la modifica della struttura secondaria o della sequenza di partenza. In questo lavoro sono state identificate 86 varianti rare in 77 diversi miRNA, con strutture secondarie modificate in circa il 70% delle previsioni MiRVas. Concentrandosi sulle 6 varianti rare mappate all'interno della sequenza principale, i geni target predetti sono aumentati in numero rispetto a quelli del miRNA di riferimento e sono nuovi in un range compreso tra il 30% e l'82%. È interessante notare che l'analisi di over rappresentazione (ORA) ha rivelato significativi cambiamenti nell'arricchimento del set di geni solo per i miR509-1 e miR-941-3 mutati. È stato quindi sviluppato un metodo per studiare le varianti rare dei miRNA dai dati WGS (Whole Genome Sequencing) e per predire gli effetti biologici del loro ripiegamento, maturazione e riconoscimento dei geni bersaglio. Sebbene questo approccio *in silico* necessiti certamente di validazione funzionale *in vitro* e *in vivo*, può aiutare a definire il ruolo della variabilità dei miRNA nella SLA e in malattie complesse.

Brusati A, Ratti A, Pensato V, Peverelli S, Gentilini D, Dalla Bella E, Sorice MN, Meneri M, Gagliardi D, Corti S, Gellera C, Lauria Pinter G, Ticozzi N, Silani V. *Analysis of miRNA rare variants in amyotrophic lateral sclerosis and in silico prediction of their biological effects*. Front Genet. 2022 Dec 7;13:1055313. Doi: 10.3389/fgene.2022.1055313. eCollection 2022. PMID: 36568378.

### **Il Morfolino coniugato con peptidi penetranti recupera il fenotipo patologico in un modello preclinico sintomatico di SMA. (Bersani et al, 2022)**

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una patologia del motoneurone ed è la principale causa genetica di mortalità infantile. Le terapie per la SMA approvate di recente hanno trasformato una malattia mortale in una malattia reversibile, ma i composti utilizzati mostrano un ampio spettro di risposte cliniche e sono risultati essere efficaci solo se somministrati nelle prime fasi della malattia. Pertanto, sono necessari trattamenti sicuri, adattabili ai sintomi e non invasivi, che abbiano un elevato impatto clinico tra i differenti fenotipi patologici. Sono stati coniugati oligonucleotidi anti-senso con chimica Morfolino (MO) in grado di aumentare i livelli della proteina SMN, a peptidi che penetrano nelle cellule (CPP) per ottenere una migliore distribuzione cellulare. I MO legati ai peptidi r6 e (RXRRBR)2XB, somministrati per via sistemica, hanno attraversato la barriera emato-encefalica e aumentato notevolmente i livelli di proteina SMN, causando un significativo miglioramento della sopravvivenza, della funzionalità neuro-muscolare e della neuropatologia, anche in animali SMA sintomatici. Questo studio dimostra che i MO-CPP coniugati possono ampliare significativamente la finestra terapeutica attraverso una somministrazione sistemica minimamente invasiva, apre la strada alle applicazioni cliniche di questa strategia.

Bersani M, Rizzuti M, Pagliari E, Garbellini M, Saccomanno D, Moulton HM, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

*Cell-penetrating peptide-conjugated Morpholino rescues SMA in a symptomatic preclinical model*. Mol Ther. 2022 Mar 2;30(3):1288-1299. Doi: 10.1016/j.ymthe.2021.11.012. PMID: 34808387.

## **Terapia genica in un paziente con atrofia muscolare spinale di tipo 1. (Costamagna et al, 2022)**

Le terapie molecolari sfruttano la comprensione dei meccanismi patogenetici per ricostituire la funzione genica alterata o per manipolare l'espressione di RNA difettoso. Tali terapie includono l'interferenza dell'RNA mediante l'uso di oligonucleotidi antisenso, la modifica del mRNA mediante piccole molecole e la terapia di sostituzione genica, ovvero la somministrazione intracellulare di acidi nucleici esogeni mediata da virus, per revertire un difetto genetico. Sono state approvate diverse terapie molecolari per il trattamento dell'Atrofia Muscolare Spinale (SMA), una malattia genetica di carattere recessivo causata da alterazioni del gene *SMN1*. La SMA comporta la degenerazione dei motoneuroni inferiori, che causa progressiva debolezza muscolare, ipotonìa e ipotrofia. L'Onasemnogene Abeparvovec è una terapia di sostituzione genica per la SMA che prevede l'utilizzo di un virus adeno-associazio per la veicolazione del cDNA di SMN funzionante nei motoneuroni. Altre due terapie molecolari modulano la trascrizione di *SMN2*: il Nusinersen, un oligonucleotide antisenso, e il Risdiplam, una piccola molecola progettata per modificare l'espressione di mRNA difettosi. La terapia specifica più adatta per la SMA non è ancora stata individuata. In questo lavoro viene descritto il notevole miglioramento clinico di un paziente di 4 mesi affetto da SMA di tipo 1 che ha ricevuto una terapia a base di Onasemnogene Abeparvovec. La conoscenza dei meccanismi dettagliati alla base dei disordini neurologici genetici, in particolare delle condizioni monogeniche, è di fondamentale importanza per sviluppare terapie personalizzate. Quando sono disponibili più terapie che modificano il decorso della patologia, la diagnosi genetica precoce è cruciale per la scelta della terapia appropriata, considerando l'importanza dell'identificazione e dell'intervento tempestivi. Una combinazione di farmaci, ciascuno mirato a patomeccanismi genetici unici, può fornire ulteriori benefici clinici.

Costamagna G, Govoni A, Wise A, Corti S. Bridging the Gap: Gene Therapy in a Patient With Spinal Muscular Atrophy Type 1.

**Neurology.** 2022 Nov 22;99(21):952-956. Doi: 10.1212/WNL.0000000000201294. Epub 2022 Nov 1. PMID: 36319109.

## **Nuove conoscenze nelle malattie dei vasi cerebrali con risoluzione a singola cellula: prospettive patogenetiche e terapeutiche. (Meneri et al, 2022)**

Le malattie cerebrovascolari sono tra le principali cause di morte e disabilità a livello globale. Lo sviluppo di nuovi target terapeutici per malattie cerebrovascolari (come ictus ischemico ed emorragico, o demenza vascolare) è limitato a causa della mancanza di conoscenze della biologia cellulare e molecolare in condizioni fisiologiche e patologiche e dei fattori che causano lesioni alle strutture cerebrovascolari. In questo lavoro viene descritto il ruolo dei progressi della tecnologia omica, e in particolare del sequenziamento dell'RNA, nello studio di profili multiformi e ad alta scala di migliaia di singole cellule del sangue e dei vasi sanguigni con analisi a singola cellula. Queste analisi consentono di studiare l'eterogeneità dei vasi cerebrali malati e delle loro placche aterosclerotiche, compresi il microambiente, la dinamica evolutiva delle cellule e il pathway della risposta immunitaria. Nei modelli animali, il sequenziamento dell'RNA permette di monitorare le singole cellule (comprese cellule immunologiche, endoteliali e muscolari lisce vascolari) che compongono le placche aterosclerotiche e la loro alterazione in contesti sperimentali, come la transizione fenotipica. Viene descritto come la trascrittomica a singola cellula dell'RNA nell'uomo permetta di mappare, a livello molecolare e cellulare, le placche aterosclerotiche nelle arterie cerebrali, monitorando i singoli linfociti e macrofagi, e come questi dati possano aiutare ad identificare nuovi meccanismi immunitari che potrebbero essere usati come bersagli terapeutici per le malattie cerebrovascolari. Gli approcci multi-omici a singola cellula probabilmente forniranno una risoluzione e un'ampiezza di dati senza precedenti necessarie per generare profili cellulari e molecolari clinicamente rilevanti per il trattamento delle malattie cerebrovascolari.

Meneri M, Bonato S, Gagliardi D, Comi GP, Corti S.

*New Insights into Cerebral Vessel Disease Landscapes at Single-Cell Resolution: Pathogenetic and Therapeutic Perspectives.*

**Biomedicines.** 2022 Jul 13;10(7):1693. doi: 10.3390/biomedicines10071693. PMID: 35884997; PMCID: PMC9313091.

**Encefalopatia epatica di nuova diagnosi che si presenta come stato epilettico non convulsivo: caso clinico e revisione della letteratura (Olivero et al, 2022)**

L'encefalopatia epatica è caratterizzata da anomalie psichiatriche e neurologiche, tra cui crisi epilettiche e stato epilettico non convulsivo e convulsivo. La risonanza magnetica cerebrale convenzionale è utile a supporto della diagnosi poiché può rivelare risultati radiologici specifici. In letteratura non esiste una descrizione dell'esordio dell'encefalopatia epatica come stato epilettico non convulsivo. Riportiamo il caso di una donna di 67 anni, senza storia di cirrosi, che presenta uno stato mentale alterato, tomografia computerizzata cerebrale normale ed elettroencefalografia indicativa di attività epilettica. Abbiamo sospettato uno stato epilettico non convulsivo e abbiamo somministrato diazepam e levetiracetam con miglioramento clinico. Pertanto, abbiamo fatto una diagnosi di stato epilettico non convulsivo. Uno studio radiologico con risonanza magnetica cerebrale ha mostrato iperintensità bilaterale sulle sequenze pesate in T1 del globo pallido e iperintensità di entrambi i tratti corticospinali sulle sequenze di recupero dell'inversione attenuate dal fluido pesate in T2. Gli esami del sangue hanno rivelato iperammoniemia, lieve anormalità degli indici di funzionalità epatica e coinfezione da virus dell'epatite B e D cronica. L'elastosonografia epatica suggeriva cirrosi epatica. Il paziente ha iniziato la terapia antivirale con entecavir e la prevenzione dell'encefalopatia epatica con rifaximina e lattulosio; è stata dimessa con uno stato mentale normale. In conclusione l'encefalopatia epatica può presentarsi come manifestazione iniziale con stato epilettico non convulsivo. L'elettroencefalografia è utile per differenziare lo stato epilettico non convulsivo da un episodio di encefalopatia epatica e il neuroimaging aiuta il processo diagnostico.

Olivero M, Gagliardi D, Costamagna G, Velardo D, Magri F, Triulzi F, Conte G, Comi GP, Corti S, Meneri M.

*Newly Diagnosed Hepatic Encephalopathy Presenting as Non-convulsive Status Epilepticus: A Case Report and Literature Review.*

**Front Neurol.** 2022 May 12;13:880068. doi: 10.3389/fneur.2022.880068. PMID: 35645984; PMCID: PMC9133409.

**Pubblicazioni scientifiche su riviste peer-reviewed CORTI**

Taiana M, Govoni A, Salani S, Kleinschmidt N, Galli N, Saladini M, Ghezzi S, Melzi V, Bersani M, Del Bo R, Muehlemann O, Bertini E, Sansone V, Albamonte E, Messina S, Mari F, Cesaroni E, Tiziano FD, Vita G, Sframeli M, Bnn C, Bresolin N, Comi G, Corti S\*, Nizzardo M\*.

*Molecular analysis of SMARD1 patient-derived cells demonstrates that nonsense-mediated impairment mRNA decay is impaired.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry**, 2022 Jan 27:jnnp-2021-326425. ISSN: 00223050 doi: 10.1136/jnnp2021-326425. Epub ahead of print. PMID: 35086940.\*co-last authors. I.F. 13.654.

Contardo M, De Gioia R, Gagliardi D, Comi GP, Ottoboni L, Nizzardo M, Corti S.

*Targeting PTB for Glia-to-Neuron Reprogramming In Vitro and In Vivo for Therapeutic Development in Neurological Diseases.*

**Biomedicines**, 2022 Feb 7;10(2):399. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines10020399. PMID: 35203608. I.F. 4.757.

Rizzuti M, Melzi V, Gagliardi D, Resnati D, Meneri M, Dioni L, Masrori P, Hersmus N, Poesen K, Locatelli M, Biella F, Silipigni R, Bollati V, Bresolin N, Comi GP, Van Damme P, Nizzardo M, Corti S.

Insights into the identification of a molecular signature for amyotrophic lateral sclerosis exploiting integrated microRNA profiling of iPSC-derived motor neurons and exosomes.

**Cell Mol Life Sci**, 2022 Mar 14;79(3):189. ISSN: 1420682X. doi: 10.1007/s00018-022-04217-1. PMID: 35286466. I.F. 9.207.

Gagliardi D, Pagliari E, Meneri M, Melzi V, Rizzo F, Comi GP, Corti S, Taiana M, Nizzardo M. *Stathmins and Motor Neuron Diseases: Pathophysiology and Therapeutic Targets*.

**Biomedicines**, 2022 Mar 19;10(3):711. ISSN 2227-9059. doi: 10.3390/biomedicines10030711. PMID: 35327513. I.F. 4.757.

Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Rizzo F, Moggio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S.

*Clinical and genetic features of a cohort of patients with MFN2-related neuropathy*.

**Sci Rep**, 2022 Apr 13;12(1):6181. ISSN: 20452322. doi: 10.1038/s41598-022-10220-0. PMID: 35418194 1. I.F. 4.996.

Bersani M, Rizzuti M, Pagliari E, Garbellini M, Saccomanno D, Moulton HM, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

*Cell-penetrating peptide-conjugated Morpholino rescues SMA in a symptomatic preclinical model*.

**Mol Ther**. 2022 Mar 2;30(3):1288-1299. doi: 10.1016/j.ymthe.2021.11.012. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34808387 I.F. 12.910..

Abati E, Manini A, Comi GP, Corti S.

*Inhibition of myostatin and related signaling pathways for the treatment of muscle atrophy in motor neuron diseases*.

**Cell Mol Life Sci**, 2022 Jun 21;79(7):374. ISSN: 1420682X doi: 10.1007/s00018-022-04408-w. PMID: 35727341; PMCID: PMC9213329. I.F. 9.207.

Brusati A, Ratti A, Pensato V, Peverelli S, Gentilini D, Dalla Bella E, Sorce MN, Meneri M, Gagliardi D, Corti S, Gellera C, Lauria Pinter G, Ticozzi N, Silani V.

*Analysis of miRNA rare variants in amyotrophic lateral sclerosis and in silico prediction of their biological effects*.

**Front Genet**. 2022 Dec 7;13:1055313. doi: 10.3389/fgene.2022.1055313. eCollection 2022. PMID: 36568378. I.F. 4.772.

Gagliardi D, Rizzuti M, Brusa R, Ripolone M, Zanotti S, Minuti E, Parente V, Dionis L, Cazzaniga S, Bettica P, Bresolin N, Comi G.P., Corti S. Magri F\*, Velardo D\*.

*MicroRNAs as serum biomarkers in Becker Muscular Dystrophy*.

**J Cell Mol Med**, 2022 ISSN: 15821838. doi: 10.1111/jcmm.17462. PMID: 35880500. I.F. 5.295.

10. Costamagna G, Govoni A, Wise A, Corti S.

*Bridging the gap: Gene therapy in a spinal muscular atrophy type 1 patient*.

**Neurology**, 2022 Nov 22;99(21):952-956. doi: 10.1212/WNL.00000000000201294. Epub 2022 Nov 1. PMID: 36319109. I.F. 11.800.

Mercuri E, Deconinck N, Mazzone ES, Nascimento A, Oskoui M, ... Martin C, Fontoura P, Day JW; SUNFISH Study Group (Corti S in the study group).

*Safety and efficacy of once-daily risdiplam in type 2 and non-ambulant type 3 spinal muscular atrophy(SUNFISH part 2): a phase 3, double-blind, randomised, placebo controlled trial*.

**Lancet Neurol**, 2022 Jan;21(1):42-52. ISSN:14744422 doi:10.1016/S1474-4422(21)00367-7. I.F. 59.935.

Cuadros Gamboa AL, Benfante R, Nizzardo M, Bachetti T, Pelucchi P, Melzi V, Arzilli C, Peruzzi M, Reinbold RA, Cardani S, Morrone A, Guerrini R, Zucchi I, Corti S, Ceccherini I, Piumelli R, Nassi N, Di Lascio S, Fornasari D.

*Generation of two hiPSC lines (UMILi027-A and UMILi028-A) from early and late-onset Congenital Central hypoventilation Syndrome (CCHS) patients carrying a polyalanine expansion mutation in the PHOX2B gene.*

Stem Cell Res, 2022 May;61:102781. ISSN: 1873-5061. doi:10.1016/j.scr.2022.102781. PMID: 35421844. I.F. 1.587.

Detering NT, Zambon A, Hensel N, Kothary R, Swoboda K, Gillingwater TH, Baranello G; Workshop participants (Corti S. in the study group);

*Industry participants. 264th ENMC International Workshop: Multi-system involvement in spinal muscular atrophy Hoofddorp, the Netherlands, November 19th - 21st 2021.*

**Neuromuscul Disord.** 2022 Aug;32(8):697-705. doi: 10.1016/j.nmd.2022.06.005. PMID: 35794048. I.F. 3.538.

Maggi L, Bello L, Bonanno S, Govoni A, Caponnetto C, Passamano L, Grandis M, Trojsi F, Cerri F, Gardani A, Ferraro M, Gadaleta G, Zangaro V, Caumo L, Maioli M, Tanel R, Saccani E, Meneri M, Vacchiano V, Ricci G, Sorarù G, D'Errico E, Bortolani S, Pavesi G, Gellera C, Zanin R, Corti S, Silvestrini M, Politano L, Schenone A, Previtali SC, Berardinelli A, Turri M, Verriello L, Coccia M, Mantegazza R, Liguori R, Filosto M, Marrosu G, Tiziano FD, Siciliano G, Simone IL, Mongini T, Comi G, Pegoraro E.

*Adults with spinal muscular atrophy: a large-scale natural history study shows gender effect on disease.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2022 Dec;93(12):1253-1261. doi: 10.1136/jnnp-2022-329320. Epub 2022 Oct 11. PMID: 36220341 I.F. 13.654.

15. Olivero M, Gagliardi D, Costamagna G, Velardo D, Magri F, Triulzi F, Conte G, Comi GP, Corti S, Meneri M.

*Newly Diagnosed Hepatic Encephalopathy Presenting as Non-convulsive Status Epilepticus: A Case Report and Literature Review.*

**Front Neurol.** 2022 May 12;13:880068. ISSN: 16642295. doi: 10.3389/fneur.2022.880068. PMID: 35645984; I.F. 4.086.

Meneri M, Bonato S, Gagliardi D, Comi, GP Corti S.

*New Insights into Cerebral Vessel Disease Landscapes at Single-Cell Resolution: Pathogenetic and Therapeutic Perspectives*

**Biomedicines**, 2022, 2022 Jul 13;10(7):1693 ISSN 2227-9059. PMID: 35884997 I.F. 4.757.

### **In collaborazione con Laboratorio biochimica e genetica**

Zanotti S, Magri F, Poggetti F, Ripolone M, Velardo D, Fortunato F, Ciscato P, Moggio M, Corti S, Comi GP, Sciacco M.

*Immunofluorescence signal intensity measurements as a semi-quantitative tool to assess sarcoglycan complex expression in muscle biopsy.*

**Eur J Histochem.** 2022 Sep 1;66(3):3418. doi: 10.4081/ejh.2022.3418. PMID: 36047345I.F. 1.966.

Manini A, Meneri M, Rodolico C, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Ronchi D. Case Report: Thymidine Kinase 2 (TK2) Deficiency:

*A Novel Mutation Associated with Childhood-Onset Mitochondrial Myopathy and Atypical Progression.*

**Front Neurol.** 2022 Feb 25;13:857279. ISSN: 16642295. doi: 10.3389/fneur.2022.857279. PMID: 35280287. I.F. 4.086.

Manini A, Abati E, Nuredini A, Corti S, Comi GP.

*Adeno-Associated Virus (AAV)-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: The Issue of Transgene Persistence.*

**Front Neurol**, 2022 Jan 5;12:814174. doi: 10.3389/fneur.2021.814174. ISSN: 16642295 PMID: 35095747. I.F. 4.086.

Manini A, Abati E, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Mitochondrial DNA Homeostasis Impairment and Dopaminergic Dysfunction: A Trembling Balance.*  
**Ageing Res Rev**, 2022 Apr;76:101578. ISSN: 15681637. doi: 10.1016/j.arr.2022.101578. PMID: 35114397. I.F. 11.788.

Manini A, Caporali L, Meneri M, Zanotti S, Piga D, Arena G, Corti S, Toscano A, Comi GP, Musumeci O, Carelli V, Ronchi D.

*Case Report: Rare Homozygous RNASEH1 Mutations Associated with Adult-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy and Multiple Mitochondrial DNA Deletions.*

**Front Genet**, 31 May 2022. ISSN: 16648021 doi.org/10.3389/fgene.2022.906667. I.F. 4.772

Manini A, Velardo D, Ciscato P, Cinnante C, Moggio M, Comi G, Corti S, Ronchi D.

*Expanding the phenotypic spectrum of vocal cord and pharyngeal weakness with distal myopathy (VCPDM) due to the p.S85C MATR3 mutation.*

**Neurol Genet**, 2022 Jul 6;8(4):e200006. ISSN: 2376-7839. MS ID#: NG/2021/017284, doi: 10.1212/NXG.000000000000200006. PMID: 35812165; PMCID: PMC9258980. I.F. 3.663.

Magri F, Zanotti S, Salani S, Fortunato F, Ciscato P, Gerevini S, Maggi L, Sciacco M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D.

*Antisense morpholino-based in vitro correction of a pseudoexon-generating mutation in the SGCB gene.* **Int.**

**J. Mol. Sci.**, 2022, 23(17), 9817; ISSN: 16616596. Doi: 10.3390/ijms23179817 I.F. 6.208.

Manini A, Gagliardi D, Meneri M, Antognozzi S, Del Bo R, Scaglione C, Comi GP, Corti S, Ronchi D.

*Analysis of HTT CAG repeat expansion in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022 Nov;9(11):1820-1825. doi: 10.1002/acn3.51673. Epub 2022 Oct 25. PMID: 36285345 I.F. 5.430.

Magri F, Antognozzi S, Rapolone M, Zanotti S, Napoli L, Ciscato P, Velardo D, Scuvera G, Nicotra V, Giacobbe A, Milani D, Fortunato F, Garbellini M, Sciacco M, Corti S, Comi GP, Ronchi D.

*Megaconial congenital muscular dystrophy due to novel CHKB variants: a case report and literature review.*

**Skelet Muscle**. 2022 Sep 29;12(1):23. doi: 10.1186/s13395-022-00306-8. PMID: 36175989 I.F. 5.063.

Magri F, Zanotti S, Salani S, Fortunato F, Ciscato P, Gerevini S, Maggi L, Sciacco M, Moggio M, Corti S, Bresolin N, Comi GP, Ronchi D.

*Antisense Morpholino-Based In Vitro Correction of a Pseudoexon-Generating Variant in the SGCB Gene.*

**Int J Mol Sci.** 2022 Aug 29;23(17):9817. doi: 10.3390/ijms23179817. PMID: 36077211 I.F. 6.208.

Fumagalli M, Ronchi D, Bedeschi MF, Manini A, Cristofori G, Mosca F, Dilena R, Sciacco M, Zanotti S, Piga D, Ardissino G, Triulzi F, Corti S, Comi GP, Salvati L.

*A novel RRM2B mutation associated with mitochondrial DNA depletion syndrome.*

**Mol Genet Metab Rep**, 2022 Jun 18;32:100887. ISSN: 2214-4269. doi: 10.1016/j.ymgmr.2022.100887. PMID: 35756861; PMCID: PMC9218228 I.F. 2.082.

## **Abstract presentati a congressi scientifici internazionali**

Rizzuti M, Nizzardo M, Salani S, Melzi V, Brambilla L, Marcuzzo S, Magri S., Mariotti C, Cordigliero C, Di Fonzo A, Comi GP, Taroni F, Corti S.

*An integrated approach for investigating the pathomechanisms underlying neurodegeneration in SCA2 and MSA-C.*

**Neuroscience 2022, 12-16/11/2022 San Diego, CA, USA.**

Galli N, Rizzuti M, Lorenzo B, Ongaro J, Nizzardo M, Comi G, Corti S.

*OMIC characterization of iPSC-derived spinal cord organoids to define new disease-associated genes/pathways in C9ORF72 form of Amyotrophic Lateral Sclerosis.*

**Neuroscience 2022, 12-16/11/2022 San Diego, CA, USA.**

Rinchetti P, Faravelli I, Tambalo M, Mancinelli S, Mapelli L, D'angelo A, Rizzuti M, D'angelo E, Bresolin N, Comi GP, Lotti F, Przedborski S, Lodato S, Nizzardo M, Corti S.

*Spinal Muscular Atrophy CNS organoids unravel developmental disease signatures reverted by peptide oligonucleotide conjugates.*

**Neuroscience 2022, 12-16/11/2022 San Diego, CA, USA.**

Rizzuti M, Melzi V, Gagliardi D, Meneri M, Masrori P, Hersmus N, Poesen K, Bresolin N, Comi GP, Van Damme P, Nizzardo M, Corti S.

*Insights for the identification of a molecular signature for ALS exploiting integrated miRNA profiling of iPSC-derived motor neurons and exosomes.*

**ENCALS meeting 2022, 1-3/6/2022, Edinburgh, Scotland.**

Nizzardo M, Taiana M, Galli N, Rizzuti M, Bersani M, Biella F, Anastasia A, Ottoboni L, Comi G, Corti S.

*Human iPSC-derived motor neurons and spinal cord organoids to model C9orf72 ALS.*

**ENCALS meeting 2022, 1-3/6/2022, Edinburgh, Scotland.**

Sierra Delgado JA, LikhiteS , McGovern V, Holbrook S, Huffenberger A, Ray SS, Chung D, Stefanik LS, Baird M, Schwartz M, Hicks A, Nizzardo M, Corti S, Burghes A, Arnold WD, Cox G, Meyer K  
*Evaluation of AAV9 gene therapy for SMARD/CMT2S in different mouse models reveal differences in efficacy dependent on promoter choice.*

**ASGCT 25<sup>th</sup> Annual Meeting, 16-19/5/2022, Washington DC, USA.**

La Rocca F, Santonicola P, Cieri F, Zampi G, Nizzardo M, Corti S, Di Schiavi E.

*hnRNQ/hrpr-1 and RTN/ret-1 role in splicing and neurodegeneration.*

**CeNEuro 2022, 24-27/7/2022, Vienna, Austria.**

Pagliari E, Rizzo F, Taiana M, Melzi V, Garbellini M, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

*Unravelling the role of Stathmin-2 in SMA motor neurons vulnerability and as therapeutic target. 3<sup>rd</sup> International Congress on Spinal Muscular Atrophy, 21-23/10/2022, Barcellona, Spagna.*

La Rocca F, Santonicola P, Cieri F, Zampi G, Nizzardo M, Corti S, Di Schiavi E.

*hnRNP Q/hrpr-1 rescues neurodegeneration via RTN/ret-1 in a C. elegans SMA model. 3<sup>rd</sup> International Congress on Spinal Muscular Atrophy, 21-23/10/2022, Barcellona, Spagna.*

Rizzuti M, Bersani M, Pagliari E, Garbellini M, Saccomanno D, Bresolin N, Comi GP, Corti S, Nizzardo M.

*CPP-Morpholino conjugates rescue symptomatic Spinal Muscular Atrophy. 3<sup>rd</sup> International Congress on Spinal Muscular Atrophy, 21-23/10/2022, Barcellona, Spagna.*

Rinchetti, Faravelli, Tambalo, Mancinelli S, Mapelli L, Rizzuti M, D'angelo E, Bresolin N, Comi GP, Lodato S, Nizzardo M, Corti S.

*Human Spinal Cord like Organoids (hSCOs) as a new model to study Spinal Muscular Atrophy.* 3rd International Congress on Spinal Muscular Atrophy, 21-23/10/2022, Barcellona, Spagna.

Abati E, Manini A, Velardo D, Del Bo R, Napoli L, Federica R, Maurizio M, Bresolin N, Bellone E, Bassi MT, D'Angelo MG, Comi GP, Corti S.

*Expanding the genetic and phenotypic spectrum of CMT2A: clinical features and the novel p.K357E mutation in a cohort of patients with MFN2-related neuropathy.*

**17th International Congress on Neuromuscular Diseases** (ICNMD 2022), 5-9/7/2022, Bruxel, Belgio.

### **Abstract presentati a congressi scientifici nazionali**

Abati E, Bono S, Ruepp MD, Salani S, Ottoboni L, Melzi V, Cordigliero C, Pagliarani S, Roberta De Gioia R, Anastasia A, Taiana M, Garbellini M , Lodato S, Kunderfranco P, Cazzato D, Cartelli D, Lonati C, Bresolin N, Comi GP, Nizzardo M, Corti S, Rizzo F.

*Combined RNA interference and gene replacement therapy targeting MFN2 for the treatment of Charcot-Marie-Tooth type 2A.*

**XXII Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia** (AIM), 19-22/10, Matera.

Ottoboni L,

*Biomarkers and Big data Analysis.*

**XXII Congresso Nazionale Associazione Italiana di Miologia** (AIM), 19-22/10, Matera

Mei C, Magliocca V, Nizzardo N, Chen X, Gray S, Tartaglia M, Bertini E, Corti S, Compagnucci C. *New insight for Riboflavin Transporter Deficiency (RTD) Syndrome: gene therapy as a new therapeutic strategy for RTD patients*

**Presentazione orale, BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,** 28-30/9/2022 Roma.

Manzini P, Pagliari E, Ferrero G, Garbellini M, Taiana M, Rizzo F, Corti S, Nizzardo M.

*Stathmin-2 in Spinal Muscular Atrophy (SMA): assessing molecular and therapeutic role in SMA human and murine model.*

**BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,** 28-30/9/2022 Roma.

Galli N, Rizzuti M, Lorenzo B, Ongaro J, Cordigliero C, Nizzardo M, Corti S.

*OMIC characterization of patient-derived spinal cord-like organoids to unravel new therapeutic targets in C9ORF72 form of Amyotrophic Lateral Sclerosis.*

**BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,** 28-30/9/2022 Roma.

Abati E, Bono S, Ruepp MD, Salani S, Ottoboni L, Melzi V, Cordigliero C, Pagliarani S, Roberta De Gioia R, Anastasia A, Taiana M, Garbellini M , Lodato S, Kunderfranco P, Cazzato D, Cartelli D, Lonati C, Bresolin N, Comi GP, Nizzardo M, Corti S, Rizzo F.

*Combined RNA interference and gene replacement therapy targeting MFN2 for the treatment of Charcot-Marie-Tooth type 2A.*

**Presentazione orale, BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,** 28-30/9/2022 Roma.

Pagliari E, Anastasia A, Garbellini M, Bellandi F, Rinchetti P, Melzi V, Taiana M, Comi GP, Corti S, Nizzardo M. Presentazione orale.

*Optimization of AAV9 gene therapy for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress type 1 using in vivo disease model.* Presentazione orale,

**BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,** 28-30/9/2022 Roma.

Gagliardi D, D'Angelo A, Rinchetti P, Cordigliero C, Comi GP, Nizzardo M, Corti S.  
*Exploiting three-dimensional in vitro models to identify early neuronal vulnerability and test therapeutic strategies in amyotrophic lateral sclerosis.*

**Presentazione orale, BraYn 5th Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists,**  
28-30/9/2022 Roma.

Galli N, Rizzuti M, Lorenzo B, Ongaro J, Nizzardo M, Comi G, Corti S. *OMIC characterization of patient derived spinal cord organoids to unravel new therapeutic targets in C9ORF72 form of Amyotrophic Lateral Sclerosis.* Convegno ARISLA 2022. 3-4/11/2022, Milano.

Ongaro J, Quetti L, Ottoboni L, Contardo M, De Gioia R, Melzi V, Brambilla L, Abati E, Rizzo F, M. Nizzardo M, Corti S, Comi GP.

*Targeting upper motor neurons: a novel neural stem cell therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis.*  
**Convegno ARISLA** 2022. 3-4/11/2022, Milano.

Gagliardi D, Manini A, Meneri M, Antognozzi S, Del Bo R, Comi GP, Corti S, Ronchi D.  
*Analysis of HTT CAG and NOTCH2NLC GCC repeat expansions in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**52° Congresso Società Italiana di Neurologia (SIN),** 3-6/12/2022, Milano.

#### **Collaborazioni scientifiche in atto con istituti nazionali ed internazionali**

**RISE CROSS-NEUROD** — Transferring autonomous and non autonomous cell degeneration 3D models between EU and USA for development of effective therapies for neurodegenerative diseases (ND),

**Columbia University, NY, USA**, Prof. S. Przedborski, director of the Center, and Prof. D. Re.

Prof. Kathrin Mayer, Ph.D, Professore Associato,

*“Studio di nuovi approcci di terapia genica per l’Atrofia Muscolare Spinale (SMA) e l’atrofia muscolare spinale con Distress Respiratorio (SMARD1)”*,

**The Research Institute at Nationwide Children’s Hospital/ The Ohio State University, Center for Gene Therapy, Columbus, Ohio, USA.**

Prof. Eva Hedlund, PhD,

*“Identificazione di molecole con un ruolo neuroprotettivo nelle malattie del motoneurone”*,

**Department of Biochemistry and Biophysics, University of Stockholm, Sweden..**

Prof. H. Moulton

*“Studio di oligonucleotidi coniugati con peptidi per lo sviluppo di una strategia terapeutica della SMA”*,

**Oregon University.**

*“Basi Molecolari della Sclerosi Laterale Amiotrofica”*

**SLAGEN consortium.**

*“European ALS population study”*,

**EURALS Consortium.**

*“Sviluppo di una strategia terapeutica per mitofusinopatie”*

**in collaborazione con l’Associazione Mitofusina 2**

**(<http://www.progettomitofusina2.com/it/associazione>).**

Dr. Uberto Pozzoli  
“Basi molecolari della SMA”  
**IRCCS E. Medea Bosisio, Parini, Italia.**

Prof F. Feiguin,  
“Studio dei meccanismi patogenetici e di possibili approcci terapeutici in *Drosophila* in comparazione con modelli umani”,  
**Centre for Genetic Engineering and Biotechnology Trieste.**

Prof S. Barabino  
ALS molecular therapy exploiting integrated small RNAs analysis of patient-derived induced pluripotent stem cells  
**Università degli Studi di Milano-Bicocca.**

Dr. Bernasconi e Dr. Marcuzzo,  
“MicroRNA profiling in iPSCs from an infantile ascending hereditary spastic paralysis patient reveals miR-376a, miR-432 and miR-451a involvement in neuronal differentiation: possible implications for motor neuron disease pathogenesis”,  
**Istituto Neurologico Besta.**

Dr. Di Schiavi  
“C. Elegans per lo studio di modificatori genetici della SMA e della SLA”,  
**CNR di Napoli.**

Prof. Antonia Ratti,  
**Department of Neurology - Stroke Unit and Laboratory of Neuroscience, Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Milano.**

Prof. Jeroen Pasterkamp,  
**Department of Translational Neuroscience, UMC Utrecht.**

Prof. Michela Deleidi,  
**Institut Imagine, Parigi, Francia**

Prof. Philip Van Damme,  
**University of Leuven.**

Prof. Stefano Stifani,  
**Montreal Neurological Institute of McGill University, Canada.**

Prof. Francesco Lotti, PhD, Assistant Professor,  
**Center for Motor Neuron Biology and Disease, Columbia University Medical Center, New York, NY 10032, USA.**

Prof. Valentina Bollati,  
**Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Milano.**

Dr. Simona Lodato,  
**Humanitas Research Center, Milano.**

Prof. Diego Fornasari,  
**Dipartimento di Biotecnologie Mediche Traslazionali, Università degli Studi di Milano**

Dr. Marisa Cappella  
**Centre De Recherche En Myologie, Parigi, Francia,**

## **Finanziamenti per progetti di ricerca ottenuti da enti pubblici o privati**

1. Fondazione Regionale per la Ricerca Biomedica (FRRB) (2020-2023). An integrated omics approach for patients with rare neurological disorders: towards personalized clinical care and trial readiness (Care4NeuroRare).
2. SwanBio Therapeutics (2020-2023). Sponsored research agreement on MFN2 gene therapy development.
3. Roche no profit Grant (2023-2025). Unravelling Risdiplamn therapeutic effect on SMA 3D human stem cell neuromuscular unit.
4. Italfarmaco spa, contratto di ricerca commissionata (2021-2023). La caratterizzazione di inibitori di HDAC-6 in modelli *in vitro* e *in vivo* di CMT2A.
5. Progetto Bando Interno Policlinico (2022-2025). 3D modelling of neuromuscular unit to discover pathogenetic mechanisms and therapeutics for motor neuron diseases.
6. Progetto5X1000 Policlinico (2023). Il ruolo del microcircolo nelle malattie neurologiche.
7. Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata (2018-2023). “Novel stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis targeting upper motor neurons” (RF-2016-02362317).
8. Fondazione Cariplo (2022-2024). “Stathmin-2 in Spinal Muscular Atrophy (SMA): assessing molecular and therapeutic role in SMA human and murine models” (2020-3623).
9. Unione Europea H2020-MSCA-RISE 2017 (2017-2023). “Transferring autonomous and nonautonomous cell degeneration 3D models between EU and USA for development of effective therapies for neurodegenerative diseases (ND) CROSS-NEUROD. HORIZONPEOPLE-2017-RISE.
10. Erare grant (2019-2023). INTEGRative multi-OMICs approaches on iPSCderived 2D and 3D models to elucidate the role of immune and energy metabolism-related genes/pathways in Amyotrophic Lateral Sclerosis (INTEGRALS).
11. Telethon (2019-2023). “Knockdown and Replacement of MFN2: a Gene Therapy to treat Dominantly Inherited Peripheral Neuropathy CMT2A”.
12. Ministero della salute, Ricerca Finalizzata. (2018-2024). “3D human models to identify early neuronal vulnerability as a therapeutic target for ALS” (RF-2018-12366357 TE).
13. Ministero della Salute, Ricerca Finalizzata (2020-2024). “Unravelling combined RNA interference and gene therapy *in vitro* and *in vivo* disease models as a potential therapeutic strategy for CMT2A” (GR-2018-12365358).
14. Fondazione Regionale per la Ricerca Biomedica (FRRB) (2022-2025). Multiomics profiling of patient specific models to predict druggable targets in severe neuromuscolare rare diseases (REMODEL).
15. Ministero dell’Universita’ e della Ricerca, PNRR-CN3. (2023-2026). Targeting c9Orf72-G4C2 repeats to mitigate c9ORF72 and ATNX2 RNA toxicity () .
16. Ministero della Salute, Finanziamento nazionale M6/C2 PNRR-PoC. (2023-2025). Targeting miR129 as therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis (2022-12375645).

## **Titolarità di brevetti**

1. Titolarità di Brevetto Internazionale: "Inhibitor of miR-A and uses thereof" (n°102019000004571). Brevetto congiunto UNIMI/UNIMB/IRCCS Foundation Ca' Granda "Antisense composition and method for treating motor neuron diseases": Il brevetto prevede la sintesi di nuovi oligonucleotidi contro specifici miRNA per lo sviluppo di strategie terapeutiche per le malattie neurologiche. Il brevetto nel 2021 è stato selezionato per la fase di potenziamento e mentorship con il progetto "Cell Penetrating peptide-coniugato a morfolino per malattie del motoneurone" all'interno del programma SEED4INNOVATION - S4I, Università degli Studi di Milano. Inoltre, nel 2022 Finalista dell'Intellectual Property Award (IPA) 2021, categoria LifeScience, promosso dal Ministero dello Sviluppo Economico, con il brevetto "Inhibitor of miR-A and uses thereof" (n°102019000004571).
2. Titolarità di Brevetto Internazionale: "AAV Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy with Respiratory Distress Type I (SMARD1) and Charcot-Marie-Tooth Disease 2S (CMT2S) caused by mutations in the IGHMBP2 Gene" (PCT/US2020/061863), brevetto congiunto tra UNIMI/Fondazione IRCCS Ca' Granda e Research Institute at Nationwide Children's Hospital. Il brevetto prevede la sintesi di nuovi costrutti virali che possano veicolare geni corretti per patologie genetiche quali SMARD1 e CMT2S. Trial clinico: NCT05152823.



## **CENTRO PARKINSON ED ALTRI DISTURBI DEL MOVIMENTO**

### **PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2022**

#### **RESPONSABILE:**

Dr. Alessio Di Fonzo

#### **MEDICI:**

Dr.ssa Giulia Franco

Dr.ssa Ilaria Trezzi

Dott. Emanuele Frattini

Dott. Edoardo Monfrini

Dr.ssa Federica Arienti

Dr.ssa Giulia Lazzeri

Dott. Mattia Tosi

Dott. Alessandro Di Maio

Dott. Vidal Yahya

#### **BIOLOGI:**

Dr.ssa Manuela Magni

Dott. Fabio Biella

#### **STUDY COORDINATOR:**

Paolo Varuzza

## **Attività e progetti di ricerca**

Nel corso dell'anno 2022 le attività del gruppo di ricerca dedicato alla malattia di Parkinson ed altri disturbi del movimento si sono focalizzate sulle sperimentazioni di nuove terapie per la malattia di Parkinson e per l'Atrofia Multisistemica, e sulla ricerca di base dei meccanismi molecolari genetici e cellulari mirati sottostanti i disordini del movimento.

Sono in corso studi osservazionali promossi dalla National Parkinson Foundation (Parkinsons' Outcome Project) con lo scopo di valutare aspetti clinico-assistenziali, la storia naturale della malattia di Parkinson e la qualità di vita dei pazienti. È stato concluso uno studio AIFA che studia la differenza di genere nei pazienti affetti da Malattia di Parkinson in relazione all'introduzione in terapia di Levodopa.

Sono continuati e hanno portato a importanti pubblicazioni tre studi osservazionali multicentrici volti alla creazione di registri nazionali e internazionali sulle patologie Paralisi Sopranucleare Progressiva, Tremore e Idrocefalo Normoteso. Infine, è stato concluso lo studio osservazionale per valutare l'impatto di un farmaco inibitore delle monoamino ossidasi sulla qualità di vita e sulla sintomatologia dolorosa nei pazienti affetti da Malattia di Parkinson.

Si sono raggiunti importanti traguardi nello studio degli aspetti genetici delle distonie, che hanno portato a diverse pubblicazioni su riviste eccellenti nell'ambito della neurologia. Grazie a queste collaborazioni è stato possibile applicare e vincere un bando europeo olto competitivo sulle forme di Distonie Rare, di cui il nostro centro è Coordinatore. Anche gli studi sugli aspetti genetici della malattia di Parkinson hanno avuto grande risonanza nel 2022, grazie collaborazione d'istituti a carattere nazionale e internazionale, con lo scopo di individuare nuove mutazioni genetiche sia nelle forme giovanili sia in quelle adulte della malattia, e di consentire una migliore caratterizzazione dei fenotipi associati a determinati fattori di rischio genetico. Il responsabile del team ha coordinato il gruppo di genetica del progetto PARKENT3 delle reti IRCCS. Inoltre, è partito un ulteriore studio promosso dagli istituti virtuali delle Neuroscienze, volto a valutare i Biomarcatori plasmatici e genetici nei soggetti con malattie neurodegenerative. Il nostro centro, in questo progetto, è coordinatore di un workpackage inerente la genetica, in particolare si occuperà di valutare l'impatto delle varianti rare dei geni nella neuroinfiammazione nel predisporre i soggetti a forme più o meno gravi di degenerazione neuronale.

## **Studi sui modelli cellulari di neurodegenerazione**

Nel 2022 sono stati portati avanti progetti di ricerca focalizzati sull'impiego di modelli cellulari derivati da cellule staminali pluripotenti indotte per lo studio della malattia di Parkinson e dei parkinsonismi e ne sono stati avviati di nuovi nell'ambito di collaborazioni. In particolare, la Dott.ssa Trezzi ha proseguito lo studio focalizzato sul ruolo del recettore del glutammato nella malattia di Parkinson associata a mutazioni del gene Parkina, per cui sono attualmente in corso le analisi conclusive sui campioni raccolti (organoidi mesencefalici, colture 2D di neuroni e astrociti). Il dr. Biella ha coordinato come lab manager tutta l'attività di coordinamento dei reagenti e delle culture cellulari. La Dott.ssa Magni e il Dott. Frattini hanno avviato uno studio su organoidi striatali di pazienti affetti da atrofia multisistemica volto alla riproduzione della patologia di alfa sinucleina in questo innovativo modello. Infine, è iniziato il progetto di collaborazione, coordinato dalla Prof. Arianna Bellucci dell'Università di Brescia e finanziato dalla Michael J. Fox Foundation, su organoidi mesencefalici di malattia di Parkinson con mutazioni nel gene alfa sinucleina e che ha come obiettivo lo screening di molecole sperimentali che agiscono sugli aggregati patologici di alfa sinucleina.

## **Trials Clinici e Farmacologici**

Nel corso dell'anno 2022 le attività del gruppo di ricerca dedicato alla malattia di Parkinson ed altri disturbi del movimento ha partecipato a diverse sperimentazioni per la malattia di Parkinson e per i parkinsonismi. In particolare, si è concluso lo studio di fase III M-STAR - BHV-3241 (Biohaven) che prevedeva la somministrazione di un farmaco inibitore della mieloperossidasi

(Verdiperstat) in pazienti affetti da atrofia multisistemica (MSA), per il quale il nostro centro ha reclutato 18 pazienti. E' stato portato avanti lo studio ASTORIA (Contera), uno studio su pazienti affetti da malattia di Parkinson e discinesia da moderata a grave per valutare l'efficacia e la sicurezza/tollerabilità di due combinazioni di dose di JM-010 (buspirone e zolmitriptan). È stato iniziato lo studio multinazionale in aperto di fase IV ADOPTION, volto a valutare l'effetto aggiuntivo di 50 mg di opicapone o 100 mg di levodopa come prima strategia per il trattamento del fenomeno wearing-off in pazienti affetti da malattia di Parkinson

Il nostro gruppo ha partecipato a tre studi osservazionali. In particolare, il primo studio è promosso dal Centro per le Malattie neurodegenerative dell'A.O.U. Ruggi d'Aragona di Salerno che ha portato alla creazione di un registro nazionale su disordini del movimento rari (Paralisi Sopranucleare Progressiva) e tremori. È proseguito lo studio AIFA sui predittori di sviluppo di fluttuazioni motorie/non motorie e discinesie in relazione al genere nella malattia di Parkinson. E' stato portato a termine lo studio Z7219N04, studio osservazionale multicentrico volto a confrontare l'efficacia di safinamide, rasagilina e altra "terapia standard" come terapia aggiuntiva a levodopa (L-dopa) in pazienti affetti da malattia di Parkinson (MP) fluttuanti.

### **Finanziamenti e grants**

EJP-RD Joint Transnational Call for proposals 2022. European Grant for rare Diseases 2022  
"PreDYT: PREdictive biomarkers in DYsTonia: defining the paradigm of monogenic dystonia to implement the diagnosis and prognosis of undiagnosed forms" Total Funds: 1,571,449

Ricerca corrente Reti IRCCS 2022: Genetic and biological markers in neurodegenerative diseases: focus on cognitive decline and inflammation.

Michael J Fox Foundation: Progetto "Testing MPH as a novel neuroprotective therapy in pre-clinical models of Parkinson's Disease"

### **Collaborazioni scientifiche**

È stata avviata una collaborazione con il Prof. Michael Zech dell'Università di Monaco per un progetto di ricerca volto allo studio di modelli cellulari avanzati di forme genetiche di distonia e finanziato dal programma europeo sulle malattie rare EJP RD. Nell'ambito dei progetti sugli organoidi mesencefalici per lo studio della malattia di Parkinson, sono proseguiti i progetti di collaborazione con i laboratori del Prof. Thomas Wisniewski della New York University per la caratterizzazione neuropatologica dei modelli 3D e con il gruppo della Prof.ssa Arianna Bellucci dell'Università di Brescia per l'identificazione delle forme aggregate di alfa sinucleina. È in corso una collaborazione con l'Università di Grenoble (Prof.ssa Elena Moro) per lo studio genetico di pazienti affetti da distonia e disturbi del movimento rari.

### **Attività di assistenza**

L'attività clinico assistenziale è stata implementata sia in termini di gestione dei pazienti ricoverati nell'Unità Operativa di Neurologia, sia in termini implementate, nonostante la coda con ancora impatto significativo dell'emergenza COVID. E' stato rinnovato il sostegno da parte della Fresco Institute Center of Excellence, che sostiene le attività di ricerca a assistenziale di due persone del team di ricerca, la Dr.ssa Franco e il Dr. Frattini, che insieme alla dr.ssa Trezzi e al dr. Monfrini nel corso del 2022 si sono dedicati a implementare gli ambulatori dedicati alle persone con m. di Parkinson studi sui disturbi del movimento. Altri due ambiti di ricerca clinica sono stati condotti dal team, in particolare dalla dr.ssa Arienti che ha coordinato uno studio nazionale multacentrico sulla famigliarità nella malattia di Parkinson, e dalla dr.ssa Lazzeri che ha collaborato con il gruppo di internisti specializzati nello studio della disautonomia per studiare gli aspetti disautonomici della malattia di Parkinson e della MSA.

## Lavori scientifici

Consonni A, Miglietti M, De Luca CMG, Cazzaniga FA, Ciullini A, Dellarole IL, Bufano G, Di Fonzo A, Giaccone G, Baggi F, Moda F.

*Approaching the Gut and Nasal Microbiota in Parkinson's Disease in the Era of the Seed Amplification Assays*

**Brain Sci.** 2022 Nov 19;12(11):1579. doi: 10.3390/brainsci12111579. Consonni A Brain Sci

Percetti M, Monfrini E, Caporali L, Minardi R, Carelli V, Valente EM, Di Fonzo A.

*Reply to: No Association between Rare TWNK Variants and Parkinson's Disease in European Cohorts*

**Mov Disord.** 2022 Nov;37(11):2319-2320. doi: 10.1002/mds.29244. Percetti M Mov Disord

Weiss S, Adolph RS, Schweimer K, DiFonzo A, Meleshin M, Schutkowski M, Steegborn C. Molecular Mechanism of Sirtuin 1 Modulation by the AROS Protein

**Int J Mol Sci.** 2022 Oct 23;23(21):12764. doi: 10.3390/ijms232112764. Weiss S Int J Mol Sci

Yahya V, Spagnolo F, Di Maggio G, Leopizzi E, De Marco P, Fortunato F, Comi GP, Rini A, Monfrini E, Di Fonzo A.

*Juvenile-onset dystonia with spasticity in Leigh syndrome caused by a novel NDUFA10 variantParkinsonism*

**Relat Disord.** 2022 Nov;104:85-87. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.10.016. Epub 2022 Oct 14. Yahya V Parkinsonism Relat Disord

Erro R, Pilotto A, Magistrelli L, Olivola E, Nicoletti A, Di Fonzo A, Dallocchio C, Di Biasio F, Bologna M, Tessitore A, De Rosa A, Gigante AF, Esposito M, Moschella V, di Biase L, Valentino F, Russo M, Contaldi E, Modugno N, Padovani A, Barone P;

*TITAN Study Group.Parkinsonism A Bayesian approach to Essential Tremor plus: A preliminary analysis of the TITAN cohort*

**Relat Disord.** 2022 Oct;103:73-76. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.08.030. Epub 2022 Aug 29.

Erro R Parkinsonism Relat Disord

Riboldi GM, Vialle RA, Navarro E, Udine E, de Paiva Lopes K, Humphrey J, Allan A, Parks M, Henderson B, Astudillo K, Argyrou C, Zhuang M, Sikder T, Oriol Narcis J, Kumar SD, Janssen W, Sowa A, Comi GP, Di Fonzo A, Crary JF, Frucht SJ, Raj T.

Transcriptome deregulation of peripheral monocytes and whole blood in GBA-related Parkinson's disease

**Mol Neurodegener.** 2022 Aug 17;17(1):52. doi: 10.1186/s13024-022-00554-8. Riboldi GM Mol Neurodegener

Lunghi G, Carsana EV, Loberto N, Cioccarelli L, Prioni S, Mauri L, Bassi R, Duga S, Straniero L, Asselta R, Soldà G, Di Fonzo A, Frattini E, Magni M, Liessi N, Armirotti A, Ferrari E, Samarani M, Aureli M.

*β-Glucocerebrosidase Deficiency Activates an Aberrant Lysosome-Plasma Membrane Axis Responsible for the Onset of Neurodegeneration*

**Cells.** 2022 Jul 29;11(15):2343. doi: 10.3390/cells11152343. Lunghi G Cells

Mameli F, Zirone E, Capetti B, Mellace D, Ferrucci R, Franco G, Di Fonzo A, Barbieri S, Ruggiero F.

*Changes in non-motor symptoms in patients with Parkinson's disease following COVID-19 pandemic restrictions: A systematic review*

**Front Psychol.** 2022 Jul 22;13:939520. doi: 10.3389/fpsyg.2022.939520. eCollection 2022. Mameli F Front Psychol

Lang AE, Siderowf AD, Macklin EA, Poewe W, Brooks DJ, Fernandez HH, Rascol O, Giladi N, Stocchi F, Tanner CM, Postuma RB, Simon DK, Tolosa E, Mollenhauer B, Cedarbaum JM, Fraser K, Xiao J, Evans KC, Graham DL, Sapir I, Inra J, Hutchison RM, Yang M, Fox T, Budd Haeberlein S, Dam T; SPARK Investigators.

*Trial of Cinpanemab in Early Parkinson's Disease*

**N Engl J Med.** 2022 Aug 4;387(5):408-420. doi: 10.1056/NEJMoa2203395. Lang AE N Engl J Med

Dilena R, Mauri E, Di Fonzo A, Bana C, Ajmone PF, Rigamonti C, Catenio T, Gangi S, Striano P, Fumagalli M.

*Case Report: Effect of Targeted Therapy With Carbamazepine in KCNQ2 Neonatal Epilepsy*

**Front Neurol.** 2022 Jul 14;13:942582. doi: 10.3389/fneur.2022.942582. eCollection 2022.

Dilena R Front Neurol

Massironi A, Di Fonzo A, Bassanini I, Ferrandi EE, Marzorati S, Monti D, Verotta L.

*Selective Supercritical CO<sub>2</sub> Extraction and Biocatalytic Valorization of Cucurbita pepo L. Industrial Residuals*

**Molecules.** 2022 Jul 26;27(15):4783. doi: 10.3390/molecules27154783. Massironi A Molecules

Di Fonzo A, Albanese A, Jinnah HA.

*The apparent paradox of phenotypic diversity and shared mechanisms across dystonia syndromes*

**Curr Opin Neurol.** 2022 Aug 1;35(4):502-509. doi: 10.1097/WCO.0000000000001076. Epub 2022 Jul 5. Di Fonzo A Curr Opin Neurol

Kedariti M, Frattini E, Baden P, Cogo S, Civiero L, Ziviani E, Zilio G, Bertoli F, Aureli M, Kaganovich A, Cookson MR, Stefanis L, Surface M, Deleidi M, Di Fonzo A, Alcalay RN, Rideout H, Greggio E, Plotegher N.

*LRRK2 kinase activity regulates GCase level and enzymatic activity differently depending on cell type in Parkinson's disease*

**NPJ Parkinsons Dis.** 2022 Jul 19;8(1):92. doi: 10.1038/s41531-022-00354-3. Kedariti M NPJ Parkinsons Dis

Percetti M, Franco G, Monfrini E, Caporali L, Minardi R, La Morgia C, Valentino ML, Liguori R, Palmieri I, Ottaviani D, Vizziello M, Ronchi D, Di Bernardino F, Cocco A, Macao B, Falkenberg M, Comi GP, Albanese A, Giometto B, Valente EM, Carelli V, Di Fonzo A.

*TWNK in Parkinson's Disease: A Movement Disorder and Mitochondrial Disease Center Perspective Study*

**Mov Disord.** 2022 Sep;37(9):1938-1943. doi: 10.1002/mds.29139.

**Epub** 2022 Jul 6. Percetti M Mov Disord

Lazzeri G, Franco G, Difonzo T, Carandina A, Gramegna C, Vergari M, Arienti F, Naci A, Scatà C, Monfrini E, Dias Rodrigues G, Montano N, Comi GP, Saetti MC, Tobaldini E, Di Fonzo A.

*Cognitive and Autonomic Dysfunction in Multiple System Atrophy Type P and C: A Comparative Study*

**Front Neurol.** 2022 Jun 16;13:912820. doi: 10.3389/fneur.2022.912820. eCollection 2022

Lazzeri G Front Neurol

Fioravanti V, Cavallieri F, Di Fonzo A, Toschi G, Grisanti S, Salomone G, Zappia M, Valzania F. *Axial Improvement after Casirivimab/Imdevimab Treatment for COVID-19 in Parkinson's Disease* **Can J Neurol Sci.** 2022 Jun 29:1-2. doi: 10.1017/cjn.2022.269. Online ahead of print. Fioravanti V  
Can J Neurol Sci

Erro R, Pilotto A, Esposito M, Olivola E, Nicoletti A, Lazzeri G, Magistrelli L, Dallocchio C, Marchese R, Bologna M, Tessitore A, Misceo S, Gigante AF, Terranova C, Moschella V, di Biase L, Di Giacopo R, Morgante F, Valentino F, De Rosa A, Trinchillo A, Malaguti MC, Brusa L, Matinella A, Di Biasio F, Paparella G, De Micco R, Contaldi E, Modugno N, Di Fonzo A, Padovani A, Barone P;

TITAN Study Group.

*Correction to: The Italian tremor Network (TITAN): rationale, design and preliminary findings*  
*Neurol Sci.* 2022 Dec;43(12):7013-7014. doi: 10.1007/s10072-022-06216-3. Erratum in: *RNeurol Sci*

RAU, Monfrini E, Romano S, Brescia G, Vujosevic S, Sacchi M, Di Fonzo A, Nucci P.

Genetic evaluation in phenotypically discordant monozygotic twins with Coats Disease Lizzio

**Eur J Ophthalmol.** 2022 Jun 9:11206721221107798. doi: 10.1177/11206721221107798. Online ahead of print. Lizzio RAU Eur J Ophthalmol

Erro R, Pilotto A, Esposito M, Olivola E, Nicoletti A, Lazzeri G, Magistrelli L, Dallocchio C, Marchese R, Bologna M, Tessitore A, Misceo S, Gigante AF, Terranova C, Moschella V, di Biase L, Di Giacopo R, Morgante F, Valentino F, De Rosa A, Trinchillo A, Malaguti MC, Brusa L, Matinella A, Di Biasio F, Paparella G, De Micco R, Contaldi E, Modugno N, Di Fonzo A, Padovani A, Barone P; TITAN Study Group.

The Italian tremor Network (TITAN): rationale, design and preliminary findings

**Neurol Sci.** 2022 Sep;43(9):5369-5376. doi: 10.1007/s10072-022-06104-w. Epub 2022 May 24. Erratum  
**R Neurol Sci**

Vismara M, Benatti B, Nicolini G, Cova I, Monfrini E, Di Fonzo A, Fetoni V, Viganò CA, Priori A, Dell'Osso B.

## *Clinical uses of Bupropion in patients with Parkinson's disease and comorbid depressive or neuropsychiatric symptoms: a scoping review*

BMC Neurol. 2022 May 5;22(1):169. doi: 10.1186/s12883-022-02668-4.

Vismara MBMC Neurol

Monfrini E, Miller C, Frucht SJ, Di Fonzo A, Riboldi GM.

## *Progressive myoclonus without epilepsy due to a NUS1 frameshift insertion: Dyssynergia cerebellaris myoclonica revisited*

**Parkinsonism Relat Disord.** 2022 May; 98:53-55. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.03.016. Epub 2022 Apr 20. Monfrini E Parkinsonism Relat Disord

Carandina A, Lazzeri G, Rodrigues GD, Franco G, Monfrini E, Arienti F, Frattini E, Trezzi I, da Silva Soares PP, Bellocchi C, Furlan L, Montano N, Di Fonzo A, Tobaldini E.

## Dysautonomia in Parkinson's Disease: Impact of Glucocerebrosidase Gene Mutations on Cardiovascular Autonomic Control

**Front Neurosci.** 2022 Mar 15;16:842498. doi: 10.3389/fnins.2022.842498. eCollection 2022. Carandina A Front Neurosci

Kakouri AC, Votsi C, Oulas A, Nicolaou P, Aureli M, Lunghi G, Samarani M, Compagnoni GM, Salani S, Di Fonzo A, Christophides T, Tanteles GA, Zamba-Papanicolaou E, Pantzaris M, Spyrou GM, Christodoulou K.

## *Transcriptomic characterization of tissues from patients and subsequent pathway analyses reveal biological pathways that are implicated in spastic ataxia*

**Cell Biosci**. 2022 Mar 11;12(1):29. doi: 10.1186/s13578-022-00754-1. Kakouri AC **Cell Biosci**

Straniero L, Rimoldi V, Monfrini E, Bonvegna S, Melistaccio G, Lake J, Soldà G, Aureli M, Shankaracharya, Keagle P, Foroud T, Landers JE, Blauwendraat C, Zecchinelli A, Cilia R, Di Fonzo A, Pezzoli G, Duga S, Asselta R.

*Role of Lysosomal Gene Variants in Modulating GBA-Associated Parkinson's Disease Risk*

**Mov Disord.** 2022 Jun;37(6):1202-1210. doi: 10.1002/mds.28987. Epub 2022 Mar 9. Straniero LMov Disord

Falla M, Cossu G, Di Fonzo A.

Freezing of gait: overview on etiology, treatment, and future directions

**Neurol Sci.** 2022 Mar;43(3):1627-1639. doi: 10.1007/s10072-021-05796-w. Epub 2022 Jan 14.

Falla M Neurol Sci

Monfrini E, Spagnolo F, Canesi M, Seresini A, Rini A, Passarella B, Percetti M, Seia M, Goldwurm S, Cereda V, Comi GP, Pezzoli G, Di Fonzo A.

*VPS13C-associated Parkinson's disease: Two novel cases and review of the literature*

**Parkinsonism Relat Disord.** 2022 Jan;94:37-39. doi: 10.1016/j.parkreldis.2021.11.031. Epub 2021 Dec 1. Monfrini E Parkinsonism Relat Disord

Franco G, Lazzeri G, Di Fonzo A.

*Parkinsonism and ataxia*

**J Neurol Sci.** 2022 Feb 15;433:120020. doi: 10.1016/j.jns.2021.120020. Epub 2021 Oct 1. Franco GJ Neurol Sci

Riboldi GM, Frattini E, Monfrini E, Frucht SJ, Di Fonzo A.

*A Practical Approach to Early-Onset Parkinsonism*

**J Parkinsons Dis.** 2022;12(1):1-26. doi: 10.3233/JPD-212815. Riboldi GM J Parkinsons Dis

Montinaro BL, Bozzano V, Carandina A, Croci GA, Di Fonzo A, Tobaldini E.

*A 79-year-old man with unexplained recurrent syncope and severe orthostatic hypotension*

**Intern Emerg Med.** 2022 Jun;17(4):1139-1144. doi: 10.1007/s11739-021-02832-7. Epub 2021 Sep 15. Montinaro BL Intern Emerg Med



## **UOSD MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

CENTRO PER LO STUDIO, LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DEI DISTURBI COGNITIVI E DELLA MEMORIA "UNITÀ VALUTATIVA ALZHEIMER - U.V.A."

CENTRO PER LO STUDIO, LA DIAGNOSI E LA TERAPIA DELLA SCLEROSI MULTIPLA

### **DIRETTORE:**

Prof. Elio Scarpini

### **PROFESSORE ASSOCIATO DI BIOLOGIA**

Prof.ssa Daniela Galimberti

### **TECNICO LAUREATO**

Dott.ssa Chiara Fenoglio

### **MEDICI:**

Dott.ssa Milena De Riz

Dott.ssa Anna Pietroboni

Dott. Andrea Arighi

Dott.ssa Tiziana Carandini

Dott. Giorgio Fumagalli

Dott. Stefano Floro

### **MEDICO SPECIALIZZANDO**

Dott. Luca Sacchi

### **BIOLOGI:**

Dott.ssa Maria Serpente

Dott.ssa Caterina Visconte

Dott.ssa Marina Arcaro

Dott.ssa Marianna D'Anca

Dott.ssa Federica Sorrentino

Dott.ssa Francesca Buccellato

### **PSICOLOGI**

Dott. Roberto Vimercati

Dr.ssa Emanuela Rotondo

Dott. Matteo Mercurio

Dott.ssa Giulia Giardinieri

Dott.ssa Vittoria Borracci

### **SEGRETARI**

Sig.ra Daniela Da Lisca

Sig. Marco Milianti

## 1 - ATTIVITÀ CLINICA ED ASSISTENZIALE

Dal punto di vista clinico, il gruppo si è occupato di ricerche cliniche nel campo della Sclerosi Multipla e della malattia di Alzheimer e demenze correlate (demenza Frontotemporale, demenza a corpi di Lewy). I pazienti sono stati seguiti dai componenti del gruppo presso i seguenti Ambulatori Specialistici di “secondo livello”:

### 1.1. Ambulatorio Malattie Demielinizzanti del Sistema Nervoso Centrale

Nel corso dell’anno 2022 sono giunti all’ambulatorio per le Malattie Demielinizzanti circa 100 nuovi pazienti.

Il numero totale di visite nel corso del 2022 è stato di più di 700 in ambulatori dedicati alla Sclerosi Multipla, attivi tutti i giorni sia al mattino che al pomeriggio, in parte in telemedicina per l’emergenza sanitaria.

È operativo un servizio di “Macro Attività Complessa” (MAC) per consentire ai pazienti di sottoporsi a trattamenti quali la somministrazione di cortisonici ad alto dosaggio e. v. e l’infusione di Immunoglobuline e.v. nonché di effettuare tutte le procedure diagnostiche. Sono stati effettuati 600 ricoveri in regime di MAC.

Il Servizio è riconosciuto tra i Centri Provinciali autorizzati dalla Regione Lombardia alla dispensazione di: beta-Interferone Ia e Ib, Copaxone (glatiramer acetato), Tysabri (Natalizumab), Gylenia (Fingolimod), Tecfidera (Dimetilfumarato), Aubagio (Teriflunomide), Lemtrada (Alemtuzumab), Ocrelizumab. In dettaglio, sono al momento registrati in File F per il trattamento circa 250 pazienti.

### 1.2. Ambulatorio per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria

Nel corso dell’anno sono giunti all’ambulatorio per la Diagnosi e la Terapia dei Disturbi Cognitivi e della Memoria circa 200 nuovi pazienti. Complessivamente sono state eseguite circa 1200 visite, in ambulatori attivi dal lunedì al venerdì, sia la mattina che il pomeriggio in parte in telemedicina per l’emergenza sanitaria.

Sono stati effettuati 200 ricoveri in regime di MAC per accertamenti diagnosticci.

Dall’ottobre 2000 il Centro è stato riconosciuto da parte della Regione Lombardia come “Unità Valutazione Alzheimer” (U.V.A) ed inserito nel Progetto CRONOS del Ministero della Sanità. Presso tale Centro afferiscono pazienti con sospetto decadimento cognitivo, inviati dal medico di base o dallo specialista, onde essere sottoposti ad un inquadramento diagnostico rivolto alla malattia di Alzheimer e demenze correlate, ai fini dell’inserimento nel progetto CRONOS che prevede l’erogazione gratuita dei nuovi farmaci anticolinesterasici. Ad oggi, risultano al momento registrati per terapia con anticolinesterasici oltre 500 pazienti. Inoltre, alcuni pazienti sono registrati in File F per trattamento con memantina (Ebixa).

Riguardo gli esami diagnostici per Sclerosi Multipla, malattia di Alzheimer e Degenerazione Lobare Frontotemporale, sono state effettuate le seguenti prestazioni (sia per pazienti degenti che richieste da ospedali esterni):

- esame liquor, IEF per diagnosi di sclerosi multipla: 120
- dosaggio Amiloide, Tau totale e fosforilata nel liquor per diagnosi Alzheimer: 180
- programulina plasmatica: 60
- ricerca di espansione esanucleotidica di *C9ORF72* mediante analisi di frammenti: 100
- analisi NGS esoma clinico: 60

## 2. Sperimentazioni cliniche (multicentriche, randomizzate)

A randomised double-blind placebo-controlled clinical trial investigating the effect and safety of oral semaglutide in subjects with early Alzheimer's disease (EVOKE), Novo Nordisk, prot. NN6535-4730

A randomised double-blind placebo-controlled clinical trial investigating the effect and safety of oral semaglutide in subjects with early Alzheimer's disease (EVOKE plus), Novo Nordisk, prot NN6535-4725

A Placebo-Controlled, Double-Blind, Parallel-Group, 18-Month Study With an Open-Label Extension Phase to Confirm Safety and Efficacy of BAN2401 in Subjects With Early Alzheimer's Disease, EISAI, prot BAN 2401-G000-301

A placebo-controlled, double-blind, parallel-group, 24-month study to evaluate the efficacy and safety of E2609 in subjects with early Alzheimer's Disease, EISAI, prot BAN 2401-G000-301

A phase 3, Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled study to evaluate the efficacy and safety of AL001 in individual at risk for FTD due to heterozygous mutations in the progranulin gene ALECTOR, prot AL001-3

A phase 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study to evaluate the efficacy and safety of AL002 in participants with early alzheimer's disease ALECTOR, prot AL002-2

An extension study of ABBVIE-8E12 in early AD ABBVIE M15-570

A multicenter, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled variable treatment duration study evaluating the efficacy and safety of Siponimod (BAF312) in patients with secondary progressive Multiple Sclerosis, Novartis, prot. CBAF312A2304

A phase 3, multisite, open-label extension trial of oral RPC1063 in relapsing multiple sclerosis RECEPTOS RPC01-3001

A phase 3, randomized, double-blind, efficacy and safety study comparing SAR442168 to placebo in participants with nonrelapsing secondary progressive multiple sclerosis (HERCULES) SANOFI, prot EFC16645

A phase 3, randomized, double-blind efficacy and safety study comparing SAR442168 to teriflunomide (AUBAGIO) in participants with relapsing forms of multiple scleroris (GEMINI1) SANOFI, prot EFC16033

An observational, real life study to describe the effect of Lemtrada on fatigue, quality of life and other patient and caregiver reported outcomes in patients with RRSM aleml07661-REALITY

## 3. Attività di ricerca di base

È attualmente presente presso la UOSD Malattie Neurodegenerative e Demielinizzanti una banca biologica comprendente:

1) circa 7000 campioni di DNA. Le patologie più rappresentate sono:

- 800 pazienti con diagnosi di Malattia di Alzheimer
- 600 con altri tipi di demenza (Degenerazione Lobare Frontotemporale, demenza a corpi di Lewy, demenza vascolare, paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione corticobasale)
  - 850 con diagnosi di Sclerosi Multipla

2) circa 1150 campioni di liquido cerebrospinale, siero e plasma. Tra questi:

- 480 pazienti con Sclerosi Multipla
- 700 con patologie neurodegenerative (prevalentemente malattia di Alzheimer)

3) circa 550 cDNA ricavati da RNA estratto da cellule del sangue

Nel corso del 2022 l'attività del gruppo si è articolata sulle seguenti tematiche:

Caratterizzazione, quantificazione e studio del contenuto delle vescicole extracellulari di origine neuronale e microgliale dal plasma di pazienti con fragilità e malattia di Alzheimer e studio dei microRNA in esse contenuti

Questo studio si colloca nell'ambito di una ricerca finalizzata volta a studiare la fragilità come fattore in grado di influenzare e accelerare i processi neurodegenerativi che conducono a demenza. Notoriamente l'infiammazione cronica e l'attivazione del sistema immunitario sono fattori implicati nella fragilità (definita come una sindrome dell'anziano associata a progressivo declino fisico e ad un significativo aumento del rischio di cadute, di disabilità, di ospedalizzazione e di morte) e nello sviluppo del declino cognitivo negli anziani. Tuttavia, non vi sono molecole di tipo infiammatorio o RNA non codificanti (ncRNA) che siano state dimostrati come biomarcatori diagnostici o prognostici utilizzati nell'ambito clinico per la fragilità e la demenza. La nostra ipotesi di lavoro è che il contenuto degli esosomi di origine neuronale (NDE: Neural Derived Exosomes) e microgliale (microglial Derived Exosomes, MDEs) potrebbero essere una fonte promettente di biomarcatori per la fragilità e la demenza in quanto queste vescicole potrebbero riflettere le modificazioni patologiche che avvengono nel cervello. Anche la loro concentrazione e dimensione potrebbe essere caratteristica dello stato fisiologico del soggetto o essere un fattore predisponente a fragilità e declino cognitivo. A questo scopo nell'ultimo anno è stato ottimizzato un protocollo di estrazione ed isolamento delle vescicole microgliali plasmatiche ed è stato applicato allo studio per la determinazione della loro concentrazione, unitamente a quelle di derivazione neuronale, nei soggetti cognitivamente sani e in quelli fragili e non fragili affetti da decadimento cognitivo di grado lieve (MCI) o demenza. La quantificazione è stata eseguita in parallelo con due tecnologie distinte il nanoparticle tracking analysis (NTA), che calcola la concentrazione delle vescicole mediante analisi del moto browniano delle particelle e analisi dimensionale al qNANO (Tunable Resistive Pulse Sensing).

Dai risultati analizzati con entrambe le metodiche emerge una analoga distribuzione dimensionale delle vescicole totali e di specifica derivazione cellulare. Riguardo invece la concentrazione dai primi dati analizzati si evince una maggiore concentrazione nelle vescicole di derivazione microgliale nei soggetti con MCI e fragilità rispetto ai controlli. Questo avvalora l'ipotesi di un possibile ruolo delle vescicole di derivazione microgliale nei processi infiammatori o comunque patogenetici che occorrono nelle fasi iniziali del decadimento cognitivo.

Lo studio si è poi focalizzato sul contenuto di RNA in particolare microRNA nelle vescicole isolate nelle diverse condizioni biologiche. Sono stati testati per ogni tipologia di vescicole e per ciascun paziente un totale di 754 miRNA mediante la tecnologia Open Array in Real Time PCR avvalendoci della piattaforma Quantstudio 12K flex system. Tale tecnologia ha permesso di rilevare con 358 miRNA la cui espressione superava i controlli qualità di affidabilità del dato nelle vescicole totali, 251 nelle vescicole di derivazione microgliale e 232 miRNA nelle vescicole di derivazione neuronale. L'analisi statistica ha permesso di evidenziare livelli significativamente più elevati dei miR-223, miR-451, miR-21, e miR-20a nelle vescicole totali dei soggetti AD non fragili rispetto ai controlli. Riguardo invece l'analisi del contenuto dei miRNAs nella sottopopolazione esosomal di derivazione neuronale emerge un aumento generalizzato dell'espressione dei miRNA per tutte le condizioni considerate eccetto che nei controlli non fragili dove prevale una riduzione del livello di espressione dei miRNA in esame. Infine riguardo ai miRNA nelle vescicole di derivazione microgliale si osserva una generalizzata diminuzione dei livelli di espressione nelle differenti condizioni eccetto per gli AD dove predomina una maggiore espressione dei miRNA. Questi sono i dati preliminari di un progetto tuttora in corso e fin qui il lavoro svolto ha permesso di isolare nel plasma e caratterizzare mediante differenti metodiche le vescicole extracellulari di derivazione microgliale oltre a quelle neuronali per le quali il metodo era già stato ottimizzato. E' stato stabilito che tali vescicole hanno caratteristiche di marcatori, morfologia e dimensioni equiparabili a quelle esosomal e che vi sia una tendenza ad un aumento della loro concentrazione nella condizione di MCI associato a fragilità. Non sembra invece delinearsi fino ad ora una signature specifica di mRNA nelle diverse condizioni considerate.

### Profilo infiammatorio nel siero dei soggetti affetti da FTD e portatori di mutazione in *GRN* e *MAPT*.

Questo studio tuttora in corso ha coinvolto i sieri dei soggetti affetti da FTD e portatori di mutazioni genetiche collezionati negli anni nell'ambito del consorzio GENFI. Questa collaborazione ha permesso così di ottenere i sieri di 443 soggetti portatori di mutazioni in *GRN*, *MAPT* e *C9ORF72* sia asintomatici che sintomatici e soggetti sani non portatori di mutazioni.

Attraverso l'utilizzo della tecnologia MSD su piattaforma Meso –quick plex SQ 120 che lavora in elettrochemiluminescenza sono state analizzate le seguenti molecole coinvolte nei processi infiammatori: CRP, Eotaxin, Eotaxin-3, FGF (basic), ICAM-1, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12/IL-23p40, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17A, IP-10, MCP-1, MCP-4, MDC, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PIGF, SAA, TARC, Tie-2, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , VCAM-1, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1/Flt-1. Della coorte disponibile sono stati ad oggi analizzati un totale di 17 soggetti sintomatici portatori di mutazioni in *MAPT* e 14 asintomatici, 16 soggetti portatori di mutazione in *GRN* sintomatici e 12 asintomatici, 17 soggetti portatori di espansione in *C9ORF72* sintomatici e 14 portatori asintomatici, e 51 soggetti sani non portatori. Da una analisi preliminare emerge una differente regolazione dei livelli di alcuni parametri infiammatori nei soggetti portatori delle diverse mutazioni sia sintomatici che asintomatici rispetto ai controlli non portatori, suggerendo differenti meccanismi patogenetici sottesi dai diversi geni mutati.

### Profilo di espressione dei miRNA in soggetti affetti da FTD e portatori di mutazione in *C9ORF72*, *GRN* e *MAPT*.

In questo studio ancora in corso è stato valuto il livello di espressione di miRNA estratti da cellule del sangue periferico di soggetti affetti da FTD e portatori di mutazioni genetiche reclutati negli anni nell'ambito del consorzio GENFI. Questa collaborazione ha permesso di ottenere campioni di 157 soggetti portatori di mutazioni in *GRN*, *MAPT* e *C9ORF72* sia asintomatici che sintomatici e soggetti sani non portatori di mutazioni. Per lo studio è stata utilizzata la tecnologia OpenArray, che permette, mediante Real time PCR, di analizzare contemporaneamente 754 miRNA. Un'analisi preliminare è stata condotta su 30 portatori sintomatici (10 portatori dell'espansione in *C9ORF72*, 10 mutati in *GRN*, 10 in *MAPT*) e 10 non portatori. Diversi miRNA sono risultati deregolati in maniera specifica per il gruppo genetico rispetto ai non portatori. In particolare, per quanto riguarda il gruppo *C9ORF72*, hsa-miR-223# e hsa-miR-20b sono risultati maggiormente espressi nei pazienti rispetto ai controlli ( $p < 0.04$ ). Nel gruppo *GRN* si è osservata una maggiore espressione di hsa-miR-28-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-365, hsa-miR-576-5p e hsa-miR-642, mentre l'espressione di hsa-miR-590-5p risulta ridotta ( $p < 0.04$ ). Infine, riguardo il gruppo *MAPT*, nove miRNA sono risultati deregolati rispetto ai controlli: hsa-miR-146a, hsa-miR-192, hsa-miR-25, hsa-miR-28, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-30c, hsa-miR-576-3p mostravano una maggiore espressione, mentre hsa-miR-339-5p e hsa-miR-532-3p erano più espressi nei controlli. Per ciascun gruppo genetico, i livelli di espressione dei miRNA identificati, analizzati mediante curve ROC, sono in grado di predire pazienti e controlli con elevata sensibilità ( $>80\%$ ) e specificità ( $>78\%$ ). È in corso la validazione su ulteriori soggetti sintomatici e sui portatori non sintomatici.

### Ruolo dei miRNA con target sinaptici nelle vescicole di derivazione mieloide nella Sclerosi Multipla

Questo progetto si focalizza sulle vescicole plasmatiche di derivazione mieloide selezionate per il marcatore IB4+.

Il progetto si basa sull'evidenza del considerevole impatto dei deficit cognitivi sulla qualità della vita nei pazienti affetti da Sclerosi Multipla (SM) e sulla evidente assenza di biomarcatori in grado di dello stato cognitivo nella SM. L'ipotesi dello studio è che microRNA con target sinaptici contenuti nelle vescicole di derivazione mieloide possano riflettere i deficit cognitivi. In particolare ci si è focalizzati sull'espressione di 14 miRNAs scelti sulla base della letteratura e delle predizioni bioinformatiche in quanto sono quelli che presentano il maggior numero di target sinaptici. Si sono analizzate coorti di pazienti affetti da SM Italiana e Olandese per un totale di 23 pazienti con anche deficit cognitivi e 25 pazienti cognitivamente integri. Dai risultati ottenuti emerge una significativa maggiore espressione del miR-150-5p ed una significativa ridotta espressione del let-7b-5p nelle vescicole mieloidi dei

soggetti SM con deficit cognitivi. Tali molecole presenti nelle vescicole plasmatiche di derivazione mieloide potrebbero rappresentare dei marcatori di deficit cognitivo nella SM.

#### Ricerca di un pattern specifico di espressione genica in pazienti con numero intermedio di espansioni nel gene C9ORF72

Espansioni esanucleotidiche (G4C2) maggiori di 145 ripetizioni nel gene C9orf72 sono note essere causa di insorgenza di Demenza Frontotemporale e Sclerosi Amiotrofica Laterale sia in casi familiari sia in casi sporadici di malattia. Poco però ancora si conosce sul ruolo che ripetizioni di tipo intermedio (range 9-30).

Nel corso del 2022 abbiamo effettuato uno studio di espressione genica confrontando soggetti portatori di espansione patogenetica in C9orf72, pazienti con un numero intermedio di ripetizioni GGGCC e controlli sani. È stato utilizzato un pannello, disegnato ad-hoc, in cui sono stati inseriti i principali geni coinvolti nei processi autofagici, infiammatori e legati all'invecchiamento. I dati preliminari dimostrano che l'espressione di ULK1 è diminuita significativamente nei pazienti con numero intermedio di ripetizioni rispetto ai controlli. Risultano de-regolati anche ATG14 la cui espressione risulta aumentata nel gruppo dei pazienti con numero intermedio di ripetizioni rispetto ai controlli e DAPK1 la cui espressione risulta diminuita nello stesso gruppo. Tutti e tre questi geni sono coinvolti nei processi autofagici.

#### Ruolo di α-klotho nella malattia di Alzheimer e nella Demenza Frontotemporale

È noto che la proteina α-klotho esercita un effetto neuroprotettivo nei confronti dello sviluppo del decadimento cognitivo associato a malattie neurodegenerative. Recentemente è stato studiato l'effetto della variante genica denominata "KL-VS" nella malattia di Alzheimer, individuando un ruolo protettivo della variante nello stato di eterozigosi.

Ad oggi però ancora non è stata estesamente studiata la relazione tra genotipo e livelli di espressione della proteina così come non è noto il ruolo della variabilità genetica di α-klotho in altri tipi di demenze, come per esempio la Demenza Frontotemporale.

Nel corso del 2021 abbiamo approfondito il ruolo di α-klotho effettuando uno studio caso-controllo e uno studio di espressione a livello delle cellule del sangue periferico mettendo in relazione anche lo status genetico con i livelli di espressione genica.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la frequenza del genotipo in eterozigosi non si discosta in maniera significativa nei casi rispetto ai controlli, con una frequenza nei pazienti affetti da malattia di Alzheimer del 24,43%, in soggetti affetti da Demenza Frontotemporale del 24,42% e nei controlli del 25% ( $P>0,05$ ). Per quanto riguarda l'espressione genica, i controlli mostrano un incremento di espressione di α-klotho rispetto ai pazienti ( $p: 0.003$ ). Confrontando gli effetti dello stato KL-VShet+ sull'espressione genica, non sono state individuate differenze significative rispetto ai non portatori. Tuttavia, è stata osservata la tendenza ad una maggior espressione genica nei portatori del genotipo KL-VShet+ rispetto ai non portatori nel gruppo dei pazienti affetti da Demenza Frontotemporale.

#### Ricerca di biomarcatori per lo studio del sistema glinfatico

Valutazione dei livelli liquorali della proteina Acquaporina4 (AQP4) nei pazienti con malattie neurodegenerative e correlazione con i biomarcatori di neurodegenerazione; valutazione degli spazi liquorali perivascolari dilatati con tecniche di RM e correlazione con i livelli di AQP4 ed i biomarcatori liquorali di neurodegenerazione; studio della diffusività ventricolare del tracciante per amiloide mediante PET e correlazione con i livelli di AQP4 ed i biomarcatori liquorali di neurodegenerazione

#### Studio osservazionale open label di terapie immunomodulanti per la Sclerosi Multipla (3TR-MS)

Lo studio internazionale, in aperto, osservazionale, multicentrico, farmacologico, non interventistico, esplorativo e di tipo prospettico è inserito nell'ambito del programma HORIZON2020, CALL "H2020-JTI-IMI2-2018-14-two-stage (2019-2026). Il nostro Centro è stato nominato coordinatore internazionale; parteciperanno 10 altri Centri e si prevede di arruolare un totale di 350 pazienti. Tale studio si propone di identificare i biomarcatori in grado di predire la risposta alle terapie modificanti l'andamento della malattia, le cosiddette DMTs, per pazienti con diagnosi di SM e di valutare

precoce mente i cambiamenti patofisiologici associati, al fine di identificare marcatori biologici di non risposta che permettano di cambiare in futuro l'approccio terapeutico evitando ricadute di malattia e accumulo di disabilità. Questo tipo di approccio apre la strada alla terapia personalizzata.

Lo studio prevede l'analisi di dati e campioni (sangue, feci, urina, saliva e liquido cefalorachidiano solo per pazienti di nuova diagnosi come da pratica clinica) di 30 pazienti arruolati presso il nostro centro affetti da SM nella forma recidivante-remittente (RR) mai trattati in passato con farmaci immunomodulatori o di nuova diagnosi (ad oggi sono stati arruolati 8 pazienti). Lo studio ha anche un obiettivo secondario, quello di valutare l'impatto della fatica attraverso la somministrazione di differenti questionari auto valutativi di qualità della vita (es: SF-36, FACIT-F).

Il 3TR-MS fa parte di un progetto di più ampio respiro che coinvolge oltre alla sclerosi multipla anche altre 5 malattie a base immunologica, allergica e infiammatoria quali il Lupus Eritematoso Sistemico, l'Asma, Malattie infiammatorie intestinali (Morbo di Chron e Colite Ulcerosa), la broncopneumopatia cronica ostruttiva e l'Artrite Reumatoide. Infatti la principale ipotesi del progetto 3TR è che i dati ottenuti dallo studio analizzati con approcci molecolari di natura "multiomica" (es: trascrittonica, epigenetica) in maniera trasversale nelle differenti patologie potrebbero identificare dei pathway biologici comuni che meglio possono predire la responsività o meno alla terapia rispetto alle differenze cliniche e patologiche proprie di ogni singola malattia.

#### Valutazione atrofia cerebrale mediante utilizzo di scale visive per la diagnostica differenziale tra pazienti con Demenza frontotemporale e pazienti con disturbi psichiatrici ad esordio tardivo

Dallo studio è emerso che i soggetti con demenza frontotemporale hanno maggiore atrofia soprattutto nella regione orbitofrontale sinistra.

#### Studio della motilità oculare, del sistema vestibolare e delle caratteristiche neuropsicologiche in soggetti affetti da atrofia corticale posteriore

#### Studio delle differenze cliniche, neuropsicologiche e di neuroimaging tra pazienti con demenza frontotemporale variante temporale destra e pazienti con malattia di Alzheimer con atrofia temporale destra.

Abbiamo riscontrato che nei soggetti con malattia di Alzheimer erano più frequenti disturbi di orientamento e disturbi esecutivi all'esordio mentre nei frontotemporali al follow up maggiore disagio sociale.

#### Studio DIPPA (Diagnostic and Prognostic Precision medicine for behavioural variant Frontotemporal Dementia) finanziato da JPND (EU Jointed Program – Neurodegenerative Disease Research).

Lo studio è finalizzato all'identificazione di biomarcatori diagnostici e prognostici per la Demenza Frontotemporale: in particolare verrà valutato il contenuto di vescicole extracellulari di origine neuronale derivanti da pazienti affetti dalla variante comportamentale della demenza frontotemporale. Tale contenuto sarà confrontato con quello di vescicole estratte da pazienti psichiatrici ad esordio tardivo, che talvolta presentano sintomi sovrappponibili, e da controlli non dementi.

#### Utilizzo di tecniche quantitative di MRI nei pazienti con sclerosi multipla

In particolare verranno analizzate le sequenze di DWI-MRI e trattografia, per studiare il danno microstrutturale nei tratti di sostanza bianca delle aree cerebrali prefrontali e per valutare correlazioni con le performance cognitive misurate da batterie di test neuropsicologici. Inoltre verrà studiato il danno microstrutturale nei tratti monoaminergici di sostanza bianca delle aree cerebrali prefrontali e per valutare correlazioni con le scale di fatighe

#### Ricerca Finalizzata Giovani Ricercatori 2019 Ministero della Salute: "DISsecting Behavioral variant frontotemporal dementia AND bipolar disorder: an integrated epigenetic-neuroimaging approach (DISBAND)". GR-2019-12369100.

Nell'ambito del Progetto GR-2019- 12369100 sono state isolate vescicole neuronali dal plasma di 10 pazienti affetti da demenza frontotemporale di tipo comportamentale, 10 soggetti portatori di

espansione patogenetica nel gene C9orf72, 20 soggetti con disturbo bipolare (10 a esordio precoce, 10 a esordio tardivo; in collaborazione con l'UO Psichiatria della Fondazione IRCCS C'a Granda Ospedale Maggiore Policlinico) e 10 controlli sani. Abbiamo analizzato il contenuto di tali vescicole in termini di RNA non codificanti al fine di identificare dei pattern specifici di espressione genica.

#### PET amiloide e danno della sostanza bianca

Utilizzo dei traccianti amiloide per l'identificazione precoce del danno della sostanza bianca in pazienti affetti da malattia di Alzheimer e da demenze non AD e correlazione con i livelli liquorali di proteina beta amiloide

#### Quantitative susceptibility mapping (QSM) della sostanza bianca apparentemente normale (NAWM) nella sclerosi multipla come possibile marcatore precoce di progressione silente di malattia

Correlazione tra il danno della sostanza bianca valutato con tecniche di imaging innovative e progressione clinica misurata con EDSS ed MSSS (e i livelli sierici di Neurofilamenti e GFAP e i livelli liquorali di proteina amiloide)

I progetti di ricerca sono stati sviluppati grazie alla collaborazione con Centri sia italiani che stranieri.

Tra i primi vi sono:

- Prof. A. Maggi, Centro di Biotecnologie Farmacologiche, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università di Milano
- Dott. Gianluigi Forloni, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano
- Prof. Stefano Cappa, Università di Pavia
- Proff. Alessandro Padovani e Barbara Borroni, Università di Brescia
- Dott.ssa Claudia Verderio CNR instituite of Neuroscience, Università Milano-Bicocca
- Prof. Marco Bozzali, Università di Torino
- Dott.ssa Carmen Giordano, Politecnico di Milano

Tra i centri esteri:

- Dr. Robert P. Lisak, Dip. di Neurologia, Detroit (USA)
- Prof. Philip Scheltens, Prof. Yolande Pijnenburg, Dept. of Neurology, VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands
- Prof. Janine Diehl, Univerity of Munich, Germany
- Prof. Glenda Halliday, University of Sydney, Australia
- Prof. Simon Ducharme, McGill University, Vancouver, Canada
- Dr. Anne Cross, University of Saint Louis, USA
- Prof. Jean Charles Lambert, Lille, France
- Dr. Jonathan Rohrer, UCL, London, UK
- Prof. An Goris, Leuven, Belgium
- Dr. Marta Alarcon, Genyo, Granada, Spain

Inoltre, il gruppo ha contribuito a consorzi internazionali per studi su popolazioni di pazienti con:

- Malattia di Alzheimer (IGAP: International Genomics of Alzheimer's Disease Project).
- Demenza Frontotemporale (GENFI: GENetics of Frontotemporal dementia Initiative)
- Sclerosi Multipla (IMSC: International Multiple Sclerosis Collaboration).

## 4. PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CENSITE 2022

Peakman G, Russell LL, Convery RS, Nicholas JM, Van Swieten JC, Jiskoot LC, Moreno F, Sanchez-Valle R, Laforce R, Graff C, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Borroni B, Finger E, Synofzik M, Galimberti D, Vandenberghe R, de Mendonça A, Butler CR, Gerhard A, Ducharme S, Le Ber I,

Tagliavini F, Santana I, Pasquier F, Levin J, Danek A, Otto M, Sorbi S, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*Comparison of clinical rating scales in genetic frontotemporal dementia within the GENFI cohort.*  
**J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2022;93(2):158-168. IF=13,654

Benussi A, Alberici A, Samra K, Russell LL, Greaves CV, Bocchetta M, Ducharme S, Finger E, Fumagalli G, Galimberti D, Jiskoot LC, Le Ber I, Masellis M, Nacmias B, Rowe JB, Sanchez-Valle R, Seelaar H, Synofzik M; GENFI Consortium; Rohrer JD, Borroni B.

*Conceptual framework for the definition of preclinical and prodromal frontotemporal dementia.*  
**Alzheimers Dement.** 2022;18(7):1408-23. Doi: 10.1002/alz.12485. IF=16,655

Contarino VE, Siggillino S, Arighi A, Scola E, Fumagalli GG, Conte G, Rotondo E, Galimberti D, Pietroboni AM, Carandini T, Leemans A, Bianchi AM, Triulzi FM.

Association of Superficial White Matter Alterations with Cerebrospinal Fluid Biomarkers and Cognitive Decline in Neurodegenerative Dementia. **J Alzheimers Dis.** 2022;85(1):431-42. IF=4,160

Rotondo E, Galimberti D, et al. Caregiver Tele-Assistance for Reduction of Emotional Distress During the COVID-19 Pandemic.

*Psychological Support to Caregivers of People with Dementia: The Italian Experience.*  
**J Alzheimers Dis.** 2022;85(3):1045-52. IF=4,160

Wilke C, Reich S, van Swieten JC, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R, Graff C, Galimberti D, et al.

*Stratifying the Presymptomatic Phase of Genetic Frontotemporal Dementia by Serum NfL and pNfH: A Longitudinal Multicentre Study.*

**Ann Neurol.** 2022;91(1):33-47. IF=11,274

van der Ende EL, et al, Galimberti D, et al.

*A data-driven disease progression model of fluid biomarkers in genetic frontotemporal dementia.*  
**Brain** 2022;145(5):1805-17. IF=15,255

Öijerstedt L, Andersson C, Jelic V, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R Jr, Synofzik M, Galimberti D, Rowe GB, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, Vandenberghe R, de Mendonca A, Tagliavini F, Santana I, Ducharme S, Butler CR, Gerhard A, Levin J, Danek A, Otto M, Frisoni G, Ghidoni G, Sorbi S, Rohrer JD, Graff C;

*Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). Practice effects in genetic frontotemporal dementia and at-risk individuals: a GENFI study.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2022;93(3):336-9. IF=13,654

Bacalini MG, Palombo F, Garagnani P, Giuliani C, Fiorini C, Caporali L, Stanzani Maserati M, Capellari S, Romagnoli M, De Fanti S, Benussi L, Binetti G, Ghidoni R, Galimberti D, Scarpini E, Arcaro M, Bonanni E, Siciliano G, Maestri M, Guarnieri B; Italian Multicentric Group on clock genes, actigraphy in AD, Martucci M, Monti D, Carelli V, Franceschi C, La Morgia C, Santoro A. *Association of rs3027178 polymorphism in the circadian clock gene PER1 with susceptibility to Alzheimer's disease and longevity in an Italian population.*

**Geroscience** 2022;44(2):881-96. IF=7,581

Sacchi L, Carandini T, Fumagalli GG, Pietroboni AM, Contarino VE, Siggillino S, Arcaro M, Fenoglio C, Zito F, Marotta G, Castellani M, Triulzi F, Galimberti D, Scarpini E, Arighi A. *Unravelling the Association Between Amyloid-PET and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in the Alzheimer's Disease Spectrum: Who Really Deserves an A+?*

**J Alzheimers Dis.** 2022;85(3):1009-20. IF=4,160

Poos JM, Moore KM, Nicholas J, Russell LL, Peakman G, Convery RS, Jiskoot LC, van der Ende E, van den Berg E, Papma JM, Seelaar H, Pijnenburg YAL, Moreno F, Sanchez-Valle R, Borroni B, Laforce R, Masellis M, Tartaglia C, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Finger E, Synofzik M, Vandenbergh R, de Mendonça A, Tiraboschi P, Santana I, Ducharme S, Butler C, Gerhard A, Levin J, Danek A, Otto M, Le Ber I, Pasquier F, van Swieten JC, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*Cognitive composites for genetic frontotemporal dementia: GENFI-Cog.*

**Alzheimers Res Ther.** 2022;14(1):10. IF=8,831

Premi E, Costa T, Gazzina S, Benussi A, Cauda F, Gasparotti R, Archetti S, Alberici A, van Swieten JC, Sanchez-Valle R, Moreno F, Santana I, Laforce R, Ducharme S, Graff C, Galimberti D, Masellis M, Tartaglia C, Rowe JB, Finger E, Tagliavini F, de Mendonça A, Vandenbergh R, Gerhard A, Butler CR, Danek A, Synofzik M, Levin J, Otto M, Ghidoni R, Frisoni G, Sorbi S, Peakman G, Todd E, Bocchetta M, Rohrer JD, Borroni B; GENFI Consortium Members.

*An Automated Toolbox to Predict Single Subject Atrophy in Presymptomatic Granulin Mutation Carriers.*

**J Alzheimers Dis.** 2022;86(1):205-18. IF=4,160

McCarthy J, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R Jr, Graff C, Synofzik M, Galimberti D, Rowe JB, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, Vandenbergh R, de Mendonça A, Tagliavini F, Santana I, Butler C, Gerhard A, Danek A, Levin J, Otto M, Frisoni G, Ghidoni R, Sorbi S, Jiskoot LC, Seelaar H, van Swieten JC, Rohrer JD, Iturria-Medina Y, Ducharme S;

*GENetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). Data-driven staging of genetic frontotemporal dementia using multi-modal MRI.*

**Hum Brain Mapp.** 2022;43(6):1821-35. IF=5,399

Pietroboni AM, Colombi A, Carandini T, Sacchi L, Fenoglio C, Marotta G, Arighi A, De Riz MA, Fumagalli GG, Castellani M, Bozzali M, Scarpini E, Galimberti D.

*Amyloid PET imaging and dementias: potential applications in detecting and quantifying early white matter damage.*

**Alzheimers Res Ther.** 2022;14(1):33. IF=8,831

Goldoni R, Dolci C, Boccalari E, Inchegolo F, Paghi A, Strambini L, Galimberti D, Tartaglia GM. *Salivary biomarkers of neurodegenerative and demyelinating diseases and biosensors for their detection.*

**Ageing Res Rev.** 2022;76:101587. IF=11,788

Russo M, Carrarini C, Di Iorio A, Pellegrino R, Bruni AC, Caratozzolo S, Chiari A, Pretta S, Marra C, Cotelli MS, Arighi A, Fumagalli GG, Cataruzza T, Caso F, Paci C, Rosso M, Amici S, Giannandrea D, Pilotto A, Luzzi S, Castellano A, D'antonio F, Luca A, Gelosa G, Piccoli T, Mauri M, Agosta F, Babiloni C, Borroni B, Bozzali M, Filippi M, Galimberti D, Monastero R, Muscio C, Parnetti L, Perani D, Serra L, Silani V, Tiraboschi P, Cagnin A, Padovani A, Bonanni L; *Italian Dementia with Lewy bodies Study Group (DLB-SINdem). Accuracy of the clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB) among the Italian Dementia Centers: a study by the Italian DLB study group (DLB-SINdem).*

**Neurol Sci.** 2022;43(7):4221-29. IF=3,830

Foster PH, Russell LL, Peakman G, Convery RS, Bouzigues A, Greaves CV, Bocchetta M, Cash DM, van Swieten JC, Jiskoot LC, Moreno F, Sanchez-Valle R, Laforce R, Graff C, Masellis M, Tartaglia C, Rowe JB, Borroni B, Finger E, Synofzik M, Galimberti D, Vandenbergh R, de Mendonça A, Butler CR, Gerhard A, Ducharme S, Le Ber I, Tagliavini F, Santana I, Pasquier F, Levin J, Danek A, Otto M, Sorbi S, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*Examining empathy deficits across familial forms of frontotemporal dementia within the GENFI cohort.*

**Cortex** 2022;150:12-28. IF=4,644

Gazzina S, Grassi M, Premi E, Alberici A, Benussi A, Archetti S, Gasparotti R, Bocchetta M, Cash DM, Todd EG, Peakman G, Convery RS, van Swieten JC, Jiskoot LC, Seelaar H, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R Jr, Graff C, Synofzik M, Galimberti D, Rowe JB, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, Vandenberghe R, de Mendonça A, Tagliavini F, Butler CR, Santana I, Gerhard A, Ber IL, Pasquier F, Ducharme S, Levin J, Danek A, Sorbi S, Otto M, Rohrer JD, Borroni B; Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI).

*Structural brain splitting is a hallmark of Granulin-related frontotemporal dementia.*

**Neurobiol Aging** 2022;114:94-104. IF=5,133

Bouzigues A, Russell LL, Peakman G, Bocchetta M, Greaves CV, Convery RS, Todd E, Rowe JB, Borroni B, Galimberti D, Tiraboschi P, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, van Swieten JC, Seelaar H, Jiskoot L, Sorbi S, Butler CR, Graff C, Gerhard A, Langheinrich T, Laforce R, Sanchez-Valle R, de Mendonça A, Moreno F, Synofzik M, Vandenberghe R, Ducharme S, Le Ber I, Levin J, Danek A, Otto M, Pasquier F, Santana I, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative, GENFI.

*Anomia is present pre-symptomatically in frontotemporal dementia due to MAPT mutations.*

**J Neurol.** 2022;269(8):4322-32. IF=6,682

Mancuso R, Agostini S, Hernis A, Caputo D, Galimberti D, Scarpini E, Clerici M.

*Alterations of the miR-126-3p/POU2AF1/Spi-B Axis and JCPyV Reactivation in Multiple Sclerosis Patients Receiving Natalizumab.*

**Front Neurol.** 2022;13:819911. IF=4,086

Wilson KM, Katona E, Glaria I, Carcolé M, Swift JJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, Bouzigues A, Heslegrave AJ, Keshavan A, Knowles K, Patil S, Mohapatra S, Liu Y, Goyal J, Sanchez-Valle R, Laforce RJ, Synofzik M, Rowe JB, Finger E, Vandenberghe R, Butler CR, Gerhard A, Van Swieten JC, Seelaar H, Borroni B, Galimberti D, de Mendonça A, Masellis M, Tartaglia MC, Otto M, Graff C, Ducharme S, Schott JM, Malaspina A, Zetterberg H, Boyanapalli R, Rohrer JD, Isaacs AM; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*Development of a sensitive trial-ready poly(GP) CSF biomarker assay for C9orf72-associated frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry** 2022;93(7):761-71. IF=13,654

Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleineidam L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Bencheh P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bräthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen HH, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmasso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues JF, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J, Del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ,

Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrona S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL, Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalmi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivistö A, Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee CY, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W Jr, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Naemias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soininen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A, Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, Broeckhoven CV, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, Dongen JV, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal JS, Vogelsgang J, Vyhalek M, Wagner M, Wallon D, Wang LS, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakoula M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M; EADB; GR@ACE; DEGESCO; EADI; GERAD; Demgene; FinnGen; ADGC; CHARGE, Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, de Mendonça A, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze JF, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert JC.

*New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias.*

**Nat Genet.** 2022;54(4):412-36. IF=41,376

D'Anca M, Buccellato FR, Fenoglio C, Galimberti D.

*Circular RNAs: Emblematic Players of Neurogenesis and Neurodegeneration.*

**Int J Mol Sci.** 2022;23(8):4134. IF=6,208

Poos JM, MacDougall A, van den Berg E, Jiskoot LC, Papma JM, van der Ende EL, Seelaar H, Russell LL, Peakman G, Convery R, Pijnenburg YAL, Moreno F, Sanchez-Valle R, Borroni B, Laforce R Jr, Doré MC, Masellis M, Tartaglia MC, Graff C, Galimberti D, Rowe JB, Finger E, Synofzik M, Vandenberghe R, Mendonça A, Tiraboschi P, Santana I, Ducharme S, Butler C, Gerhard A, Levin J, Danek A, Otto M, Le Ber I, Pasquier F, van Swieten J, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*Longitudinal Cognitive Changes in Genetic Frontotemporal Dementia Within the GENFI Cohort.*

**Neurology** 2022;99(3):e281-e295 IF=12,258

Floro S, Carandini T, Pietroboni AM, De Riz MA, Scarpini E, Galimberti D.

Role of Chitinase 3-like 1 as a Biomarker in Multiple Sclerosis:

A Systematic Review and Meta-analysis.

**Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.** 2022;9(4):e1164. IF=11,360

Scaroni F, Visconte C, Serpente M, Golia MT, Gabrielli M, Huiskamp M, Hulst HE, Carandini T, De Riz M, Pietroboni A, Rotondo E, Scarpini E, Galimberti D, Teunissen CE, van Dam M, de Jong BA, Fenoglio C, Verderio C.

*miR-150-5p and let-7b-5p in Blood Myeloid Extracellular Vesicles Track Cognitive Symptoms in Patients with Multiple Sclerosis.*

**Cells** 2022;11(9):1551. IF=7,666

Calvi A, Tur C, Chard D, Stutters J, Ciccarelli O, Cortese R, Battaglini M, Pietroboni A, De Riz M, Galimberti D, Scarpini E, De Stefano N, Prados F, Barkhof F.

*Slowly expanding lesions relate to persisting black-holes and clinical outcomes in relapse-onset multiple sclerosis.*

**Neuroimage Clin.** 2022;35:103048. IF=4,891

Le Guen Y, Belloy ME, Grenier-Boley B, de Rojas I, Castillo-Morales A, Jansen I, Nicolas A, Bellenguez C, Dalmasso C, Küçükali F, Eger SJ, Rasmussen KL, Thomassen JQ, Deleuze JF, He Z, Napolioni V, Amouyel P, Jessen F, Kehoe PG, van Duijn C, Tsolaki M, Sánchez-Juan P, Sleegers K, Ingelsson M, Rossi G, Hiltunen M, Sims R, van der Flier WM, Ramirez A, Andreassen OA, Frikke-Schmidt R, Williams J, Ruiz A, Lambert JC, Greicius MD; Members of the EADB, GR@ACE, DEGESCO, DemGene, GERAD, and EADI Groups, Arosio B, Benussi L, Boland A, Borroni B, Caffarra P, Daian D, Daniele A, Debette S, Dufouil C, Düzel E, Galimberti D, Giedraitis V, Grimmer T, Graff C, Grünblatt E, Hanon O, Hausner L, Heilmann-Heimbach S, Holstege H, Hort J, Jürgen D, Kuulasmaa T, van der Lugt A, Masullo C, Mecocci P, Mehrabian S, de Mendonça A, Moebus S, Nacmias B, Nicolas G, Olaso R, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Peters O, Pijnenburg YAL, Popp J, Rainero I, Ramakers I, Riedel-Heller S, Scarmeas N, Scheltens P, Scherbaum N, Schneider A, Seripa D, Soininen H, Solfrizzi V, Spalletta G, Squassina A, van Swieten J, Tegos TJ, Tremolizzo L, Verhey F, Vyhalek M, Wiltfang J, Boada M, García-González P, Puerta R, Real LM, Álvarez V, Bullido MJ, Clarimon J, García-Alberca JM, Mir P, Moreno F, Pastor P, Piñol-Ripoll G, Molina-Porcel L, Pérez-Tur J, Rodríguez-Rodríguez E, Royo JL, Sánchez-Valle R, Dichgans M, Rujescu D. *Association of Rare APOE Missense Variants V236E and R251G With Risk of Alzheimer Disease.*

**JAMA Neurol.** 2022;79(7):652-63. IF=29,907

Degenhardt F, Ellinghaus D, Juzenas S, Lerga-Jaso J, Wendorff M, Maya-Miles D, Uellendahl-Werth F, ElAbd H, Rühlemann MC, Arora J, Özer O, Lenning OB, Myhre R, Vadla MS, Wacker EM, Wienbrandt L, Ortiz AB, Salazar A, Chercoles AG, Palom A, Ruiz A, Garcia-Fernandez AE, Blanco-Grau A, Mantovani A, Zanella A, Holten AR, Mayer A, Bandera A, Cherubini A, Protti A, Aghemo A, Gerussi A, Ramirez A, Braun A, Nebel A, Barreira A, Lleo A, Teles A, Kildal AB, Biondi A, Caballero-Garralda A, Ganna A, Gori A, Glück A, Lind A, Tanck A, Hinney A, Nolla AC, Fracanzani AL, Peschuck A, Cavallero A, Dyrhol-Riise AM, Ruello A, Julià A, Muscatello A, Pesenti A, Voza A, Rando-Segura A, Solier A, Schmidt A, Cortes B, Mateos B, Nafria-Jimenez B, Schaefer B, Jensen B, Bellinghausen C, Maj C, Ferrando C, Horra C, Quereda C, Skurk C, Thibeault C, Scollo C, Herr C, Spinner CD, Gassner C, Lange C, Hu C, Paccapelo C, Lehmann C, Angelini C, Cappadona C, Azuure C; COVICAT study group, Aachen Study (COVAS), Bianco C, Cea C, Sancho C, Hoff DAL, Galimberti D, Prati D, Haschka D, Jiménez D, Pestaña D, Toapanta D, Muñiz-Díaz E, Azzolini E, Sandoval E, Binatti E, Scarpini E, Helbig ET, Casalone E, Urrechaga E, Paraboschi EM, Pontali E, Reverter E, Calderón EJ, Navas E, Solligård E, Contro E, Arana-Arri E, Aziz F, Garcia F, Sánchez FG, Ceriotti F, Martinelli-Boneschi F, Peyvandi F, Kurth F, Blasi F, Malvestiti F, Medrano FJ, Mesonero F, Rodriguez-Frias F, Hanses F, Müller F, Hemmrich-Stanisak G, Bellani G, Grasselli G, Pezzoli G, Costantino G, Albano G, Cardamone G, Bellelli G, Citerio G, Foti G, Lamorte G, Matullo

G, Baselli G, Kurihara H, Neb H, My I, Kurth I, Hernández I, Pink I, Rojas I, Galván-Femenia I, Holter JC, Afset JE, Heyckendorf J, Kässens J, Damås JK, Rybniker J, Altmüller J, Ampuero J, Martín J, Erdmann J, Banales JM, Badia JR, Dopazo J, Schneider J, Bergan J, Barretina J, Walter J, Quero JH, Goikoetxea J, Delgado J, Guerrero JM, Fazaal J, Kraft J, Schröder J, Risnes K, Banasik K, Müller KE, Gaede KI, Garcia-Etxebarria K, Tonby K, Heggenlund L, Izquierdo-Sánchez L, Bettini LR, Sumoy L, Sander LE, Lippert LJ, Terranova L, Nkambule L, Knopp L, Gustad LT, Garbarino L, Santoro L, Téllez L, Roade L, Ostadrera M, Intxausti M, Kogevinas M, Riveiro-Barciela M, Berger MM, Schaefer M, Niemi MEK, Gutiérrez-Stampa MA, Carrabba M, Figuera Basso ME, Valsecchi MG, Hernandez-Tejero M, Vehreschild MJGT, Manunta M, Acosta-Herrera M, D'Angiò M, Baldini M, Cazzaniga M, Grimsrud MM, Cornberg M, Nöthen MM, Marquié M, Castoldi M, Cordioli M, Cecconi M, D'Amato M, Augustin M, Tomasi M, Boada M, Dreher M, Seilmaier MJ, Joannidis M, Wittig M, Mazzocco M, Ciccarelli M, Rodríguez-Gandía M, Bocciolone M, Miozzo M, Ayo NI, Blay N, Chueca N, Montano N, Braun N, Ludwig N, Marx N, Martínez N; Norwegian SARS-CoV-2 Study group, Cornely OA, Witzke O, Palmieri O; Pa Study Group, Faverio P, Pretoni P, Bonfanti P, Omodei P, Tentorio P, Castro P, Rodrigues PM, España PP, Hoffmann P, Rosenstiel P, Schommers P, Suwalski P, Pablo R, Ferrer R, Bals R, Gualtierotti R, Gallego-Durán R, Nieto R, Carpani R, Morilla R, Badalamenti S, Haider S, Ciesek S, May S, Bombace S, Marsal S, Pigazzini S, Klein S, Pelusi S, Wilfling S, Bosari S, Volland S, Brunak S, Raychaudhuri S, Schreiber S, Heilmann-Heimbach S, Aliberti S, Ripke S, Dudman S, Wesse T, Zheng T; STORM Study group, The Humanitas Task Force, The Humanitas Gavazzeni Task Force, Bahmer T, Eggermann T, Illig T, Brenner T, Pumarola T, Feldt T, Folseras T, Cejudo TG, Landmesser U, Protzer U, Hehr U, Rimoldi V, Monzani V, Skogen V, Keitel V, Kopfnagel V, Friaza V, Andrade V, Moreno V, Albrecht W, Peter W, Poller W, Farre X, Yi X, Wang X, Khodamoradi Y, Karadeniz Z, Latiano A, Goerg S, Bacher P, Koehler P, Tran F, Zoller H, Schulte EC, Heidecker B, Ludwig KU, Fernández J, Romero-Gómez M, Albillas A, Invernizzi P, Buti M, Duga S, Bujanda L, Hov JR, Lenz TL, Asselta R, Cid R, Valenti L, Karlsen TH, Cáceres M, Franke A.

*Detailed stratified GWAS analysis for severe COVID-19 in four European populations.*

**Hum Mol Genet.** 2022;31(23):3945-66. IF=5,121

La Rosa F, Zoia CP, Bazzini C, Bolognini A, Saresella M, Conti E, Ferrarese C, Piancone F, Marventano I, Galimberti D, Fenoglio C, Scarpini E, Clerici M.

*Modulation of MAPK- and PI3/AKT-Dependent Autophagy Signaling by Stavudine (D4T) in PBMC of Alzheimer's Disease Patients.*

**Cells** 2022;11(14):2180. IF=7,666

Ghezzi L, Cantoni C, Rotondo E, Galimberti D.

*The Gut Microbiome-Brain Crosstalk in Neurodegenerative Diseases.*

**Biomedicines** 2022;10(7):1486. IF=4,757

Bruffaerts R, Gors D, Bárcenas Gallardo A, Vandenbulcke M, Van Damme P, Suetens P, van Swieten JC, Borroni B, Sanchez-Valle R, Moreno F, Laforce R Jr, Graff C, Synofzik M, Galimberti D, Rowe JB, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, de Mendonça A, Tagliavini F, Butler CR, Santana I, Gerhard A, Ducharme S, Levin J, Danek A, Otto M, Rohrer JD, Dupont P, Claes P, Vandenberghe R;

*Genetic Frontotemporal dementia Initiative (GENFI). Hierarchical spectral clustering reveals brain size and shape changes in asymptomatic carriers of C9orf72.*

**Brain Commun.** 2022;4(4):fcac182 no IF (<3 anni)

Schönecker S, Martinez-Murcia FJ, Rauchmann BS, Franzmeier N, Prix C, Wlasich E, Loosli SV, Bochmann K, Gorri Saez JM, Laforce R Jr, Ducharme S, Tartaglia MC, Finger E, de Mendonça A, Santana I, Sanchez-Valle R, Moreno F, Sorbi S, Tagliavini F, Borroni B, Otto M, Synofzik M, Galimberti D, Vandenberghe R, van Swieten J, Butler C, Gerhard A, Graff C, Danek A, Rohrer JD, Masellis M, Rowe J, Levin J;

*Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). Frequency and Longitudinal Course of Motor Signs In Genetic Frontotemporal Dementia.*

**Neurology** 2022;99(10):e1032-e1044. IF=12,258

Nelson A, Russell LL, Peakman G, Convery RS, Bouzigues A, Greaves CV, Bocchetta M, Cash DM, van Swieten JC, Jiskoot L, Moreno F, Sanchez-Valle R, Laforce R, Graff C, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Borroni B, Finger E, Synofzik M, Galimberti D, Vandenbergh R, de Mendonça A, Butler CR, Gerhard A, Ducharme S, Le Ber I, Santana I, Pasquier F, Levin J, Otto M, Sorbi S, Rohrer JD; Genetic FTD Initiative (GENFI).

*The CBI-R detects early behavioural impairment in genetic frontotemporal dementia.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022;9(5):644-58. IF=5,430

Serpente M, Ghezzi L, Fenoglio C, Buccellato FR, Fumagalli GG, Rotondo E, Arcaro M, Arighi A, Galimberti D.

*miRNA Expression Is Increased in Serum from Patients with Semantic Variant Primary Progressive Aphasia.*

**Int J Mol Sci.** 2022;23(15):8487. IF=6,208

Sogorb-Esteve A, Nilsson J, Swift IJ, Heller C, Bocchetta M, Russell LL, Peakman G, Convery RS, van Swieten JC, Seelaar H, Borroni B, Galimberti D, Sanchez-Valle R, Laforce R Jr, Moreno F, Synofzik M, Graff C, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Vandenbergh R, Finger E, Tagliavini F, Santana I, Butler CR, Ducharme S, Gerhard A, Danek A, Levin J, Otto M, Sorbi S, Le Ber I, Pasquier F, Gobom J, Brinkmalm A, Blennow K, Zetterberg H, Rohrer JD;

*GENetic FTD Initiative. Differential impairment of cerebrospinal fluid synaptic biomarkers in the genetic forms of frontotemporal dementia.*

**Alzheimers Res Ther.** 2022;14(1):118. IF=8,831

van der Ende EL, Heller C, Sogorb-Esteve A, Swift IJ, McFall D, Peakman G, Bouzigues A, Poos JM, Jiskoot LC, Panman JL, Papma JM, Meeter LH, Dopper EGP, Bocchetta M, Todd E, Cash D, Graff C, Synofzik M, Moreno F, Finger E, Sanchez-Valle R, Vandenbergh R, Laforce R Jr, Masellis M, Tartaglia MC, Rowe JB, Butler C, Ducharme S, Gerhard A, Danek A, Levin J, Pijnenburg YAL, Otto M, Borroni B, Tagliavini F, de Mendonça A, Santana I, Galimberti D, Sorbi S, Zetterberg H, Huang E, van Swieten JC, Rohrer JD, Seelaar H;

*Genetic Frontotemporal Dementia Initiative (GENFI). Elevated CSF and plasma complement proteins in genetic frontotemporal dementia: results from the GENFI study.*

**J Neuroinflammation.** 2022;19(1):217. IF=9,589

Arighi A, Arcaro M, Fumagalli GG, Carandini T, Pietroboni AM, Sacchi L, Fenoglio C, Serpente M, Sorrentino F, Isgrò G, Turkheimer F, Scarpini E, Galimberti D.

*Aquaporin-4 cerebrospinal fluid levels are higher in neurodegenerative dementia: looking at glymphatic system dysregulation.*

**Alzheimers Res Ther.** 2022;14(1):135. IF=8,831

de Boer SCM, Woolley L, Mol MO, Serpente M, Reus LM, van Minkelen R, van Vugt JFA, Sorrentino F, Veldink JH, Seelaar H, Galimberti D, van Ruissen F, Mead S, Rogaeva E, Pijnenburg YAL, van der Lee SJ.

*Letter to the editor on a paper by Kaivola et al. (2020): carriership of two copies of C9orf72 hexanucleotide repeat intermediate-length alleles is not associated with amyotrophic lateral sclerosis or frontotemporal dementia.*

**Acta Neuropathol Commun.** 2022;10(1):141. IF=7,581

Staffaroni AM, Quintana M, Wendelberger B, Heuer HW, Russell LL, Cobigo Y, Wolf A, Goh SM, Petruccielli L, Gendron TF, Heller C, Clark AL, Taylor JC, Wise A, Ong E, Forsberg L, Brushaber D, Rojas JC, VandeVrede L, Ljubenkov P, Kramer J, Casaleotto KB, Appleby B, Bordelon Y, Botha H,

Dickerson BC, Domoto-Reilly K, Fields JA, Foroud T, Gavrilova R, Geschwind D, Ghoshal N, Goldman J, Graff-Radford J, Graff-Radford N, Grossman M, Hall MGH, Hsiung GY, Huey ED, Irwin D, Jones DT, Kantarci K, Kaufer D, Knopman D, Kremers W, Lago AL, Lapid MI, Litvan I, Lucente D, Mackenzie IR, Mendez MF, Mester C, Miller BL, Onyike CU, Rademakers R, Ramanan VK, Ramos EM, Rao M, Rascovsky K, Rankin KP, Roberson ED, Savica R, Tartaglia MC, Weintraub S, Wong B, Cash DM, Bouzigues A, Swift IJ, Peakman G, Bocchetta M, Todd EG, Convery RS, Rowe JB, Borroni B, Galimberti D, Tiraboschi P, Masellis M, Finger E, van Swieten JC, Seelaar H, Jiskoot LC, Sorbi S, Butler CR, Graff C, Gerhard A, Langheinrich T, Laforce R, Sanchez-Valle R, de Mendonça A, Moreno F, Synofzik M, Vandenbergh R, Ducharme S, Le Ber I, Levin J, Danek A, Otto M, Pasquier F, Santana I, Kornak J, Boeve BF, Rosen HJ, Rohrer JD, Boxer AL;

*Frontotemporal Dementia Prevention Initiative (FPI) Investigators. Temporal order of clinical and biomarker changes in familial frontotemporal dementia.*

**Nat Med.** 2022;28(10):2194-206. IF=87,244

Buccellato FR, D'Anca M, Serpente M, Arighi A, Galimberti D.

*The Role of Glymphatic System in Alzheimer's and Parkinson's Disease Pathogenesis.*

**Biomedicines** 2022;10(9):2261. IF=4,757

Woollacott IOC, Swift IJ, Sogorb-Esteve A, Heller C, Knowles K, Bouzigues A, Russell LL, Peakman G, Greaves CV, Convery R, Heslegrave A, Rowe JB, Borroni B, Galimberti D, Tiraboschi P, Masellis M, Tartaglia MC, Finger E, van Swieten JC, Seelaar H, Jiskoot L, Sorbi S, Butler CR, Graff C, Gerhard A, Laforce R, Sanchez-Valle R, de Mendonça A, Moreno F, Synofzik M, Vandenbergh R, Ducharme S, Ber IL, Levin J, Otto M, Pasquier F, Santana I, Zetterberg H, Rohrer JD.

*CSF glial markers are elevated in a subset of patients with genetic frontotemporal dementia.*

**Ann Clin Transl Neurol.** 2022;9(11):1764-1777. IF=5,430

Arcaro M, Fenoglio C, Serpente M, Arighi A, Fumagalli GG, Sacchi L, Floro S, D'Anca M, Sorrentino F, Visconte C, Perego A, Scarpini E, Galimberti D.

*A Novel Automated Chemiluminescence Method for Detecting Cerebrospinal Fluid Amyloid-Beta 1-42 and 1-40, Total Tau and Phosphorylated-Tau: Implications for Improving Diagnostic Performance in Alzheimer's Disease.*

**Biomedicines** 2022; 10:2667. IF=4,757

Holstege H, Hulsman M, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Grozeva D, van Rooij JGJ, Sims R, Ahmad S, Amin N, Norsworthy PJ, Dols-Icardo O, Hummerich H, Kawalia A, Amouyal P, Beecham GW, Berr C, Bis JC, Boland A, Bossù P, Bouwman F, Bras J, Campion D, Cochran JN, Daniele A, Dartigues JF, Debette S, Deleuze JF, Denning N, DeStefano AL, Farrer LA, Fernández MV, Fox NC, Galimberti D, Genin E, Gille JJP, Le Guen Y, Guerreiro R, Haines JL, Holmes C, Ikram MA, Ikram MK, Jansen IE, Kraaij R, Lathrop M, Lemstra AW, Lleó A, Luckcuck L, Mannens MMAM, Marshall R, Martin ER, Masullo C, Mayeux R, Mecocci P, Meggy A, Mol MO, Morgan K, Myers RM, Nacmias B, Naj AC, Napolioni V, Pasquier F, Pastor P, Pericak-Vance MA, Raybould R, Redon R, Reinders MJT, Richard AC, Riedel-Heller SG, Rivadeneira F, Rousseau S, Ryan NS, Saad S, Sanchez-Juan P, Schellenberg GD, Scheltens P, Schott JM, Seripa D, Seshadri S, Sie D, Sistermans EA, Sorbi S, van Spaendonk R, Spalletta G, Tesi N, Tijms B, Uitterlinden AG, van der Lee SJ, Visser PJ, Wagner M, Wallon D, Wang LS, Zarea A, Clarimon J, van Swieten JC, Greicius MD, Yokoyama JS, Cruchaga C, Hardy J, Ramirez A, Mead S, van der Flier WM, van Duijn CM, Williams J, Nicolas G, Bellenguez C, Lambert JC.

*Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease.*

**Nat Genet.** 2022;54(12):1786-1794. IF=41,376

Fenoglio C, Serpente M, Visconte C, Arcaro M, Sorrentino F, D'Anca M, Arighi A, Rotondo E, Vimercati R, Rossi G, Scarpini E, Galimberti D.

*Circulating Non-Coding RNA Levels Are Altered in Autosomal Dominant Frontotemporal Dementia.*  
**Int J Mol Sci.** 2022;23(23):14723. IF=6,208

Goker F, Mazzucato C, Maggioni M, Baj A, Giannì AB, Beltramini G, Russillo A, Buccellato FRP, Rossi DS, Mortellaro C, Del Fabbro M.

*Solitary fibrous tumor of parotid gland: a case report and short review of literature.*

**Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2022 Dec;26(3 Suppl):45-50. IF=3,784

Goker F, Grecchi F, Grecchi E, Del Fabbro M, Agliardi EL, Buccellato FRP, Greco Lucchina A, Giannì AB, Mortellaro C.

*Clinical outcomes of fully and partially threaded zygomatic implants in a cohort of patients with minimum 7.5-year follow-up.*

**Eur Rev Med Pharmacol Sci.** 2022 Dec;26(3 Suppl):35-44. IF=3,784

Bergamaschi R, Beghi E, Bosetti C, Ponzio M, Santucci C, Lepore V, Mosconi P; Italian Multiple Sclerosis and Related Disorders Register Centers Group and the Scientific Committee of Italian SM and Related Disorders Register; Aguglia U, Amato MP, Ancona AL, Ardito B, Avolio C, Balgera R, Banfi P, Barcella V, Barone P, Bellantonio P, Berardinelli A, Bergamaschi R, Bertora P, Bianchi M, Bramanti P, Morra VB, Brichetto G, Brioschi AM, Buccafusca M, Bucello S, Busillo V, Calchetti B, Cantello R, Capobianco M, Capone F, Capone L, Cargnelutti D, Carrozzi M, Cartechini E, Cavaletti G, Cavalla P, Celani MG, Clerici R, Clerico M, Cocco E, Confalonieri P, Coniglio MG, Conte A, Corea F, Cottone S, Crociani P, D'Andrea F, Danni MC, De Luca G, de Pascalis D, De Riz M, De Robertis F, De Rosa G, De Stefano N, Corte MD, Di Sazio A, Docimo R, Falcini M, Falcone N, Fermi S, Ferraro E, Ferrò MT, Fortunato M, Foschi M, Gajofatto A, Gallo A, Gallo P, Gatto M, Gazzola P, Giordano A, Granella F, Grasso MF, Grasso MG, Grimaldi LME, Iaffaldano P, Imperiale D, Inglese M, Iodice R, Leva S, Luezzi V, Lugaresi A, Lus G, Maimone D, Mancinelli L, Maniscalco GT, Marfia GA, Marini B, Marson A, Mascoli N, Massacesi L, Melani F, Merello M, Meucci G, Mirabella M, Montepietra S, Nasuelli D, Nicolao P, Passantino F, Patti F, Peresson M, Pesci I, Piantadosi C, Piras ML, Pizzorno M, Plewnia K, Pozzilli C, Protti A, Quatrale R, Realmuto S, Ribizzi G, Rinalducci S, Rini A, Romano S, Romeo M, Ronzoni M, Rossi P, Rovaris M, Salemi G, Santangelo G, Santangelo M, Santuccio G, Sarchielli P, Sinisi L, Sola P, Solaro C, Spitaleri D, Strumia S, Tassinari T, Tonietti S, Tortorella C, Totaro R, Tozzo A, Trivelli G, Olivelli M, Valentino P, Venturi S, Vianello M, Zaffaroni M, Zarbo R, Trojano M, Battaglia MA, Capobianco M, Pugliatti M, Olivelli M, Mosconi P, Gasperini C, Patti F, Amato MP, Bergamaschi R, Comi G.

*Do patients' and referral centers' characteristics influence multiple sclerosis phenotypes? Results from the Italian multiple sclerosis and related disorders register.*

**Neurol Sci.** 2022;43(9):5459-5469. IF=3,830

## 5. PARTECIPAZIONEN A EDITORIAL BOARD DI RIVISTE INTERNAZIONALI O NAZIONALI CON IF>0

- Prof. D. Galimberti – Deputy Editor della rivista Journal of Alzheimer's disease
- Prof. D. Galimberti – Coordinating Editor della rivista "Molecular Neurobiology"
- Dott. A. Arighi - Editor della rivista Journal of Alzheimer's disease

## 6. MEMBERSHIP SOCIETÀ SCIENTIFICHE

- Prof. E. Scarpini – socio fondatore e membro del Consiglio Direttivo dell'Associazione per la ricerca sulle demenze della Società Italiana di Neurologia (SINDEM)
- Prof.ssa D. Galimberti – membro del Consiglio Direttivo della SINDEM
- Dott. A. Arighi - membro del Consiglio Scientifico della SINDEM

- Prof.ssa D. Galimberti – membro del consiglio direttivo della Associazione Italiana Neuropatologia e Neurobiologia Clinica
- Prof.ssa D. Galimberti – membro della Società Italiana di Biologia e Genetica

## **7. MEMBERSHIP ASSEGNAZIONE GRANTS**

- Prof. ssa D. Galimberti membro della commissione “Reserche Translationnelle” - Agence Nationale de la Recherche (Francia)
- Prof. ssa D. Galimberti - membro della commissione per l’assegnazione grants della Research Foundation Flanders – FWO (Belgio)

## **8. FINANZIAMENTI**

- Fondazione Gigi e Pupa Ferrari Onlus 10.000 nel 2022 - UniMi - finanziamento totale E 30.000 (2021-2023)
- Ricerca Finalizzata 2018 Ministero della Salute: “Healthy versus pathological aging: role of exosome-derived non coding RNA and inflammatory transcripts in frailty and dementia” – RF-2018-12365333 – coPI – E 446826,43 (2019-2023)
- Identification of the Molecular Mechanisms of non-response to Treatments, Relapses and Remission in Autoimmune, Inflammatory, and Allergic Conditions” (Acronym: 3TR) FINANZIATO NELL’AMBITO DEL PROGRAMMA HORIZON2020, CALL “H2020-JTI-IMI2-2018-14-two-stage – partner (2019-2026)
  - JPND call 2019 “Multinational research projects on Personalised Medicine for Neurodegenerative Diseases” Project DIPPA-FTD (DIagnostic and Prognostic Precision medicine Algorithm for bvFTD) – partner – MIUR – E 147.087,50 (2020-2023)
- Ricerca Corrente IRCCS Policlinico E 103.938
- Ricerca Finalizzata Giovani Ricercatori 2019 Ministero della Salute: “DISsecting Behavioral variant frontotemporal dementia AND bipolar disorder: an integrated epigenetic-neuroimaging approach (DISBAND)”. GR-2019-12369100 – E 450.000 (2021-2024)

## **LABORATORIO CELLULE STAMINALI**

### **RESPONSABILE:**

Professor Yvan Torrente

### **BIOLOGI:**

Marzia Belicchi  
Mirella Meregalli  
Andrea Farini  
Monica Molinaro

### **BIOINGEGNERE:**

Chiara Villa

### **BIOTECNOLOGI:**

Silvia Erratico  
Miriam Mistretta  
Nefele Giarratana  
Gendenver Cadiao

### **STUDENTI IN MEDICINA:**

Luana Tripodi  
Davide Molinaro

### **STUDENTI IN BIOLOGIA:**

Stefan Bencina  
Ivanna Honcharyuk,  
Carolina Mella  
Giada Mainieri

### **STUDENTI IN BIOTECNOLOGIA:**

Claudia Crescimanna

Consuntivo dell'attività di ricerca svolta nel corso dell'anno 2022 da parte del gruppo di lavoro, diretto dal Prof. Yvan Torrente, attivo presso il Laboratorio Cellule Staminali - "Centro Dino Ferrari" dell'Università degli Studi di Milano.

Durante l'anno 2022 il gruppo di lavoro diretto dal professor Torrente ha la propria attività di ricerca nell'ambito delle patologie neuromuscolari ed in particolare delle distrofie muscolari, patologie ancora oggi prive di cure risolutive.

Anche quest'anno i progetti di ricerca del Laboratorio del Prof. Torrente hanno sviluppato principalmente due filoni sperimentali che riguardano temi quali il ruolo del sistema immunitario nelle distrofie muscolari e le cellule staminali applicate alla medicina rigenerativa in patologie degenerative e neurodegenerative.

### **Ruolo dell'immunità nelle distrofie muscolari**

L'atrofia muscolare è una delle principali caratteristiche patologiche osservate nella distrofia muscolare di Duchenne (DMD) ed è il risultato degli effetti dell'infiammazione, dello stress ossidativo e della senescenza cellulare.

Da alcuni anni il gruppo di ricerca diretto dal prof. Torrente ha approfondito lo studio dell'immunoproteasoma (iPS) derivante da una modifica del proteosoma (PS) indotta dall'interferone (sostituzione di subunità catalitiche  $\beta$  1, 2 e 5 con proteine a basso peso molecolare, LMP2 ed LMP5, e con un complesso endopeptidasi-simile, MECL1). L'immunoproteasoma è presente anche nel cuore e risulta over-espresso nel muscolo distrofico. L'up-regolazione dell'immunoproteasoma è stata osservata in concomitanza alla perdita di massa muscolare cardiaca, di infiammazione, di atrofia dei miociti e associata all'over-espressione di specie dell'ossigeno e dello sviluppo di fibrosi atriale. In un precedente lavoro, pubblicato nel 2016, il prof. Torrente e il suo gruppo di lavoro ha dimostrato che in topi distrofici *mdx* il trattamento con l'inibitore dell'immunoproteasoma ONX-0914, è in grado di modulare le caratteristiche distrofiche, riducendo la quantità di cellule infiltranti T attivate, la necrosi delle miofibre e il deposito di collagene nel muscolo scheletrico. All'inizio dell'anno 2019 gli stessi ricercatori hanno pubblicato un altro studio in cui viene ulteriormente confermata la possibilità di utilizzare il trattamento con ONX-0914 per inibire la funzione dell'immunoproteasoma, quindi impedire la formazione dell'infiltrato di cellule infiammatorie e della fibrosi nella cardiomiopatia dilatativa di topi *mdx* e migliorare la circolazione del sangue nel sistema cardiovascolare.

In questo stesso ambito nel 2022 il gruppo di ricerca diretto dal prof. Torrente ha pubblicato, sulla rivista scientifica internazionale "**International Journal of Molecular Sciences**", un lavoro sperimentale in cui ha descritto il ruolo di ONX-0914, un inibitore selettivo della subunità PSMB8 dell'immunoproteasoma, nel migliorare i tratti patologici che potrebbero promuovere la progressione della perdita muscolare nei topi *mdx* di 9 mesi.

ONX-0914 riduce il numero di macrofagi e cellule T della memoria nei muscoli e nella milza, aumentando il numero di cellule T regolatorie. Modula i marcatori infiammatori sia a livello del muscolo scheletrico sia del muscolo cardiaco, forse contrastando il rimodellamento cardiaco e l'ipertrofia. Inoltre, tampona lo stress ossidativo migliorando l'efficienza mitocondriale. Questi cambiamenti alla fine portano a una marcata diminuzione della fibrosi e, potenzialmente, a cicli di degenerazione/rigenerazione delle miofibre più controllati.

Pertanto, ONX-0914 è una molecola promettente che può rallentare la perdita di massa muscolare, con effetti collaterali relativamente bassi, in pazienti affetti da distrofia ad uno stadio moderato e avanzato.

Tra le patologie muscolari le disferlinopatie costituiscono una malattia a trasmissione autosomico recessiva causata da mutazioni nel gene della disferlina (DYSF), che codifica per la proteina disferlina. Mutazioni della DYSF portano a un'ampia gamma di fenotipi muscolari, tra di esse le principali solo la miopatia di Miyoshi (MM) e la distrofia muscolare dei cingoli 2B (LGMD2B), la seconda forma più comune fra le distrofie dei cingoli.

I sintomi generalmente esordiscono alla fine dell'infanzia e, anche se la progressione della malattia è in genere lenta, si giunge comunque nelle fasi avanzate ad una seria compromissione del cammino. La disferlina è una proteina transmembrana di tipo modulare di tipo II, sebbene la funzione di questa proteina sia solo parzialmente chiarita, la disferlina contiene sette domini per il calcio, giocando un ruolo chiave nella riparazione della membrana muscolare. La riparazione muscolare nelle disferlinopatie è quindi difettosa; sebbene gli infiltrati ricchi di macrofagi ( $M\phi$ ) siano elevati nei muscoli scheletrici danneggiati dei pazienti affetti da disferlinopatia, resta ancora oggi da indagare maggiormente il contributo del sistema immunitario alla patologia della malattia. Il numero di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria M1  $M\phi$  e delle cellule T effettive risulta aumentato nei muscoli dei topi BIAJ, che, modello animale di distrofinopatia, presentano un deficit di disferlina. Inoltre, i topi BIAJ sintomatici hanno una maggiore produzione di immunoproteasoma a livello muscolare. In questo ambito, durante l'anno 2022, il gruppo di ricerca diretto dal professor Torrente ha pubblicato uno studio sulla rivista scientifica **“Cell Death and Disease”** in cui attraverso esperimenti in vitro, utilizzando derivati del midollo osseo  $M\phi$  di topi BIAJ mostra che l'inibizione dell'immunoproteasoma provoca la downregolazione di C3aR1 e C5aR1 (proteine recettori coinvolte nel sistema del complemento) e la upregolazione del signaling associato a M2. Inoltre in questo studio viene mostrato come la somministrazione dell'inibitore dell'immunoproteasoma ONX-0914 a topi BIAJ ripristina la funzione muscolare riducendo gli infiltrati muscolari e la fibro-adipogenesi. Questi risultati hanno confermato un ruolo importante dell'immunoproteasoma nella progressione della distrofia muscolare nel topo BIAJ e suggeriscono che l'inibizione dell'immunoproteasoma può produrre effetti terapeutici benefici nelle disferlinopatie.

Negli ultimi anni molte pubblicazioni scientifiche hanno dimostrato che la composizione e la funzione di specifiche famiglie di batteri simbiotici, ricoprono un ruolo chiave nel controllo di numerose funzioni nel nostro organismo. La produzione di specifiche molecole da parte dei batteri intestinali simbiotici, è utile a contrastare i processi infiammatori e muscolo-degenerativi come quelli che caratterizzano la distrofia muscolare di Duchenne.

Sulla base di quanto riscontrabile in letteratura, è possibile ipotizzare una regolazione di tipo “endocrino” del muscolo scheletrico da parte del microbiota intestinale. Il punto di partenza è rappresentato da una alterazione dell'omeostasi microbica intestinale, a cui si associa un aumento della permeabilità dovuta a una riduzione dell'integrità delle giunzioni serrate. Ne deriva una traslocazione nel circolo sanguigno di prodotti microbici, in particolare lipopolisaccaridi, i principali componenti della membrana esterna dei batteri gram-negativi. Una volta nel sangue, le endotossine promuovono un'infiammazione sistematica che si ipotizza essere responsabile dell'atrofia muscolare e che caratterizza il muscolo DMD. In uno studio pubblicato quest'anno sulla rivista scientifica **“Embo Molecular Medicine”** il professor Torrente e il suo gruppo di lavoro hanno indagato se i batteri intestinali fossero in grado di supportare la risposta immunitaria muscolare nel modello murino di distrofia muscolare, il topo mdx. In questo studio è stata evidenziata una forte correlazione tra le caratteristiche della DMD e la relativa abbondanza del batterio Prevotella che, nell'intestino crea un microbiota altamente infiammato. Inoltre, nel lavoro viene dimostrato che l'assenza di microbi intestinali nel modello murino distrofico mdx germ-free, così come la modulazione della composizione microbica determinata dal trattamento antibiotico, sono in grado di influenzare l'immunità muscolare e la fibrosi. La colonizzazione dell'intestino dei topi mdx con il microbiota eubiotico è risultata infatti sufficiente ed efficiente per ridurre l'infiammazione e migliorare la patologia e la funzione muscolare. Questo studio, quindi, identifica un potenziale ruolo del microbiota intestinale nella patogenesi della DMD.

### **Linee di ricerca nate da collaborazioni nazionali e internazionali**

Durante il 2022 è proseguita la proficua collaborazione con il gruppo di ricerca del prof. Pompilio, vicedirettore scientifico del Centro Cardiologico Monzino, pioniere in Italia dell'impiego delle terapie biologiche avanzate in ambito cardiovascolare. Tale collaborazione ha permesso al gruppo di ricerca diretto dal prof. Torrente di pubblicare sulla rivista scientifica internazionale **“Stem Cell Research”** un lavoro in cui sono stati riprogrammati fibroblasti ottenuti da una biopsia cutanea di un

paziente distrofico, con delezione degli esoni 45-50 del gene della distrofina, al fine di generare cellule staminali pluripotenti indotte denominate iPSCs. La linea iPSC ottenuta mostrava una morfologia normale, esprimeva i caratteristici marcatori di pluripotenza, presentava un cariotipo normale e possedeva un potenziale di differenziamento multilineage (endoderma, ectoderma e mesoderma). L'utilizzo di iPSCs permette di ottenere una sorgente cellulare da pazienti con malattie rare che altrimenti non sarebbe disponibile per studi biomolecolari di risposta a nuovi farmaci.

Da molti anni il prof. Torrente collabora con numerosi colleghi impegnati in attività di ricerca di base e ricerca clinica all'interno dell'Università degli Studi di Milano e/o convenzionati con la Fondazione IRCCS Ca' Grande Ospedale Maggiore di Milano; in particolare, durante il 2022, la sinergia di diverse competenze cliniche e biologiche ha permesso la pubblicazione, sulla rivista internazionale **"Haematologica"**, di uno lavoro in cui è stato studiato il long non-coding RNA NEAT1 in cellule umane di mieloma multiplo. Il long non-coding RNA NEAT1 è un componente strutturale nucleare delle paraspecie (PS) ed è già stato dimostrato essere coinvolto nella deregolazione del mieloma multiplo (MM). In questo studio viene mostrato che il silenziamento di NEAT1 impatta negativamente sulla proliferazione e sulla vitalità delle cellule di mieloma multiplo, sia in vitro che in vivo, suggerendo un ruolo nella riparazione dei danni al DNA (DDR). I ricercatori hanno dimostrato che la sovraespressione di NEAT1 è associata ad un incremento della sopravvivenza ed a una maggiore resistenza alle terapie oncologiche nelle cellule MM esposte a carenza di nutrienti o ad un microambiente ipossico, che sono condizioni di stress associate a molte forme tumorali aggressive. Questo studio fornisce nuove importanti informazioni sul ruolo di NEAT1 nel supportare l'adattamento delle cellule MM a condizioni stressanti migliorando il mantenimento dell'integrità del DNA. I risultati ottenuti suggeriscono infatti, che NEAT1, e probabilmente gli organelli PS, potrebbero rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico per il trattamento del MM.

Da qualche anno il gruppo di ricerca diretto dal prof. Torrente collabora con la società NovyStem, spin off impegnata nello sviluppo di tecnologie e metodologie volte a proporre soluzioni innovative di medicina rigenerativa così come il supporto allo sviluppo di nuovi farmaci. Nel 2022 questa collaborazione ha portato alla pubblicazione di un lavoro sulla rivista scientifica internazionale **"Cellular and Molecular Life Sciences"** in cui viene descritto un protocollo high-throughput altamente efficiente per l'isolamento di plasma ricco di piastrine (PRP) arricchito di cellule pro-angiogeniche (AngioPRP). Il protocollo descritto nel lavoro dimostra l'efficacia dell'AngioPRP nel promuovere il processo di guarigione che include la chiusura di una ferita, la riepitellizzazione, la crescita del tessuto di granulazione e la rigenerazione dei vasi sanguigni. La guarigione ritardata delle ferite e le lesioni cutanee croniche rappresentano ad oggi un grave problema di salute. Negli ultimi anni, i fattori di crescita mediati dal plasma ricco di piastrine (PRP) e le terapie cellulari sono state sviluppate come trattamento efficace ed economico in grado di migliorare la capacità di guarigione delle ferite. Nel complesso, i risultati ottenuti dagli esperimenti in vitro ed in vivo descritti in questa pubblicazione forniscono un quadro preciso su come l'AngioPRP supporta la guarigione delle ferite, aprendo strade per ulteriori progressi clinici.

Durante il 2022 il professor Torrente ha continuato la sua attività di revisore di lavori scientifici per numerose prestigiose riviste internazionali e di progetti di ricerca ministeriali e internazionali; inoltre da alcuni anni fa parte dell'editorial board delle riviste scientifiche *Scientific Reports* e *CellR4* che sono giornali multidisciplinari focalizzati in particolare sulla riprogrammazione, differenziamento e rigenerazione cellulare; continua il suo impegno quale Consigliere della Stem Cell Research Italy (SCR) e di UNISTEM e da quest'anno è anche Membro della Commissione Scientifica TACT (TREAT-NMD Advisory Committee for Therapeutics).

Infine nel 2022 il prof. Torrente, ha continuato la sua attività didattica presso l'Università degli Studi di Milano quale docente del V anno di Medicina e della scuola di specializzazione in Neurologia e per la lezione "Cellule staminali e medicina rigenerativa" all'interno del Master di Farmacologia Oncologica del Prof Alberto Corsini del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, docente per il seminario integrativo "Fisiologia e biochimica cellulare di cellule staminali per la terapia di malattie neuromuscolari" del Corso di Fisiologia (Docente Ref. Prof. Roberto Maggi) CdL

Magistrale a ciclo unico in Farmacia – Facoltà di Scienze del Farmaco e docente per il VII° modulo del Corso di Master in Farmacia e Farmacologia Oncologica del Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari. Inoltre è responsabile del Master in Single Cell analysis per il Corso di Dottorato di ricerca in Medicina Traslazionale – Università degli Studi di Milano.

## PRODUTTIVITÀ SCIENTIFICA 2022

### ELENCO PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI RECENSITE

Elisa Taiana, Cecilia Bandini, Vanessa Katia FavaSuli, Domenica Ronchetti, Ilaria Silvestris, Noemi Puccio, Katia Todoerti, Silvia Erratico, Domenica Giannandrea, Niccolò Bolli, Nicola Amodio, Alessia Ciarrocchi, Raffaella Chiaramonte, Yvan Torrente, Roberto Piva, and Antonino Neri

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milan, Italy

*Activation of long non-coding RNA NEAT1 leads to survival advantage of multiple myeloma cells*  
**HAEMATOLOGICA** Jan 1;108(1):219-233. **I.F.: 11.047**

Luana Tripodi, Chiara Villa, Davide Molinaro , Yvan Torrente and Andrea Farini

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milan, Italy

*Effective high-throughput isolation of enriched platelets*

**CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES** 79:259

**I.F.: 9.78**

Farini, L. Tripodi, C. Villa, F. Napolitano, F. Strati, D. Molinaro, F. Facciotti, B. Cassani and Y. Torrente

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milan, Italy

*Inhibition of the immunoproteasome modulates innate immunity to ameliorate muscle pathology of dysferlin-deficient BlAJ mice*

**CELL DEATH AND DISEASE** (2022) 13:975

**I.F.: 8.469**

*Luana Tripodi, Davide Molinaro, Francesco Fortunato, Carolina Mella, Barbara Cassani, Yvan Torrente and Andrea Farini*

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milan, Italy

Immunoproteasome Inhibition Ameliorates Aged Dystrophic Mouse Muscle Environment

**INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES** 2022, 23, 14657

**I.F.: 6.208**

Andrea Farini, Luana Tripodi, Chiara Villa, Francesco Strati , Amanda Facoetti, Guido Baselli, Jacopo Troisi, Annamaria Landolfi, Caterina Lonati, Davide Molinaro, Michelle Wintzinger, Stefano Gatti, Barbara Cassani, Flavio Caprioli, Federica Facciotti, Mattia Quattrocelli & Yvan Torrente

Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, Università degli Studi di Milano, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Centro Dino Ferrari, Milan, Italy

Microbiota Dysbiosis Influences Immune System And Muscle Pathophysiology Of dystrophin-Deficient Mice

**EMBO MOLECULAR MEDICINE** e16244 | 2022

**I.F.: 12.137**

Davide Rovina Elisa Castiglioni, Sara Mallia, Martina Rabino, Andrea Farini, Marzia Belicchi, Giusy Di Giuseppe, Cristina Gervasini, Yvan Torrente, Giulio Pompilio, Aoife Gowran  
Stem Cell Laboratory, Department of Pathophysiology and Transplantation, University of Milan,  
Unit of Neurology, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Dino Ferrari  
Center, 20122 Milan, Italy

*Reprogramming of dermal fibroblasts from a Duchenne muscular dystrophy patient carrying a deletion of exons 45–50 into an induced pluripotent stem cell line (CCMi005-A)*

**STEM CELL RESEARCH 64 (2022) 102889**

**I.F.: 1.587**

**ELENCO DEI PROGETTI DI RICERCA FINANZIATI ED ANCORA IN CORSO**

“Investigating Molecular Mechanisms Underlying Dose-Effect of Gold nanoclusters (Au8-pXs) in Friedreich Ataxia Patients” (Acronimo: NanoHealth), UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO codice ASS\_NAZ22CVILL\_01

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 60000 euro

“Ruolo Microbiota nelle distrofie muscolari, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico”

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 89000 euro

“At the origin of congenital muscular dystrophy: shedding light on the Tdark proteins DPM2 and DPM3” Codice n. GJC21084, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO

Ruolo nel Progetto: Co-PI

Finanziamento: 24000 euro

“Modelling of neuromuscular unit to discover pathogenic mechanisms and discover new biomarkers for neuromuscular diseases” Codice: PR-0449, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 100000 euro

Progetto PlagenCell Analisi mesoangioblasti DMD trasdotti, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 55000 euro

Progetto 5x1000 RC5-MIUR2018 “Geni espressi nelle cellule staminali e ruolo nella progressione della DMD”, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 50000 euro

CURATASSIA - prosieguo " Validazione del sistema di editing genetico in modelli cellulari di atassia di Friedreich " COD. PR-0303, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 50000 euro

“Gene transfer of human frataxin protein (FXN) using engineered stem cells for the treatment of Friedreich’s ataxia (FRDA)” COD. PR-0274, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 50000 euro

Ricerca Finalizzata 2016 - cod. MI-0065, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 150000 euro

“Gene transfer of human frataxin protein (FXN) using engineered stem cells for the treatment of Friedreich’s ataxia (FRDA)” COD. PR-0231, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 60000 euro

Fondazione OPSIS PR-0211, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 16000 euro

Force 4 Cure ID 2526393 “PiattaFORme CEllulari per (4) la riCerca e lo svilUppo di teRapie avanzatE in life science” COD. RE-LOM-004, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 240000 euro

“Generation of Lentivirus suitable for b-Sarcoglycan Delivery and Targeting of Cardiac and Skeletal Muscle as Alternative Therapy of LGMD2E” UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO

Ruolo nel Progetto: PI

Finanziamento: 560000 euro

AFM progetto INTLI21YT0RR01, UNIVERSITA’ DEGLI STUDI DI MILANO

Ruolo nel Progetto: co-PI

Finanziamento: 7550 euro

## **ELENCO COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI E NAZIONALI DEL LABORATORIO CELLULE STAMINALI**

- Luis Garcia, UPMC Um76, Inserm U974, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, Paris, France
- Camillo Ricordi, Director of the Diabetes Research Institute (DRI) and the Cell Transplant Center, University of Miami (UM), Miami, Florida
- Giulio Cossu, Institute of Infalmmation and repair, University of Manchester, Manchester, UK
- Fulvio Mavilio, Scientific Director of Genethon, Evry, France
- Pura Muñoz Cánores, ICREA Research Professor and Cell Biology Professor at the Department of Experimental and Life Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain
- Jacques Tremblay, Centre de recherche, Centre hospitalier de l’Université de Montréal, (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada

- Joao da Silva Bizarro, AADM/UNAERP Ribeirao Preto, Sao Paolo, Brazil
- Humberto Cerrel Bazo, direttore Dipartimento Medicina riabilitativa AUSL Piacenza
- Adolfo Lopez de Munain Arregui, Grupo Nerogenética, Hospital Donostia-Unidad Experimental San Sebastian, Espana
- Kay Davies, Department of Physiology, Anatomy and Genetics, University of Oxford, Oxford, UK
- Maurilio Sampaolesi, Stem Cell Research Institute, University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium, Human Anatomy Section, University of Pavia, Pavia, Italy, Interuniversity Institute of Myology (IIM), Italy
- Gillian Butler-Brown and Vincent Mouly, Institut de Myologie, Institut national de la sante' et de la recherche me' dicale, and L'Universite' Pierre et Marie Curie Paris, Paris, France
- Giuseppe Perale, I.B.I. S/A, Svizzera, Dipartimento di Chimica, Materiali e Ingegneria Chimica "Giulio Natta" Sezione Chimica Fisica Applicata, Politecnico di Milano, Milano
- Roberto Maggi, Professore universitario di seconda fascia Fisiologia, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano
- Mario Pellegrino, Prof. Associato presso il Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie in Medicina e Chirurgia, Università di Pisa
- Daniele Cusi, Professore di Nefrologia, Università degli Studi di Milano
- Cristina Barlassina, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria, Università degli Studi di Milano
- Anna Spada, U.O. di Endocrinologia e Diabetologia, Dipartimento di Scienze Mediche, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico
- Irene Cettin, Direttore UO Complessa di Ostetricia e Ginecologia, Direttore Centro di Ricerche Fetal Giorgio Pardi, Università degli Studi di Milano - Polo Universitario Ospedale L. Sacco di Milano
- Paola Rossi, Professore universitario per il settore scientifico disciplinare BIO09 (Fisiologia Generale) presso il Dipartimento di Scienze Fisiologiche e Farmacologiche cellulari e molecolari- Sezione di Fisiologia dell'Università di Pavia.
- Angelo Poletti, Biologia Applicata, Università degli Studi di Milano, Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Milano
- Silvio Bicciato, bioinformatics unit, Faculty of Biosciences and Biotechnologies, University of Modena and Reggio Emilia
- Enrico Tagliafico, clinical Biochemistry, University of Modena and Reggio Emilia
- Sergio Abrignani, direttore del National Institute of Molecular Genetics (INGM), Milan, Italy
- Silvano Bosari, direttore UOC Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Dipartimento di Fisiopatologia Medico-Chirurgica e dei Trapianti, Università degli Studi di Milano
- Carlo Agostoni, Direttore della Clinica Pediatrica II dell'Università degli Studi, IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Lorenza Lazzari Cell Factory Center for Transfusion Medicine, Cell Therapy and Criobiology, Department of Regenerative Medicine, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano

- Laura Porretti, referente del Servizio di Citofluorimetria e Core Facility di Citofluorimetria e Cell Sorting del Laboratorio Analisi, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Agostino Corteletti, direttore UOC Ematologia I e Centro Trapainti Midollo, Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico
- Giuseppe D'Antona, Department of Molecular Medicine, University of Pavia, Pavia, Italy LUSAMMR, Laboratory for Motor Activities in Rare Diseases, Sport Medicine, Centre Voghera, Voghera, Italy
- Enzo Nisoli, Center for Study and Research on Obesity, Department of Medical Biotechnology and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy;
- Dario Parazzoli, Imaging Facility IFOM Foundation – The FIRC Institute of Molecular Oncology Foundation, Milan, Italy
- Stefano Campaner, Center for Genomic Science of IIT@SEMM; Istituto Italiano di Tecnologia (IIT); Milan, Italy
- Francesco Nicassio, Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology, IFOM-IEO Campus
- Luciano Conti, Laboratory of Stem Cell Biology, CiBio, Università di Trento
- Alessandro Quattrone, Director of CiBio, University of Trento
- Elena Cattaneo, Department of Biosciences and Centre for Stem cell Research, Università degli Studi di Milano
- Giovanna Cantarella, Dirigente Medico Otorinolaringoiatra e Foniatria, Padiglione Monteggia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Mauro Pluderi e Nadia Grimoldi, UO Neurochirurgia, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
- Paolo Vezzoni, Dirigente di Ricerca e Responsabile dell'Unità Operativa di Supporto (UOS) dell'Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) del CNR.
- Marina Bouchè, Unit of Histology, and IIM, Sapienza University, DAHFMO, Rome, Italy
- Davide Gabellini, Dulbecco Telethon Institute and Division of Regenerative Medicine, San Raffaele Scientific Institute, Milan
- Franco Rustichelli, Dipartimento di Scienze Cliniche e Odontostomatologiche, Sezione di Biochimica, Biologia e Fisica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy
- Silvia Della Bella, Lab of Clinical and Experimental Immunology, Humanitas Clinical and Research Center, Rozzano (MI), Italy, Department of Medical Biotechnologies and Translational Medicine, University of Milan, Milan, Italy
- Aldo Pagano, Department of Experimental Medicine, University of Genoa, Genoa, Italy, IRCCS Azienda Ospedaliera Universitaria San Martino-IST, Genova, Italy
- Francesco Meinardi, Professore di Fisica della Materia, l'Università di Milano Bicocca
- Jose F Rodriguez-Matas-, Associate professor, LabS ([www.labsmech.polimi.it](http://www.labsmech.polimi.it)) Chemistry, Materials and Chemical Engineering Department “Giulio Natta” Politecnico di Milano, Italy
- Giorgio Roberto Merlo, Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la salute- Università di Torino

- Giorgio Pajardi, Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità, Università degli Studi di Milano, Direttore U.O.C. di Chirurgia e Riabilitazione della Mano Ospedale S. Giuseppe Milano, Gruppo MultiMedica IRCCS
- Dr Yuri D'Alessandra – Unità di Immunologia e genomica funzionale, Centro Cardiologico Monzino IRCCS, Milan, Italy
- Prof. Stefano Biressi – Centro di Biologia Integrata – CIBIO, Università degli Studi di Trento
- Prof. Lorenzo Bello - Neurochirurgia Oncologica, Humanitas, Milano
- Prof. Alberto Priori - U.O.C. Neurologia, Ospedale San Paolo, Milano
- Prof. Pierluigi Mauri – Istituto di Tecnologie Biomediche, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ITB), Milano
- Prof.ssa M.G. Bruzzone – UOC Neuroradiologia, Istituto Neurologico Besta, Milan, Italy
- Prof. Simone Guglielmetti - Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente, Università degli Studi di Milano, Milano
- Prof. Umberto Galderisi – Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi della Campania "Luigi Vanvitelli"
- D.ssa Barbara Cassani – Istituto di Genetica e Biomedicina (IRGB), National Research Council (CNR) Milano
- Prof. Sabrina Sacconi – Nice University Hospital, Nice, France
- Mattia Quattrocelli – Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Department of Pediatrics, Heart Institute, University of Cincinnati College of Medicine and Molecular Cardiovascular Biology Division, Cincinnati, OH 45229, USA

## **STROKE UNIT**

### **RESPONSABILE:**

Dott. ssa Sara Bonato

### **MEDICI:**

Dott.ssa Isabella Ghione

Dott.ssa Silvia Lanfranconi

Dott.ssa Megi Meneri

Dott. Gianluca Costamagna

Nel corso dell'anno 2022, in relazione alle più recenti linee guida internazionali, abbiamo applicato il percorso diagnostico-terapeutico assistenziale (PDTA) dell'ictus ischemico acuto di Fondazione, garantendo le più avanzate procedure diagnostiche che consentono l'ampliamento della finestra terapeutica fino a 24 ore dall'esordio del deficit neurologico.

Stiamo portando avanti la raccolta in un database dedicato in cui vengono raccolti, sia in modo retrospettivo che prospettico, i dati di tutti i pazienti ricoverati in Stroke Unit con diagnosi di ictus ischemico acuto. Tali dati vengono utilizzati nell'ambito di alcuni progetti di ricerca riguardanti la sicurezza e l'efficacia delle procedure di rivascolarizzazione in fase acuta in sottogruppi specifici.

## **1) Terapia in acuto dell'ictus ischemico lieve**

Attraverso il punteggio NIHSS il deficit clinico derivante dallo stroke ischemico può essere quantificato e categorizzato in base alla gravità. Uno stroke con punteggio NIHSS < 6 viene definito lieve. La gestione terapeutica acuta dell'ictus ischemico lieve è particolarmente controversa. Mentre nel caso di ictus particolarmente gravi, il bilancio rischio/beneficio dell'intervento terapeutico di rivascolarizzazione (rtPA e/o trombectomia meccanica) tende a favorire l'intervento terapeutico, nei casi di ictus lieve, la scelta è più complessa. Ad oggi, esiste incertezza su quale sia la scelta terapeutica migliore per l'ictus ischemico lieve (NIHSS < 6). La letteratura scientifica è al momento lacunosa e le linee guida disponibili sono discordanti. In attesa di dati provenienti da trial randomizzati, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare le caratteristiche clinico/radiologiche e l'outcome dei pazienti con ictus ischemico acuto lieve, trattati con solo rtPA vs pazienti trattati sia con rTPA che con trombectomia meccanica con l'intento di fornire uno strumento addizionale in grado di aiutare le scelte terapeutiche in questo sottogruppo di pazienti. I pazienti vengono categorizzati in base al punteggio NIHSS all'arrivo in PS: ictus lieve (NIHSS < 6) vs ictus non-lieve (NIHSS > 5). Differenze clinico/radiologiche e di outcome funzionale a 90 giorni vengono valutate nei due gruppi attraverso modelli di analisi univariata. Le analisi vengono poi aggiustate in base alla terapia ricevuta. L'outcome dei pazienti con ictus lieve che hanno ricevuto una terapia di rivascolarizzazione (rtPA da solo, rtPA + trombectomia meccanica oppure solo trombectomia meccanica). È stato confrontato con l'outcome di pazienti con clinica analoga che non hanno ricevuto un trattamento in acuto. Attraverso modelli di regressione logistica (univariata e multivariata) è stata valutata e quantificata l'associazione tra l'intervento terapeutico in acuto e l'outcome funzionale a 90 giorni dall'ictus. Nei pazienti con NIHSS < 6, attraverso modelli di regressione logistica (univariata e multivariata), è stata valutata e quantificata l'associazione tra l'intervento terapeutico in acuto e la presenza di complicanze emorragiche intracraniche.

Il primo lavoro dal titolo: Intravenous thrombolysis + endovascular thrombectomy versus thrombolysis alone in large vessel occlusion mild stroke: a propensity score matched analysis " che illustra i risultati di questo studio, è recentemente stato accettato dalla rivista "European Journal of Neurology" ed è in corso di pubblicazione.

## **2) Neuroimaging avanzato nella gestione acuta dello stroke ischemico: dalla finestra temporale alla finestra di parenchima**

Classicamente il trattamento con trombolisi endovenosa in pazienti con ictus ischemico acuto può essere somministrato entro le 4.5 ore dall'esordio dei sintomi, mentre il trattamento di trombectomia meccanica entro le 6 ore. Maggiore è il tempo trascorso dall'esordio dei sintomi e 1) maggiore è il

tessuto andato incontro a ischemia non reversibile (core ischemico) e 2) minore è il tessuto ipossico salvabile (penombra ischemica). Le tecniche avanzate di neuroimaging, come gli studi di perfusione, sono state recentemente impiegate in acuto per individuare pazienti con tessuto cerebrale salvabile anche oltre le classiche finestre temporali. Se vengono soddisfatti alcuni stringenti criteri neuroradiologici legati a parametri derivanti da studi di perfusione, si può intervenire con la trombolisi endovenosa fino alle 9 ore dall'esordio dei sintomi e fino a 24 ore nel caso della trombectomia meccanica.

L'obiettivo dello studio, che è proseguito anche nel 2022, è quello di valutare l'applicazione della TC-perfusione nell'individuazione di parametri neuroradiologici in grado di predire l'outcome di pazienti con stroke ischemico acuto dopo procedura di rivascolarizzazione (trombolisi endovenosa e/o trombectomia meccanica) entro classica la finestra terapeutica di tempo.

E' in corso l'arruolamento di pazienti maggiorenni con diagnosi di ictus ischemico acuto che trattati entro le 4.5 ore (rtPA) ed entro le 6 ore (trombectomia meccanica) ed eseguito studio CT-perfusione in acuto.

Vengono raccolti dati clinici e neuroradiologici, con particolare attenzione ai fattori di rischio cardio-cerebrovascolari e a dati provenienti da studi avanzati di neuroimaging (es. TAC-Perfusione).

I pazienti vengono quindi categorizzati principalmente in base alla diagnosi alla dimissione (ictus ischemico o ictus emorragico), alla terapia anti-trombotica in atto al momento dell'evento indice, al trattamento ricevuto in fase acuta (trombolisi endovenosa, trombectomia meccanica, entrambi i trattamenti, nessun trattamento), evidenze derivanti dagli studi di neuroimaging avanzato in fase acuta, terapia di prevenzione secondaria indicata alla chiusura del ricovero e condizione clinico/funzionale a 3-6 mesi dall'evento indice.

Dopo aver categorizzato i pazienti in base all'outcome a 90 giorni verrà valutata la differenza di parametri clinici e radiologici nei due gruppi. Particolare attenzione verrà data alla valutazione di differenze significative nei parametri di CT-perfusione.

Successivamente i pazienti trattati in acuto verranno categorizzati in base alla presenza o assenza di criteri di finestra di parenchima sfavorevole. L'outcome a 90 giorni verrà valutato nei due gruppi alla ricerca di eventuali differenze statisticamente significative. In altre parole si valuterà l'associazione tra l'outcome a 90 giorni dall'evento e la presenza di criteri di finestra parenchimale sfavorevole.

Tramite la costruzione di una curva ROC, verrà valutata la capacità predittiva dei valori derivanti dallo studio CT-perfusione per l'outcome a 90 giorni. In particolare si valuterà se la presenza di criteri neuro-radiologici di finestra parenchimale sfavorevole sono in grado di predire l'outcome funzionale a 90 giorni, indipendentemente dalla finestra temporale.

### **3) POLIclinico Ischemic Stroke Thrombi Analysis Registry (POLISTAR): Registro sull'analisi dei trombi in pazienti con ictus ischemico**

La definizione dell'eziologia in pazienti ictus ischemico acuto (IIA) è fondamentale per selezionare strategie di prevenzione secondaria adeguate. Sebbene l'IIA sia causato nella maggior parte dei casi da aterosclerosi, sorgenti cardioemboliche o sofferenza dei piccoli vasi cerebrali, fino al 30% degli IIA hanno eziologia sconosciuta all'atto della dimissione dopo un adeguato percorso diagnostico. Nell'ultimo decennio, grazie ai risultati di svariati trials clinici sull'uso della trombectomia meccanica, cioè un approccio interventistico basato sull'uso di un catetere transcutaneo per la rimozione di trombi occludenti un grande vaso, e dell'endoarterectomia carotide, sono oggi a

disposizione i trombi recuperati grazie a tali procedure per analisi anatomico-patologiche, biochimiche e molecolari, potenzialmente utili per la definizione diagnostica dell'IIA.

I Registri consentono la raccolta di dati nell'ambito della pratica clinica e rappresentano un valido strumento per la ricerca clinica. Costituiscono, quindi, una base ideale per sviluppare studi volti a rispondere a molteplici ipotesi di ricerca, partendo da dati di real-life. In questo senso, è importante notare come i pazienti affetti da disturbi cerebrovascolari come l'IIA rappresentino un'ampia popolazione caratterizzata da complessità clinica, biologica e sociale. Al fine di studiare più accuratamente tale complessità e fornire pragmatiche risposte ai bisogni della popolazione, è necessario standardizzare e raccogliere informazioni atte a meglio definire clinicamente tali con insorgenza acuta e conseguenze e potenziale disabilità cronica e capirne l'eziologia e i meccanismi biologici sottostanti, così da scoprire nuovi approcci diagnostici e target terapeutici.

Parallelamente al registro, si sviluppano le biobanche per la raccolta di dati biologici, unità di servizio deputate alla raccolta organizzata e alla conservazione di uno o più tipi diversi di tessuti biologici (come materiale biologico da procedure interventistiche, sangue, tessuto, cellule, DNA) da destinare alla ricerca, per analisi da condurre in tempi successivi alla loro raccolta, con la finalità di testare singole o multiple ipotesi.

L'obiettivo di tale studio è principalmente la raccolta, la conservazione ed l'organizzazione di materiale biologico (siero, plasma, cellule da sangue periferico e/o paxgene tubes per RNA, trombi da trombectomia meccanica e placche aterosclerotiche da endoarteriectomia carotidea) raccolto durante il PDTA di pazienti adulti con IIA al fine di generare una biobanca di ricerca.

Tale raccolta è cominciata negli ultimi mesi del 2022 e proseguirà per almeno 36 mesi.

Per la messa a punto del suddetto protocollo di ricerca è stata portata avanti una ricerca bibliografica i cui dati sono stati raccolti in una review dal titolo "Advancing Stroke Research on Cerebral Thrombi with Omic Technologies" in corso di sottomissione.

#### 4) CCM

È proseguito anche nel 2022 l'interesse per un altro grande capitolo trattato da alcuni membri del team Stroke, quello per l'angiomasosi multipla cerebrale quale causa rara di emorragia intraparenchimale.

La Fondazione IRCCS Cà Granda è centro di riferimento per la diagnosi e la cura della patologia. Nel nostro centro il paziente viene inquadrato dal punto di vista clinico, radiologico e genetico molecolare; vengono infatti studiati i tre geni le cui mutazioni sono causa della formazione di angiomi multipli: CCM1, CCM2 e CCM3.

Il Policlinico è Centro Coordinatore dello studio prospettico multicentrico italiano Treat CCM, finanziato da AIFA, volto a verificare i potenziali effetti benefici del trattamento con Propranololo in questa patologia. Lo studio è tuttora in corso.

#### 5) Neuday 2022

Anche nel 2022 la nostra Stroke Unit ha partecipato alla raccolta dati riguardanti Urgenze Neurologiche nell'ambito del NEUDAY, iniziativa portata avanti dalla Società Italiana di Neurologia d'Urgenza con la quale abbiamo collaborato anche in questa edizione.

Le finalità del NEUDay 2022 sono state:

- l'acquisizione dei dati dalla maggior parte dei PS/DEA operanti nel territorio nazionale che vedano la presenza del neurologo afferente alla UO aperta all'urgenza

- la pubblicizzazione delle stesse informazioni a livello degli organismi locali, regionali e nazionali di gestione della assistenza in emergenza-urgenza
  - la possibile divulgazione dei dati così ottenuti negli ambiti propri delle varie specialità afferenti alle urgenze
  - la diffusione dei dati raccolti in ambito scientifico, con la stesura di articoli divulgativi dedicati
- L’edizione di quest’anno ha presentato alcune importanti novità rispetto alle passate edizioni e nello specifico:
- La rivisitazione della scheda paziente PS/DEA
  - L’inserimento di una scheda paziente per le visite neurologiche urgenti effettuate presso i reparti di degenza
  - L’inserimento di una survey sulle caratteristiche organizzative degli ospedali.

I risultati della medesima iniziativa dello scorso anno hanno portato alla pubblicazione di un lavoro dal titolo: *Lombardy section of the Italian Association for Emergency Neurology (ANEU). A snapshot of emergency neurology management in the Lombardy Region, Italy.*

### **Elenco delle Pubblicazioni Scientifiche**

Meneri M, Bonato S, Gagliardi D, Comi GP, Corti S.

*New Insights into Cerebral Vessel Disease Landscapes at Single-Cell Resolution: Pathogenetic and Therapeutic Perspectives.*

**Biomedicines.** 2022 Jul 13;10(7):1693.

Zanferrari C, Salmaggi A;

*Lombardy section of the Italian Association for Emergency Neurology (ANEU). A snapshot of emergency neurology management in the Lombardy Region, Italy.*

**Neurol Sci.** 2022 Aug; 43(8):4917-4923. Epub 2022 Apr 20. Erratum in: Neurol Sci. 2022 Jun 1.



## **SEZIONE DISTACCATA CENTRO “DINO FERRARI”**

**DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE LABORATORIO SPERIMENTALE DI  
NEUROSCIENZE ISTITUTO AUXOLOGICO ITALIANO IRCCS  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**

### **DIRETTORE:**

Prof. Dott. Vincenzo Silani

### **DIRETTORE U.O. NEUROLOGIA dal 01.11.2022**

Prof. Nicola Ticozzi

### **DIRETTORE U.O. NEUROFISIOLOGIA DAL 01.04.2022**

Dott. Luca Maderna

### **MEDICI:**

Dott. Stefano Messina

Dott. Andrea Ciambola

Dott.ssa Claudia Morelli

Dott.ssa Barbara Corrà

Dott. Alberto Doretti

Dott.ssa Daniela Ungaro

Dott.ssa Eleonora Colombo

Dott. Alessio Maranzano

Dott.ssa Paola Mattaliano

### **RICERCATORI:**

Dott.ssa Barbara Poletti

Dott. Federico Verde

### **PSICOLOGI:**

Dott.ssa Annalisa Lafronza

Dott. Laura Carelli

Dott.ssa Federica Solca

Dott.ssa Alessandra Gnesa

Dott.ssa Sofia Tagini

Dott.ssa Roberta Fratoni

Dott.ssa Silvia Torre

**PNEUMOLOGO:**

Dott. Paolo Banfi

**CONSULENTI NEUROLOGI:**

Dott.ssa Laura Adobbati

Dott. Luca Campana

Dott. Riccardo Doronzo

**TECNICI DI NEUROFISIOLOGIA:**

Dott. Gianluca Demirtzidis

Barbara Riccardi

Francesca Gregorini

Anna Motta

Valeria Di Stefano

Aurora Cremonesi

Davide Reggi

**STUDY NURSE CENTRO TRIAL CLINICI:**

Dott.ssa Martina Sodano

**SEGRETARIA SCIENTIFICA DIPARTIMENTO NEUROLOGIA**

Patrizia Nelli

**LABORATORIO SPERIMENTALE DI RICERCHE DI NEUROSCIENZE**

**PROFESSORE ASSOCIATO GENETICA:**

Dott.ssa Antonia Ratti

**BIOLOGI:**

Dott.ssa Patrizia Bossolasco

Dott. Alberto Brusati

Dott.ssa Claudia Colombrita

Dott.ssa Sabrina Invernizzi

Dott.ssa Chiara Lattuada

Dott.ssa Ilaria Milone

Dott.ssa Serena Santangelo

Dott.ssa Marta Sorce

**BIOTECNOLOGI:**

Dott.ssa Silvia Peverelli

Dott. Valeria Casiraghi

## **Rapporti di collaborazione:**

### **Nazionali:**

- Prof. Giacomo Comi, Prof. Stefania Corti, Dott.ssa Daniela Galimberti, Dott. Prof. Elio Scarpini, Dott. Alessio di Fonso **“Centro Dino Ferrari” IRCCS Ca’ Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, Milano**
- Dott.ssa Cinzia Gellera, Dott. Franco Taroni, Prof. Giuseppe Lauria Pinter, Dott.ssa Giacomina Rossi, Dott. Frabrizio Tagliavini, Dott. Pietro Tiraboschi, Dott. F. Moda **IRCCS Istituto C. Besta, Milano**
- Prof.ssa Valeria Sansone **Centro Clinico Nemo, Milano**
- Prof.ssa Carolina Lombardi **Centro Sonno Istituto Auxologico Italiano IRCCS, Milano**
- Prof. Luca Persani **Dipartimento di Endocrinologia IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano**
- Prof.ssa Palma Finelli, Dott.ssa Daniela Giardino, **Laboratorio di Citogenetica, IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Milano**
- Dott. Luigi Sironi, Dott. A.E. Rigamonti, **Dipartimento di Farmacologia Università di Milano-CEND**
- Prof. Fabio Triulzi, Dott. Alessandro Sillani, Dott.ssa Clara Sina, Dott. Giorgio Conte, Ing. Valeria Contarino, **IRCCS Ca’ Granda – Ospedale Maggiore Policlinico, Milano**
- Prof. Massimo Filippi, Prof. ssa Federica Agosta, **Neuroimaging Research Unit and Department of Neurology, Institute of Experimental Neurology, Milano**
- Prof. Andrea Falini, **Division of Neuroscience and Department of Neuroradiology, Vita-Salute University and San Raffaele Scientific Institute, Milan**
- Dott. Emanuele Buratti, Prof. Francisco Baralle, Dott. Marco Baralle **Laboratory of Molecular Pathology International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste**
- Prof. Angelo Poletti, Dott.ssa Valeria Crippa **Dipartimento di Scienze Farmacologiche Biomolecolari, CEND, Università degli Studi di Milano**
- Dott. Francesco Bifari, **Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano**
- Dott. Marco Feligioni, **Centro EBRI, Roma**
- Prof. Adriano Chiò, Prof. Andrea Calvo, **Università degli Studi di Torino**
- Dott.ssa R. Ghidoni, Dott.ssa L. Benussi, **IRCCS Centro San Giovanni di Dio Fatebenefratelli, Brescia**

## **Internazionali:**

- Prof. Robert H. Brown, Prof. John Landers, **University of Massachusetts Medical School, Department of Neurology Worcester, MA, USA**
- Prof.ssa Claudia Fallini, **Ryan Institute for Neuroscience University of Rhode Island Kingston Rhode Island, RI, USA**
- Prof. Albert Ludolph, **Dipartimento di Neurologia Università di Ulm, Germania**
- Prof. Markus Otto, **Dipartimento di Neurologia, Università Martin Luther di Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Germania.**
- Prof. Ammar Al-Chalabi, Prof. Christopher Shaw, Prof. John Powell, **Dipartimento di Neurologia King's College, London**
- Prof. Leonard Petrucci, **Department of Neurology Mayo Clinic, Florida, USA**
- Prof. Markus Weber, **Dipartimento di Neurologia Università di St. Gallen, Svizzera**
- Dott. Damian Wollny, **Max Planck Institute, Leipzig, Germania**
- Prof. Dale J. Lange, **Department of Neurology New York – USA**
- Prof. Hiroshi Mitsumoto, **Department of Neurology Eleanor and Lou Gehrig MDA/ALS Research Center Columbia University Medical Center New York – USA**
- Prof. Merit E. Cudkowicz, **Neuromuscular Division Neurology Massachusetts General Hospital Boston – USA**
- Prof. Stanley H. Appel **Department of Neurology Methodist Neurological Institute Chair Houston -USA**
- Prof. Sharon Abrahams, **Euan Mac Donald Centre for Motor Neurone Disease Research University of Edinburgh - UK**

Il Dipartimento di Neuroscienze e Laboratorio Sperimentale di Ricerche di Neuroscienze presso l' IRCCS Istituto Auxologico Italiano in convenzione con l' Università degli Studi di Milano fa parte dal nuovo costituito CRC Centro "Dino Ferrari" nella tradizione della lunga appartenenza al Centro dal 2002, anno di fondazione della U.O. di Neurologia stessa. Il Dipartimento ha prodotto nel 2022 un rilevante numero di contributi scientifici volti a definire i meccanismi patogenetici delle patologie neurodegenerative, con traslazione dalla clinica al laboratorio nella finalità di definire la terapia di malattie per lungo tempo considerate scarsamente curabili. Il Dipartimento ha continuato a dimostrare vivo interesse per una nuova area della neurologia in rapporto alla pandemia da COVID-19, in particolare relativamente al long-COVID. Con la pandemia si è acceso infatti un grande interesse per le complicanze neurologiche anche a lungo termine con lo sviluppo di un protocollo nazionale di raccolta dei casi clinici con interessamento sia nel sistema Nervoso Centrale che Periferico sotto egida della Società Italiana di Neurologia (SIN) con la elaborazione un documento in via di pubblicazione. Le diverse patologie neurodegenerative - Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) e Malattie del Motoneurone, Demenza Frontotemporale (FTD), Malattia di Alzheimer (AD) e altre Demenze, Malattia di Parkinson (PD) e parkinsonismi, Malattia di Huntington (HD) - sono state studiate con ulteriore sviluppo di Centri dedicati alla valutazione clinica e strumentale dei pazienti con complementare raccolta di biomarcatori ed elaborazione di innovative strategie terapeutiche. È continuata la crescita del Centro Trial Clinici che si è avviato a sviluppare terapia genica ed infusionale intratecale sia con antisenso che con anticorpi monoclonali in diverse patologie neurodegenerative.

Parallelamente all' attività clinica e di ricerca, è proseguita la formazione di studenti, giovani medici, MD/PhD, biologi e biotecnologi..

Il Centro "Dino Ferrari" ha continuato a rappresentare un interlocutore internazionalmente riconosciuto per casistiche di pazienti affetti da diverse malattie neurodegenerative, di cui SLA/FTD in particolare, con sviluppo di nuove tecnologie di telemedicina che hanno permesso di seguire i Pazienti anche da remoto.

Il Prof. Vincenzo Silani è Direttore dal 2017 del Centro dell'European Reference Network- Neuromuscular Diseases (ERN-NMD) con particolare riferimento alla patologia motoneuronale; il Centro è preparato a fornire in rete consulenze per pazienti in Europa. Il Prof. V. Silani è stato recentemente designato a condurre nel direttivo dell'ERN-NMD l'area relativa alle patologie del motoneurone.

Il Centro SLA dell'Istituto Auxologico Italiano IRCCS continua a far parte, inoltre, del Northeast ALS Consortium (NEALS-USA), dell' ENCALS, di MinE, di TRICALS, ed ha aderito all'Italian Frontotemporal Dementia Network (FTD Group-SINDEM).

Nel 2022 è proseguita l'intensa attività del Servizio di Neurofisiologia coordinato dal Dott. Luca Maderna, anche con studio Doppler del nervo periferico integrato all' EMG/ENG classico, con ulteriore definizione di una moderna tecnica per la determinazione del numero di motoneuroni fisiologicamente attivi (MUNE) e con studio della patologia nel sonno, mediante proficua interazione con la U.O. dedicata e diretta dalla Prof. Carolina Lombardi. Si è aggiunta l' elettroceutica per la stimolazione della corteccia motoria nella patologia motoneuronale in collaborazione con il Prof. Vincenzo Di Lazzaro dell' Università Campus Bio Medico di Roma che ha fornito i risultati del primo trial clinico in pazienti affetti da SLA.

Nel 2022 è stato ulteriormente sviluppato il Servizio di Neuropsicologia e Psicologia Clinica coordinato dalla Dott.ssa Barbara Poletti che ha maturato una posizione accademica di RTDB presso la Università degli Studi di Milano. A fianco all' attività clinica rivolta allo screening, alla diagnosi differenziale ed alla riabilitazione dell'impairment cognitivo e delle Demenze si pone il sostegno psicologico ai pazienti affetti da patologia neurodegenerativa e dei loro caregiver. Sono state ulteriormente approfondite linee di ricerca che hanno compreso la messa a punto e l'implementazione di test cognitivi indaganti in particolare le alterazioni frontali nei pazienti affetti da SLA tramite innovative metodiche atte a bypassare le limitazioni verbo-motorie che caratterizzano la suddetta patologia, quale l'Eye Tracking (ET) che si è dimostrato di grande utilità in epoca COVID-19.

Inoltre, è stato ulteriormente sviluppato l'impiego, nella valutazione longitudinale dei pazienti SLA, della versione italiana dell'Edinburgh Cognitive and Behavioural ALS Screen (ECAS). Particolare attenzione è stata data allo sviluppo di tecnologia di brain-computer-interface (BCI) con sviluppo di diversi prototipi operativi. Sono stati poi implementati percorsi multidisciplinari per la valutazione ed il trattamento sia della cefalea che dell'insonnia, quest'ultima in collaborazione con il Centro di Medicina del Sonno, diretto dalla Prof.ssa. Carolina Lombardi. La formazione di équipe multidisciplinari è stata perseguita ed è tutt'ora oggetto di sviluppo per diverse patologie al fine di implementare i percorsi di diagnosi e cura delle stesse. Infine sono stati ulteriormente sviluppati studi di ricerca dei pazienti affetti da patologia neurodegenerativa mediante l'utilizzo della RM 3 Tesla anche dopo acquisizione di un Neuroradiologo con funzioni primarie in Istituto, la Dott.ssa Claudia Cinnante.

La Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" ha ulteriormente ottimizzato gli investimenti in ricerca presso il Centro di Ricerche e Tecnologie Biomediche di Cusano Milanino dove e' locato il Laboratorio di Ricerche di Neuroscienze, in particolare per quanto riguarda l'apparecchiatura Illumina, piattaforma per l'analisi più approfondita di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) in relazione alle patologie neurodegenerative di cui il Centro "Dino Ferrari" per tradizione si occupa, con sviluppo ulteriore del progetto di associazione genica tipo "genome wide" (GWAS) per la definizione di geni di suscettibilità nella SLA sporadica con l'importante contributo del Consorzio SLAGEN per la raccolta dei campioni di DNA e la sincronia di ricerca con diversi Centri Italiani. La diagnostica molecolare è stata arricchita potendo fornire oggi un pannello diagnostico completo per le malattie del motoneurone (SLA), le Demenze (FTD e la Malattia di Alzheimer), per i disturbi extrapiramidali (Malattia Parkinson): le malattie con amplificazione come la SLA legata al gene *C9orf72* vengono separatamente sequenziate. Relativamente alla SLA/FTD, lo studio dell'esoma di un numero rilevante di pazienti affetti da SLA/FTD con componente familiare ha permesso di identificare nuovi geni causativi nell'ambito di una vasta collaborazione internazionale. Analogamente, importante impulso è stato dato alla ricerca di biomarcatori proteici liquorali e sierici mediante SIMOA che viene utilizzato per la definizione dei valori sierici/liquorali del neurofilamento e di nuovi biomarcatori come GFAP.

La migliore espressione dell'attività svolta dalla Sede Distaccata del Centro "Dino Ferrari" sta nell'ulteriore consenso internazionale raggiunto nel 2022 anche per ricercatori (no. 3) che stanno svolgendo o hanno completato periodi formativi in qualificati Laboratori in Europa o nel Nord-America con cui il Centro "Dino Ferrari" ha scambi collaborativi di elevato livello.

L'Istituto Auxologico Italiano IRCCS è parte integrante della Rete Italiana dei NeuroIRCCS ed il Prof. V. Silani coadiuva il Direttore Scientifico nella spiegazione dei diversi compiti istituzionali, rappresentando l'IRCCS in diverse occasioni. E' infatti Referente istituzionale nella Rete dei NeuroIRCCS per delibera del Consiglio di Amministrazione. Nell'ambito dei NeuroIRCCS è stata guadagnato il riconoscimento in quattro istituti virtuali (Demenze, e Malattia di Parkinson, Malattie Cerebrovascolari, Malattie Rare) di cui il Prof. V. Silani è presente nel Consiglio Direttivo con interazione con due piattaforme (genetica e proteomica) nell'ambito della stessa Rete dei NeuroIRCCS (RIN). Nel 2021 il Prof. V. Silani è stato eletto infatti nel Consiglio Direttivo della RIN (2021 – 2024) e si accinge ad organizzare un nuovo Istituto Virtuale dedicato alla Malattie del Motoneurone a coinvolgere 13 NeuroIRCCS: nella riunione di Bologna del Dicembre 2022 ne sono state fornite le basi costitutive.

Il Prof. V. Silani è stato Presidente del 52° Congresso della Società Italiana di Neurologia (SIN) il 3-6 Dicembre 2022, il terzo congresso in Milano dalla fondazione della SIN, che ha visto anche la più larga partecipazione (oltre 2500 persone) e il più numeroso numero di contributi scientifici nella storia del Congresso. Una particolare prospettiva al Congresso è stata data con l'invito alla cerimonia di apertura di Stefano Quintarelli e Federico Faggin, grandi esperti di Intelligenza Artificiale (AI). Il Centro "Dino Ferrari" ha avuto ruolo attivo ed ha largamente partecipato al Congresso anche con un video ad esso dedicato.

Il Prof. V. Silani è parte all' editorial Board di European Neurology, ALS/FTD, American Journal of Neurodegenerative Diseases ed Annals of Transplantation Research; è stato nominato Fellow della American Academy of Neurology (FAAN) oltre che essere già Fellow della European Academy of Neurology (FEAN). È stato nel 2022 Esaminatore per l'European Board of Neurology dell'U.E.M.S.

Il Prof V. Silani è Membro della Society of Neuroscience U.S.A da oltre 30 anni

Il Prof. V. Silani continua la propria funzione clinica e di ricerca dal 01 Novembre 2022 quale Direttore del Dipartimento di Neuroscienze e del Laboratorio di Ricerche in Neuroscienze dell'IRCCS Istituto Auxologico Italiano, sede del Centro "Dino Ferrari".

Il Prof. Nicola Ticozzi è divenuto Direttore della U.O. Neurologia nell' ambito della convenzione con l'Università degli Studi di Milano: il Prof. N. Nicozzi e la Prof.ssa Antonia Ratti sono divenuti parte attiva del costituito CRC Centro "Dino Ferrari" quali membri del Comitato di Indirizzo.

Il Prof. V. Silani fa parte ora dell'Advisory Board.

## **PRINCIPALI ARGOMENTI DI RICERCA**

### ***STUDIO NeuroCOVID***

È stato apprestato un registro nazionale che comprende anche San Marino per la raccolta dei casi di NeuroCOVID nella penisola, sotto patrocinio della Società Italiana di Neurologia (SIN) e dell' European Academy of Neurology (EAN) con elaborazione di un comprensivo documento inviato per pubblicazione. Gli Specializzandi in Neurologia della Scuola di Specializzazione dell'Università degli Studi di Milano hanno largamente contribuito alla raccolta dei casi immettendoli nel database nazionale. Un particolare contributo è stato dedicato allo studio del LongCOVID con le prime evidenze di effetti a lungo termine sia dal punto di vista clinico che strumentale: le pubblicazioni relative sono numerose ed un ambulatorio dedicato è stato Istituito presso l' IRCCS Istituto Auxologico Italiano.

### ***STUDIO DEI LIVELLI SIERICI DELLA PROTEINA GLIALE FIBRILLARE ACIDA (GFAP) NEI PAZIENTI CON SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA***

In questo studio sono stati confrontati i livelli sierici del biomarcatore astrocitario GFAP (proteina gliale fibrillare acida) in 114 pazienti con SLA del Centro e 38 controlli neurologicamente sani. Il biomarcatore è stato misurato con la tecnologia ultrasensibile Simoa (single-molecule array). I livelli di GFAP sono risultati incrementati nella SLA in confronto ai controlli. Questa differenza rappresenta un corrispettivo neurochimico del noto ruolo degli astrociti nella fisiopatologia della SLA ma non si traduce in una soddisfacente capacità discriminativa a fini di diagnosi. Sia nella SLA che nei controlli, i livelli sierici di GFAP sono correlati con l'età. Nella SLA, i livelli di GFAP non sono associati alla maggior parte delle caratteristiche motorie della patologia. Tuttavia livelli più alti di GFAP sono osservati nei pazienti con SLA e deficit cognitivi, in particolare di memoria, nonché in pazienti con disfunzione respiratoria come mostrato da due indici polisonnografici, l'indice di desaturazione di ossigeno e l'indice di apnea-ipopnea. Infine, i livelli sierici di GFAP sono negativamente correlati con la velocità stimata di filtrazione glomerulare, ovvero la funzione renale. Lo studio mostra che GFAP ha una potenzialità quale biomarcatore astrocitario sierico nella SLA, ed in particolare ha una relazione con aspetti non strettamente motori della malattia (deficit cognitivo/mnesico e disfunzione respiratoria). La correlazione negativa con la funzione renale ha rilevanza pratica relativamente ad un possibile futuro impiego del biomarcatore in ambito di sperimentazioni terapeutiche e poi di attività clinica, e non potrà essere trascurato in futuri studi. Lo studio è uno dei primi ad analizzare il biomarcatore GFAP nella SLA ed è stato pubblicato sulla rivista americana *Annals of Clinical and Translational Neurology* (Verde et al., *Ann Clin Transl Neurol* 2022).

### ***STUDIO DEL QUOZIENTE ALBUMINICO (Q-ALB) NELLA MALATTIA DI ALZHEIMER***

In questo studio è stato studiato il parametro Q-Alb, ovvero quoziante albuminico, indicante il rapporto tra la concentrazione dell'albumina nel liquor e nel siero. Essendo l'albumina prodotta esclusivamente nel fegato, quella che viene rilevata nel liquor è di provenienza ematica. Pertanto il Q-Alb esprime la funzione della barriera emato-liquorale o, con una parziale semplificazione, della

barriera emato-encefalica. Tale parametro è stato studiato nella casistica di malattia di Alzheimer del Centro, intendendo con ciò casi con conferma neurochimica, ovvero con evidenza neurochimica di amiloidosi A-beta come mostrato da livelli liquorali patologicamente bassi di A-beta 1-42 e/o di ratio A-beta 1-42/A-beta 1-40 (categoria A+ sec. schema di classificazione A/T/N del National Institute on Aging-Alzheimer's Association, NIA-AA). Questo differenzia il lavoro da analoghi studi precedenti condotti su casistiche di malattia di Alzheimer con diagnosi semplicemente clinica. In particolare sono stati analizzati 144 pazienti con malattia di Alzheimer e 132 controlli neurologici privi di patologie infiammatorie del SNC. L'indagine ha mostrato che il Q-Alb non è significativamente diverso nella malattia di Alzheimer rispetto ai controlli. Inoltre, nell'ambito della malattia di Alzheimer, il Q-Alb non differisce tra la condizione di declino cognitivo lieve (MCI) e quella di demenza, non è associato ad un indice neuropsicologico di funzionamento cognitivo globale (MMSE, Mini Mental State Examination) e non correla con i livelli dei biomarcatori liquorali (A-beta, tau totale, tau fosforilata). Lo studio indica che la malattia di Alzheimer non è specificamente caratterizzata da una alterazione della barriera emato-liquorale, e che la funzione della barriera emato-liquorale non è associata alla gravità clinica della malattia di Alzheimer e ai livelli liquorali dei suoi biomarcatori specifici (e pertanto ai processi neuropatologici di deposizione di A-beta e tau). Interpretando il Q-Alb come indice del funzionamento della barriera emato-encefalica, lo studio mostra che questo parametro non è sufficientemente sensibile per rilevare le lievi alterazioni della barriera emato-encefalica che sono presenti nella malattia di Alzheimer. Lo studio è stato pubblicato sulla rivista *Neurological Sciences* (Giacopuzzi Grigoli et al., *Neurol Sci* 2022).

### ***ULTERIORI STUDI CLINICI-NEUROCHIMICI SULLA MALATTIA DI ALZHEIMER***

Nel 2022 sono stati effettuati altri 3 studi clinico-neuropsicologico-neurochimici sulla casistica di malattia di Alzheimer del nostro centro, consentiti dalla interazione del CDCCD, del centro di neuropsicologia e del laboratorio di analisi e ricerca. Nel primo studio (Aiello et al., *Front Psychol* 2022) sono stati studiati 40 pazienti con declino cognitivo lieve (MCI) dovuto a malattia di Alzheimer in fase prodromica e 67 pazienti con demenza di Alzheimer (malattia di Alzheimer in fase di demenza conclamata). Significativamente, i pazienti di entrambe le categorie avevano una evidenza neurochimica di amiloidosi A-beta cerebrale (ridotti livelli liquorali di A-beta 1-42 o di ratio A-beta 1-42/A-beta 1-40). È stata valutata la capacità del test di screening delle funzioni "frontali" Frontal Assessment Battery (FAB) di discriminare tra MCI e demenza di Alzheimer, argomento poco studiato in precedenza, specialmente in casistiche neurochimicamente caratterizzate. La performance discriminativa della FAB è risultata comparabile a quella del principale test di screening utilizzato, il Mini Mental State Examination (MMSE), e si è dimostrato che la sinergia tra i due test di screening incrementa ulteriormente la capacità di differenziare tra le due condizioni. Il lavoro dimostra la utilità pratica della FAB come test di screening per distinguere tra MCI e demenza nell'ambito della malattia di Alzheimer ed eventualmente l'utilità di aggiungere tale test al più comunemente utilizzato MMSE. Il secondo studio (Verde et al., *Neurol Sci* 2022) è stato condotto su una casistica di 168 pazienti con MCI da probabile malattia di Alzheimer o demenza di Alzheimer, tutti con evidenza neurochimica di amiloidosi A-beta. In particolare è stata studiata la frequenza, nelle due categorie cliniche, dei profili neurochimici liquorali secondo lo schema A/T/N del NIA-AA (National Institute on Aging-Alzheimer's Association), che categorizza i pazienti sulla base dei parametri (neurochimici o neuroradiologici) di amiloidosi (A), taupatia (T) e neurodegenerazione (N). In particolare, la prevalenza della doppia positività A+T+ non differiva significativamente tra MCI e demenza, risultando la combinazione prevalente in entrambe le categorie. In maniera interessante, il dato non supporta la comune nozione clinica che il profilo A+T- è più frequente nella condizione di MCI (rispetto alla demenza conclamata) come espressione neurochimica di uno stadio neuropatologico più precoce. Questo potrebbe suggerire la necessità di esercitare maggiore cautela nell'attribuire un caso di MCI con profilo A+T- ad una incipiente malattia di Alzheimer.

Nel terzo lavoro (Verde et al., *Neurodegener Dis* 2022) è stata analizzata una casistica di 50 pazienti con demenza di Alzheimer suddivisi in casi con forma tipica (amnesica) e casi atipici (a loro volta suddivisi nei 3 fenotipi afasia primaria progressiva logopenica, atrofia corticale posteriore e variante

disesecutiva-comportamentale). Sono stati analizzati i 4 biomarcatori liquorali A-beta 1-42, A-beta 1-40, tau totale (T-tau) e tau fosforilata (P-tau181), misurati con la medesima metodica (CLEIA). Si è osservato che i fenotipici atipici di demenza di Alzheimer sono caratterizzati, in confronto alla forma tipica, da livelli superiori di A-beta 1-40 e da livelli inferiori di P-tau181. L'uso dei due biomarcatori consente così di discriminare tra fenotipici atipici e tipici con un'area sotto la curva ROC di 0.82 ed elevata specificità (94,9%), a fronte di una bassa sensibilità 54,5%).

### **CASE SERIES SULLA SCLEROSI SOLITARIA**

Nel 2022 è stata pubblicata una case series composta di 3 pazienti affetti da sclerosi solitaria (Giacopuzzi Grigoli et al., *Neurol Sci* 2022), una rara condizione infiammatoria-demielinizzante del sistema nervoso centrale descritta per la prima volta solo nel 2012 e rappresentante probabilmente una forma isolata di sclerosi multipla primariamente progressiva. I 3 pazienti sono stati studiati nel nostro centro anche grazie alla collaborazione con colleghi di altri istituti (Istituto Clinico Humanitas, Ospedale di Vimercate e Ospedale Maggiore Policlinico). La diagnosi era supportata, oltre che da un aspetto caratteristico nelle neuroimmagini (RM del sistema nervoso centrale), dal reperto neurochimico di sintesi intratecale di IgG (“bande oligoclonali”) nell'esame liquorale. I primi due casi avevano caratteristiche simili a quelle di alcuni descritti nella letteratura (emiparesi spastica da lesione del tronco encefalico). Questi casi sono diagnosticamente rilevanti soprattutto perché “mimano” la sclerosi laterale primaria (PLS), rara forma di malattia del motoneurone caratterizzata da patologia del solo primo motoneurone (motoneurone superiore, che si trova nella corteccia cerebrale motoria). In maniera interessante in quanto inedita rispetto a quanto descritto nella letteratura, nella terza paziente la lesione si trovava invece nel midollo cervicale e determinava un quadro clinico costituito sia da segni di primo motoneurone sia da segni di secondo motoneurone, “mimando” così una sclerosi laterale amiotrofica (SLA). La case series riposta la descrizione fenotipica dei 3 pazienti, inclusi risultati degli esami strumentali, tra i quali si ricordano la PET encefalo con 18F-FDG, effettuata nei due pazienti con quadro simil-PLS e risultata normale (non supportando quindi una patologia della corteccia cerebrale come si osserva nella PLS), lo studio dell'encefalo con sequenze SWI sensibili alla deposizione di sostanze paramagnetiche nella corteccia motoria, effettuata in due pazienti e risultato normale (non supportando quindi la diagnosi di PLS o SLA), e, in maniera inedita rispetto alla letteratura, la quantificazione dei livelli della catena leggera dei neurofilamenti (NFL) nel liquor e nel siero, rispettivamente in due pazienti, risultati normali, ad ulteriore sostegno dell'idea di un processo anatomico-patologico confinato ad un punto ristretto del sistema nervoso centrale. La case series contribuisce ad ampliare le conoscenze della comunità scientifica sulla sclerosi solitaria, condizione clinico-neuropatologica ancora incompletamente caratterizzata e compresa.

### **PROGETTO DI RETE RIN - RCR 2021-23671214 (ISTITUTI VIRTUALI NAZIONALI)**

In questo ampio progetto multicentrico sono stati analizzati i livelli plasmatici dei biomarcatori NFL (catena leggera dei neurofilamenti), A-beta 1-42, A-beta 1-40, tau totale (T-tau) e tau fosforilata (P-tau181), mediante tecnologia Simoa (single-molecule array), in 240 controlli e 265 pazienti con disturbi cognitivi a loro volta soggettivi in disturbo cognitivo soggettivo (SCC), pre-MCI, MCI (a sua volta suddiviso nella forma a dominio singolo, MCI<sub>sd</sub>, e nella forma a dominio multiplo, MCI<sub>md</sub>) e demenza di Alzheimer (ADD). Significativamente, tutti i campioni di plasma sono stati biobancati ed analizzati in conformità con le standard operating procedures (SOPs) elaborate nel progetto dell'anno precedente relativo all'avvio delle attività degli Istituti Virtuali Nazionali e in particolare dell'Istituto Virtuale Demenze. I principali risultati sono stati i seguenti: 1) nei controlli cognitivamente sani, NFL, A-beta 1-40 e P-tau181 hanno una correlazione positiva con l'età, mentre la ratio A-beta 1-42/A-beta 1-40 e, in maniera interessante, anche la T-tau hanno con l'età una correlazione negativa; ciò indica che nello stabilire in futuro eventuali cutoff diagnostici l'età dovrà essere tenuta in considerazione; 2) nei controlli non vi sono differenze dei biomarcatori tra maschi e femmine; 3) NFL plasmatico è più elevato nelle fasi più avanzate della malattia (livelli più elevati in ADD e MCI<sub>md</sub> che in controlli, livelli più elevati in ADD che in SCC e pre-MCI, livelli più elevati

in MCI<sub>MD</sub> che in SCC e pre-MCI); 4) la ratio A-beta 1-42/A-beta 1-40 aumenta nelle fasi iniziali della malattia (più alta in pre-MCI che in controlli) ma si riduce nelle fasi più avanzate (livelli più bassi in ADD e MCI<sub>MD</sub> rispetto a pre-MCI, livelli più bassi in MCI<sub>MD</sub> rispetto a SCC, livelli più bassi in MCI<sub>MD</sub> rispetto a MCI<sub>SD</sub>); 5) T-tau è elevata in tutte le fasi della malattia (tranne che in MCI<sub>MD</sub>) rispetto ai controlli; 6) P-tau<sub>181</sub> è aumentata in tutte le fasi della malattia (tranne che in MCI<sub>SD</sub>) rispetto ai controlli, nonché in ADD rispetto a tutte le altre fasi della malattia; 7) la ratio A-beta 1-42/A-beta 1-40 è ridotta in tutte le fasi della malattia rispetto ai controlli, nonché in ADD rispetto alle altre fasi della malattia (tranne MCI<sub>MD</sub>). Nel complesso i dati indicano che i biomarcatori AD-specifici, anche nel plasma, sono promettenti per caratterizzare anche fasi precoci della storia naturale della malattia, mentre NFL plasmatico è maggiormente correlato alla progressione del danno neurologico. Questo studio rappresenta, anche in considerazione dello sforzo di omogeneizzazione delle procedure di biobancaggio e di analisi neurochimica, un importante punto di partenza per futuri studi di rete sulla malattia di Alzheimer nelle sue diverse fasi biologico-cliniche.

### ***THE ROLE OF THE NOVEL NEK1 AND C21ORF2 GENES ASSOCIATED TO DNA REPAIR IN THE PATHOGENESIS OF AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS***

*(Progetto DREPALS, finanziato dal Ministero della Salute, Bando Giovani Ricercatori – PI Prof. Nicola Ticozzi)*

I geni *NEK1* e *C21orf2* rappresentano fattori di rischio per la SLA in quanto, come precedentemente da noi pubblicato, varianti missenso rare e mutazioni LOF in *NEK1* sono presenti, rispettivamente, in >3% e nell'1.2% dei pazienti affetti da SLA rispetto allo 0.2% dei controlli (Kenna et al., 2016), mentre il polimorfismo p.V58L nel gene *C21orf2* è risultato associare alla malattia, più dei geni *SARM1* e *UNC13A* (van Rheenen et al 2016).

E' stata utilizzata la tecnica CRISPR/Cas9 per creare una mutazione LOF di *NEK1* in una linea iPSC wild-type di controllo già presente in laboratorio. Le due linee, mutata e isogenica, sono state differenziate in motoneuroni (iPSC-MN) per studiare l'effetto biologico dell'aploinsufficienza di *NEK1* in tali cellule. *NEK1* è, infatti, una chinasi coinvolta in diversi meccanismi quali il riparo del danno al DNA, lo sviluppo del ciglio e la regolazione della permeabilità della membrana mitocondriale. Abbiamo studiato la risposta al danno al DNA indotto dall'agente radiomimetico Neocarzinostatina e abbiamo osservato che le iPSC-MN di *NEK1* LOF mostrano un recupero più lento nella riparazione del danno rispetto ai motoneuroni derivati dalle iPSC isogeniche di controllo. Per quanto riguarda la formazione del ciglio, organello meccano-sensore importante nei neuroni, abbiamo osservato che sia la lunghezza del ciglio che il numero di cellule contenenti il ciglio sono statisticamente minori nelle iPSC-MN *NEK1* LOF rispetto ai controlli. Attualmente stiamo valutando l'effetto della mutazione LOF anche sulla biogenesi mitocondriale e a livello di differenziamento 3D di organoidi cerebrali (vedi più sotto).

Nel nostro screening mutazionale del gene *NEK1* in una grossa casistica di 600 casi SLA sporadici e familiari abbiamo identificato un paziente doppio mutato per *NEK1* LOF e il gene *C9orf72*. Abbiamo, quindi, generato cellule iPSC da tale paziente mediante riprogrammazione di PBMC al fine di studiare l'effetto di tali doppie mutazioni in iPSC-MN ottenute per differenziamento. Anche in tali cellule abbiamo valutato sia la risposta al danno al DNA e la formazione del ciglio confrontandole con iPSC-MN *NEK1* LOF di cui sopra e con iPSC-MN *C9orf72* già presenti in lab. Le iPSC-MN doppie mutate mostrano una minore capacità di riparare il danno al DNA rispetto alle iPSC-MN con singola mutazione *NEK1* LOF o *C9orf72*. Per quanto riguarda il ciglio, invece, le iPSC-MN doppie mutate mostrano alterazioni molto simili alle iPSC-MN *NEK1* LOF descritte sopra, mentre i motoneuroni *C9orf72* non presentano difetti nella lunghezza e distribuzione di questo organello.

### ***AUTOZYGOSITY MAPPING FOLLOWED BY NEXT GENERATION SEQUENCING IN UNRELATED CONSANGUINEOUS INDIVIDUALS TO IDENTIFY NOVEL ALS-ASSOCIATED GENES***

*(Progetto AZYGOS 2.0, finanziato da Agenzia di ricerca AriSLA – P.I. Prof. Nicola Ticozzi)*

Una larga parte dell'ereditabilità mancante nella SLA è legata al mancato riconoscimento di molti casi familiari con pattern di ereditarietà di tipo recessivo. Per ovviare a questo problema è stato disegnato un protocollo sperimentale che prevede di genotipizzare mediante metodiche high-throughput una coorte di pazienti SLA, progenie di cugini di primo o di secondo grado, e di effettuare una mappatura di autozigosi al fine di individuare le regioni genomiche identiche per discendenza (IBD). Le regioni di autozigosi saranno successivamente filtrate in modo tale da individuare quelle che ricorrono più frequentemente nei casi e sono assenti nella popolazione di controllo. Infine, i pazienti selezionati saranno sottoposti a sequenziamento del genoma al fine di evidenziare la presenza di mutazioni patogenetiche in omozigosi nelle regioni di autozigosi precedentemente individuate. A tal fine è stato sequenziato il genoma di circa 100 pazienti SLA progenie di matrimonio tra consanguinei; nel corso del 2022 sono state analizzate le varianti presenti nella regione di autozigosi arrivando all'identificazione di almeno tre possibili geni candidati.

### **CARATTERIZZAZIONE GENETICA DEI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Nel corso del 2022 sono stati condotti diversi studi finalizzati a caratterizzare i determinanti genetici associati al fenotipo motorio, cognitivo e comportamentale nella SLA. Tali studi hanno confermato l'associazione di un polimorfismo nel gene UNC13A con la durata di malattia (Manini et al., *Front Aging Neurosci* 2022) e del gene TMEM106B con il fenotipo motorio e cognitivo (Manini et al., *Int J Mol Sci* 2022). E' in corso la valutazione del ruolo di polimorfismi associati a parkinsonismi atipici (paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione corticobasale) nella patogenesi della SLA. Infine, nel 2022 è stato avviato uno studio multicentrico finalizzato all'identificazione dei determinanti genetici della sclerosi laterale primaria a partire da dati di sequenziamento del genoma.

### **CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA DEI PAZIENTI AFFETTI DA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Nel corso del 2022 sono stati condotti diversi studi di deep-phenotyping nei pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica seguiti presso l'Istituto Auxologico Italiano IRCCS. Tale studi, integrando dati clinici, neurofisiologici e neuropsicologici, hanno portato alla caratterizzazione del fenotipo motorio, cognitivo e comportamentale associato all'espansione esanucleotidica del gene c9orf72 (Colombo et al., *J Neurol* 2022) e all'identificazione di variabili neurofisiologiche associate alla prognosi (Colombo et al., *J Neurol* 2022). E' stata inoltre valutata la correlazione tra livelli sierici di GFAP e NFL con le caratteristiche fenotipiche di malattia (Verde et al., *Ann Clin Transl Med* 2022; Verde et al., *Front Aging Neurosci* 2022). Durante il 2022 è stato inoltre implementato un database clinico su piattaforma RedCap per l'analisi integrata dei dati (progetto DAMARE – Ricerca Corrente IRCCS Istituto Auxologico Italiano). Tale database sarà sfruttato nel corso del 2023 nell'ambito del progetto DRIVEALS (Ricerca Finalizzata del Ministero della Salute – PI Prof. Nicola Ticozzi) che ha come obiettivo la dissezione fenotipica della SLA a partire da dati genetici e neurochimici.

### **iPSC: UN MODELLO PER LO STUDIO DELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE**

Le cellule iPSC derivate da paziente rappresentano il modello ideale per lo studio dei meccanismi patogenetici della SLA e dell'FTD nonché per testare approcci terapeutici personalizzati. Nel corso dell'anno è stato concluso e pubblicato lo studio in collaborazione con l'Istituto Besta (P. Bossolasco, S. Cimini, E. Maderna, D. Bardelli, L. Canafoglia, T. Cavallaro, M. Ricci, V. Silani, G. Marucci, G. Rossi. GRN-/ iPSC-derived cortical neurons recapitulate the pathological findings of both frontotemporal lobar degeneration and neuronal ceroidlipofuscinosis. *Neurobiol Dis* 2022). In particolare, si è riscontrato che i neuroni corticali differenziati da iPSC di una paziente con mutazione in omozigosi nel gene della Progranulina e correlata lipofuscinosi ceroide neuronale, presentavano anomalie rispetto ai neuroni controllo. Le anomalie su neuroni a diversi tempi di maturazione mostravano alterazioni caratteristiche dell'FTD con mutazioni in etereozigosi della Progranulina insieme ad anomalie tipiche delle lipofuscinosi ceroidi neuronali quali la mislocalizzazione di TDP-43 e P-TDP-43 dal nucleo al citoplasma, lisosomi autofluorescenti ed ingrossati e vescicole

elettrondense contenenti materiale di accumulo con tipico ‘fingerprint profile’. Si è osservato inoltre un diverso pattern di espressione in western blot delle proteine TDP-43, caspasi 3 e sua forma cleavata a diversi tempi di differenziamento, evidenziando una sorta di transizione da FTD a Lipofuscinosi nel tempo.

Nel 2022 è stato inoltre messo a punto un protocollo per l’ottenimento di organoidi cerebrali da iPSCs. Organoidi sono stati generati da iPSCs con mutazione *loss-of-function* nel gene *NEK1* e della sua linea isogenica di controllo da noi create (vedi sopra). Gli organoidi sono stati caratterizzati mediante immunofluorescenza con tecnica whole-mount per l’espressione di marcatori neuro-gliali (Nestina, SOX2, BetaIII tubulina, MAP2, NeuN, Doublecortin e GFAP) per individuare i tipi cellulari che si formano spontaneamente nell’organoida a diversi tempi di sviluppo fino a 150 giorni ed eventuali differenze tra le due linee. Gli organoidi sono stati analizzati anche preliminarmente mediante microscopia elettronica per definire a livello ultrastrutturale possibili differenze tra organoida mutato e controllo isogenico. E’ inoltre in corso la generazione di organoidi da altre linee iPSCs di pazienti affetti da SLA con mutazioni in diversi geni causativi.

#### ***GENOMIC INSTABILITY OF EXPANDED REPEATS IN HD AND ALS/FTD (Progetto Repetomics, E-Rare-3 Call JTC 2018 – P.I. Prof. Vincenzo Silani)***

L’obiettivo di questo progetto europeo è lo studio e la caratterizzazione della instabilità genomica associata alle patologie da espansione di sequenze ripetute, quali SLA/FTD con il gene *C9orf72* e la malattia di Huntington, per spiegare il fenomeno dell’anticipazione genetica nelle famiglie e l’elevato grado di mosaismo somatico. Nel 2022 è stata terminato il lavoro di generazione e caratterizzazione di 5 linee iPSC con mutazione in *C9orf72* da noi riprogrammate a partire da fibroblasti di pazienti SLA appartenenti alla stessa famiglia che presenta instabilità genomica con i diversi membri portatori di un diverso numero di espansioni patologiche e dell’unica figlia sana (C. Lattuada, S. Santangelo, S. Peverelli, P. McGoldrick, E. Rogaea, L. Zinman, G. Haase, V. Géli, V. Silani, J. Robertson, A. Ratti, P. Bossolasco. Generation of five induced pluripotent stem cells lines from four members of the same family carrying a *C9orf72* repeat expansion and one wild-type member. Stem Cell Res 2023). In collaborazione con il Partner di progetto Georg Hasse (Marsiglia) queste linee sono state l’ebbe per generare organoidi che sono stati preliminarmente analizzati per testare l’instabilità della sequenza ripetuta espansa del gene *C9orf72* durante il differenziamento 3D mediante utilizzo di tecnica di sequenziamento di terza generazione. E’ stata, infatti, utilizzata la tecnologia di *Optical mapping* (Bionano Genomics) che consente l’analisi di grandi sequenze di DNA e l’identificazione di grossi riarrangiamenti genomici. Le analisi sono ancora in corso ma dati preliminari su due altre nostre linee *C9orf72* hanno mostrato che la tecnica permette di definire con una certa precisione l’entità dell’espansione, se raffrontata ai dati ottenuti con la metodica classica di Southern blot. Tali nostri dati indicano anche che la condizione di mosaismo somatico è presente negli organoidi analizzati a 60 giorni, sebbene sarà necessario definire il grado d’instabilità della sequenza ripetuta espansa a tempi più lunghi di differenziamento.

#### ***MECCANISMI PATOGENICI DI SLA: GRANULI DA STRESS e RISPOSTA ALLO STRESS OSSIDATIVO IN FIBROBLASTI E IN MOTONEURONI DIFFERENZIATI DA CELLULE iPSC DI PAZIENTI SLA (Progetto Ricerca Finalizzata AUTOPHALS, Ministero della Salute, PI Prof. V. Silani e Prof.ssa Antonia Ratti)***

Dopo aver messo a punto lo scorso anno un modello sperimentale in vitro di TDP-43 proteinopatia, nel corso del 2022 lo abbiamo utilizzato per testare l’efficacia di 3 molecole candidate nel diminuire la mislocalizzazione della proteina TDP-43 nel citoplasma e nel far recuperare la sua attività nucleare di splicing. Il modello di TDP-43 proteinopatia è stato da noi ottenuto esponendo cellule di neuroblastoma umano SK-N-BE a basse dosi di Arsenite per tempi prolungati fino a 16 ore. In tali condizioni, TDP-43 si mislocalizza nel citoplasma, diventa fosforilato e parzialmente insolubile e viene reclutato nei granuli da stress (SG) come risposta temporanea allo stress ossidativo. In queste condizioni abbiamo saggiato tre molecole candidate coinvolte sia nell’attivazione dell’autofagia (Litio e Rapamicina) che nell’inibizione della senescenza (Metformina). Per definire la loro efficacia

abbiamo utilizzato, come saggio funzionale indiretto, il recupero dell'attività nucleare di splicing di TDP-43 su geni target noti, quali UNC13A e POLDIP3. Abbiamo prima definito la tossicità dei tre composti a diverse dosi che sono stati, quindi, somministrati in condizione di pre-trattamento ad Arsenite. I nostri dati indicano che Litio e Metformina non mostrano alcun recupero della condizione di TDP-43 proteinopatia e dello splicing, mentre la Rapamicina si rivela essere efficace nel diminuire il contenuto di SG e di p62 e nel recuperare la localizzazione di TDP-43 nel nucleo e la sua attività di splicing. Avendo definito una molecola candidata, abbiamo quindi testato la Rapamicina anche in cellule derivate da paziente SLA, quali fibroblasti e motoneuroni differenziati da iPSC, anch'essi trattati con Arsenite per indurre la mislocalizzazione citoplasmatica di TDP-43 nel citoplasma. I nostri risultati indicano che la Rapamicina ha effetto positivo anche in queste cellule derivate da paziente SLA, supportando a livello biologico il razionale del trial clinico attualmente in corso con tale molecola nei pazienti SLA.

Poiché l'autofagia è gravemente compromessa nella SLA e poiché pazienti SLA portatori del fattore di rischio nel gene UNC13A rispondono bene a Litio, noto attivatore dell'autofagia, abbiamo iniziato ad indagare il possibile link meccanicistico basandoci sul fatto che UNC13A è coinvolto nel rilascio di vescicole sinaptiche/esosomi. Abbiamo isolato gli esosomi da liquor di pazienti portatori o meno del fattore di rischio UNC13A in omozigosi al fine di valutare possibili differenze nel rilascio della proteina TDP-43. I dati sono attualmente in fase di analisi.

#### **PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM INVOLVEMENT IN AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS: FROM DIAGNOSIS TO DISEASE UNDERSTANDING** (*Progetto Ricerca Finalizzata PNALS, Ministero della Salute, PI Prof.ssa Antonia Ratti*)

Al fine di determinare l'effetto non-cellulare autonomo delle cellule di Schwann (SC) in un modello di SLA basato su cellule staminali, abbiamo generato iPSC sia da pazienti affetti da SLA con mutazioni nel gene TARDBP che da donatori sani mediante riprogrammazione a partire da fibroblasti primari isolati da biopsie di cute dopo consenso informato. Le linee iPSC generate sono state quindi caratterizzate per l'espressione di marcatori di staminalità (Sox2, Oct3/4, Nanog), la capacità di differenziare nei tre foglietti embrionali e per l'integrità del cariotipo. Mediante gene-editing con tecnologia CRISPR/Cas9, la mutazione *TARDBP* A382T di una linea iPSC SLA è stata corretta al fine di generare un controllo isogenico wild-type da utilizzare per i futuri esperimenti insieme alle iPSC di controlli sani.

Le linee iPSC sono state differenziate in motoneuroni e sono stati condotti esperimenti preliminari di co-coltura tra le iPSC-MN umane ottenute e SC primarie isolate da ratti sani al fine di ottenere un modello SLA 2D, testando diverse condizioni e tempi d'incubazione, in parallelo all'ottimizzazione dei protocolli di differenziamento delle SC direttamente da iPSC umane. Dopo 20 giorni di co-coltura le SC di ratto hanno mostrato la capacità di orientarsi lungo gli assoni delle iPSC-MN umane, anche se non sembrano produrre mielina, almeno nei tempi nelle condizioni da noi testati.

#### **NEUROTRACK. STUDIO DELLA DIFFUSIONE E PREDIZIONE DELLA PROGRESSIONE DEL PROCESSO NEURODEGENERATIVO ATTRAVERSO LA STRUTTURA DEL CONNECTOMA CEREBRALE**

Il Dipartimento di Neurologia ha proseguito nel 2022 insieme alle Unità di Neurologia dell'Ospedale San Raffaele, dell'Istituto Neurologico Carlo Besta e dell'Ospedale San Gerardo di Monza uno studio di risonanza magnetica volto alla investigazione delle modalità di progressione delle patologie neurodegenerative, e in particolare della degenerazione frontotemporale e della sclerosi laterale amiotrofica, all'interno del cervello tramite l'analisi del "connectome" cerebrale.

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate dall'accumulo di aggregati proteici insolubili, specifici per ogni malattia, nel sistema nervoso centrale. Una caratteristica comune di tali malattie è che le alterazioni patologiche si accumulano nel tempo seguendo un pattern spaziale stereotipato, che contribuisce all'esordio e alla progressione della sintomatologia clinica. Si ipotizza che la propagazione delle alterazioni patologiche all'interno del sistema nervoso centrale avvenga con un meccanismo "prion-like" basato sulla alterazione, da parte di proteine patologiche, delle proteine

vicine e sulla loro trasmissione intercellulare attraverso le connessioni della sostanza bianca. La teoria dei grafi applicata ai dati di risonanza magnetica (RM) fornisce uno strumento in grado di descrivere le interconnessioni di attività e/o struttura del cervello a livello di sistema (definito “connectome” cerebrale). In base a questa teoria, il network cerebrale è concepito come un insieme di nodi, che corrispondono a regioni anatomiche diverse, e di legami, che corrispondono alle connessioni funzionali o strutturali tra le diverse regioni. Le metodiche RM permettono di ottenere informazioni relative alla distanza tra i vari nodi cerebrali e alla forza (strutturale o funzionale) delle connessioni tra nodi. La ricerca nell’ambito dei network cerebrali è potenzialmente in grado di contribuire alla comprensione della patofisiologia delle malattie neurodegenerative e di rivelare i profili di connettività associati a outcome clinici differenti.

L’obiettivo principale dello studio è esplorare i meccanismi di neurodegenerazione associati alle diverse sindromi dello spettro FTLD e alla SLA, nell’ipotesi che il processo neurodegenerativo sia guidato dall’architettura strutturale del “connectome” cerebrale. Più specificamente, lo studio mira a: 1. Caratterizzare la progressione della degenerazione dei network cerebrali nelle forme sporadiche di malattia attraverso lo studio delle variazioni longitudinali a carico del connectome strutturale e funzionale applicando l’analisi dei grafi ai dati di RM di diffusione e funzionale; 2. Utilizzare la struttura del connectome cerebrale all’esordio e modelli matematici per predire la progressione spaziale e temporale del processo neurodegenerativo; 3. Definire i pattern di progressione spaziale e temporale del processo neurodegenerativo specificamente associati a diverse eziologie genetiche di FTD e SLA (*C9orf72*, *GRN*, *MAPT*, *TARDBP*) attraverso lo studio delle variazioni longitudinali a carico del connectome strutturale e funzionale in pazienti affetti da forme genetiche e soggetti asintomatici portatori di tali mutazioni.

Il Centro partecipa allo studio fornendo pazienti affetti da forme sporadiche e familiari/genetiche di SLA e di FTD (variante comportamentale o bvFTD, afasia primaria progressiva-variante semantica o svPPA e afasia primaria progressiva-variante non-fluente o nfvPPA). I soggetti vengono sottoposti a visite ogni 6 mesi per un totale di 5 visite (ultimo follow-up a 2 anni dal reclutamento nello studio). In ogni visita vengono effettuate, oltre alla valutazione neurologica, una valutazione neuropsicologica estensiva e un esame di RM 3T comprensivo di sequenze pesate in diffusione, RM funzionale a riposo e RM strutturale. Nella visita basale, nella maggior parte dei casi, viene anche effettuata una puntura lombare, finalizzata tra l’altro, nel caso dei pazienti con FTD in corso di definizione diagnostica, alla quantificazione dei biomarcatori liquorali di neurodegenerazione/malattia di Alzheimer (A-beta 1-42, A-beta 1-40, tau totale, tau fosforilata).

#### ***NEUROIMAGING/RETE NEUROIRCCS ed OTTIMIZZAZIONE/ARMONIZZAZIONE DI SEQUENZE RM IN STUDI MULTICENTRICI***

Nel 2022 il Dipartimento di Neurologia ha proseguito, con la collaborazione della Neuroradiologia della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico, la partecipazione unitamente ad altri 18 IRCCS, al progetto “Rete di Neuroimaging fase II: ottimizzazione e armonizzazione di sequenze RM avanzate e loro applicazione nello studio delle demenze e della disabilità intellettuale in età pediatrica”, promosso dal ministero della Salute (referente clinico per l’Istituto Auxologico Italiano IRCCS Dott.ssa C. Morelli. Obiettivi dello studio sono stati l’ottimizzazione, l’armonizzazione e la condivisione di protocolli di imaging avanzato di RM, al fine di costituire un gruppo normativo di soggetti sani (stratificato per età) da confrontare con gruppi di pazienti con decadimento cognitivo e con disabilità intellettuale in età pediatrica in studi piloti. Questo potrà permettere di identificare parametri quantitativi di valore sia diagnostico che prognostico. Il progetto si prefigge anche di raccogliere i dati di pazienti con la prospettiva di creare dei database che integrino informazioni cliniche e radiologiche (big data). L’auspicio è che l’integrazione dei dati di neuroimaging con quelli clinici e neuropsicologici consenta in futuro di utilizzare il neuroimaging quantitativo per la gestione clinica del singolo soggetto. L’applicazione di tecniche di machine learning potrà inoltre permettere di identificare pattern nascosti all’interno dei dati al fine di aumentare il poter diagnostico. L’Istituto Auxologico Italiano, IRCCS ha partecipato alle riunioni della Rete e WP 1, ha collaborato all’ottimizzazione ed armonizzazione delle sequenze di imaging

avanzato. In particolare, si è proceduto all'acquisizione di dati sui fantocci per consentire il monitoraggio delle macchine, come previsto dal protocollo di armonizzazione della Rete.

### **STUDIO IN RM 3 TESLA DI DEPOSITI DI FERRO NELLA CORTECCIA MOTORIA DI PAZIENTI AFFETTI DA PATOLOGIA MOTONEURONALE (SLA)**

Nel corso del 2022 è proseguito il progetto di ricerca corrente dal titolo “Studio dei depositi di ferro nella corteccia motoria di pazienti affetti da MND mediante risonanza magnetica cerebrale 3 Tesla”, P.I. Dott.ssa C. Morelli, volto a valutare mediante la sequenza SWI (Susceptibility-Weighted Imaging) in risonanza magnetica ad alto campo (3T), l’entità e la distribuzione di sostanze paramagnetiche nella corteccia motoria nei pazienti affetti da malattia del motoneurone sia rispetto a soggetti sani sia rispetto ad altri pazienti, affetti da altre malattie neurodegenerative. In particolare, scopo dello studio è stato quello di definire un eventuale marcatore radiologico di malattia e la correlazione tra eventuale tra pattern dei depositi paramagnetici e fenotipo di malattia. Sono stati arruolati nello studio complessivamente più di 150 soggetti (pazienti affetti da malattia del motoneurone e soggetti di controllo). L’analisi dei dati ha permesso di identificare un promettente marker radiologico per supportare la diagnosi di Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), mediante la valutazione quantitativa dell’ipointensità della corteccia motoria primaria nella sequenza SWI, nonché di individuare un potenziale biomarker quantitativo di coinvolgimento del I motoneurone nella SLA.

### **AVANZAMENTI IN MATERIA DI SEMEIOТИКА LINGUISTICA NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA E STUDIO DELLA CO-OCCORRENZA TRA AFASIA PROGRESSIVA PRIMARIA E SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Deficit linguistici dello spettro delle afasie progressive primarie (APP) sono riconosciuti come uno dei principali aspetti caratterizzanti il fenotipo cognitivo dei pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA) – sufficienti, alla luce dei criteri revisionati di Strong *et al.* (2017), per porre diagnosi declino cognitivo lieve in tale popolazione. Tuttavia, l’esatta prevalenza di tali deficit, nonché i fattori motori e non-motori sottesi alla loro manifestazione, risultavano, sino al 2022, per lo più sconosciuti. Pertanto, nel corso di quest’anno, si è proceduto all’esecuzione di uno studio epidemiologico sui deficit linguistici in pazienti SLA non dementi, pubblicato su *European Journal of Neurology* [Solca *et al.*, 2022] – il quale ha rivelato come circa il 23% dei pazienti indagati ( $N=348$ ) presentasse deficit linguistici al *sub-test* dedicato dell’Edinburgh Cognitive and Behavioural ALS Screen (ECAS), nonché come tali disfunzioni fossero in larga parte, sebbene non del tutto, attribuibili a deficit di natura esecutiva (circa il 47% della variabilità delle prestazioni linguistiche risultava non spiegata). Tale indagine detiene tutt’ora il primato, nell’ambito della letteratura sulla neuropsicologia del linguaggio nella SLA, sia per numerosità campionaria che per l'estesa gamma di predittori motori e non-motori tenuti in considerazione.

Un altro tema su cui il Centro si è focalizzato è invece quello della co-presenza di SLA e florida APP – ricorrenza che, seppur frammentariamente, è stata sovente riportata in letteratura. In una revisione sistematica e metanalisi pubblicata su *Frontiers in Aging Neuroscience* [Aiello *et al.*, 2022a], si è messo in luce, per la prima volta nel panorama internazionale, che il 6% circa di pazienti APP possono presentare SLA, nonché come, nei casi di co-occorrenza di SLA e degenerazione frontotemporale (DFT), il 19% dei casi presenti come fenotipo di DFT l’APP stessa. Inoltre, in tale studio, si sono approfonditi le caratterizzazioni fenotipiche, genetiche e neuropatologiche dei pazienti con sindrome APP-SLA, dimostrando che: 1) il fenotipo di APP non-fluente risulta essere più frequente di quello fluente (*i.e.*, demenza semantica); 2) il coinvolgimento bulbare, l’interessamento sistematico del primo motoneurone e manifestazioni extra-piramidali sono caratteristici dell’APP-SLA; 3) la mutazione *TBK1* rappresenta il più frequente fattore di rischio genetico per APP-SLA; 4) il substrato neuropatologico più comune a tale sindrome è la *TDP-43-B*.

## **AVANZAMENTI IN MATERIA DI SCREENING COGNITIVO E COMPORTAMENTALE NELLA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA**

Numerosi studi pubblicati nell'anno 2022 dal Centro si sono focalizzati sullo studio e/o sull'approfondimento delle proprietà clinimetriche e dell'utilizzabilità clinica di strumenti di screening cognitivo e comportamentale nei pazienti con SLA. Relativamente allo screening cognitivo, due studi, su un'ampia casistica ( $N=348$ ) di pazienti SLA non dementi, si sono focalizzati rispettivamente sul Montreal Cognitive Assessment (MoCA) [Aiello *et al.*, 2022b] – test per lo screening dei deficit cognitivi globali – e sulla Frontal Assessment Battery (FAB) [Aiello *et al.*, 2022c] – breve batteria per lo screening delle disfunzioni esecutive –, dimostrandone la bontà psicométrica e diagnostica, nonché l'utilizzabilità clinica trasversale, e derivandone cut-off malattia specifici. Al contempo, nell'ambito di tali studi, si è dimostrato come il grado di somministrabilità sia del MoCA (*i.e.*, circa 80%) che della FAB (*i.e.*, circa 85%) sia risultato minore rispetto a quello dell'ECAS (*i.e.*, 100%), nonché come la proporzione di MoCA/FAB somministrabili decrementasse con l'avanzare della disabilità motoria – in linea con la nozione secondo cui è auspicabile l'impiego di test cognitivi che bypassino le limitazioni verbo-motorie tipiche della malattia. Un terzo studio, pubblicato su *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* [Aiello *et al.*, 2022d], è stato poi finalizzato alla derivazione di soglie per la detezione di modificazioni clinicamente significative nel tempo per la sezione cognitiva della versione Italiana dell'ECAS. Di rilievo, nell'ambito di tale indagine, si è dimostrato come l'ECAS, ad una distanza di circa 6 mesi, non sia soggetto a effetti pratica e attendibile al *retest*. Infine, un ulteriore studio [Aiello *et al.*, 2022e] è stato finalizzato all'indagine delle proprietà psicométriche e diagnostiche, nonché dell'utilizzabilità clinica trasversale, di un altro *gold-standard* per lo screening cognitivo nei pazienti con SLA – *i.e.*, la sezione cognitiva dell'ALS Cognitive Behavioral Screen (ALS-CBS). Infatti, per quanto l'ALS-CBS sia stato recentemente tarato per la popolazione Italiana [Tremolizzo *et al.*, 2020], nessuna indagine approfondita in materia di proprietà clinimetriche e utilizzabilità era stata ancora condotta in merito – ad eccezione di un ulteriore lavoro ad opera del Centro e risalente all'anno 2021 [Greco *et al.*, 2021], che aveva mirato a comparare le capacità dell'ALS-CBS e dell'ECAS in quanto a detezione dei deficit cognitivi e comportamentali. Nell'ambito dello studio di Aiello *et al.* (2022e), si sono pertanto dimostrate la validità di costrutto e fattoriale, l'attendibilità interna e la bontà diagnostica dell'ALS-CBS – comparandolo con l'ECAS stesso. Anche per quanto concerne l'ALS-CBS, inoltre, si sono derivati cut-off malattia-specifici.

Per quanto concerne lo screening comportamentale, il Centro ha poi pubblicato due studi finalizzati a standardizzare la versione Italiana delle scale comportamentali incluse nell'ECAS e nell'ALS-CBS – rispettivamente, l'ECAS-Carer Interview (ECAS-CI) [Poletti *et al.*, 2022] e il Caregiver Behavioral Questionnaire (CBQ) [Aiello *et al.*, 2023a]. Di ambo le scale sono state dimostrate la bontà psicométrica e diagnostica, nonché l'utilizzabilità clinica, in ampi campioni di pazienti SLA non dementi (circa  $N=300$ ). Peraltro, sono stati derivati cut-off SLA-specifici sia per l'ECAS-CI e il CBQ. I suddetti studi sugli strumenti di screening cognitivo e comportamentale nei pazienti con SLA faciliteranno augurabilmente la pratica clinica e la conduzione sia di studi epidemiologici che di *trial* clinici che considerano questa patologia.

## **AVANZAMENTI IN MATERIA DI SCREENING COGNITIVO E COMPORTAMENTALE NEI DISTURBI DEL MOVIMENTO E NELLO SPETTRO DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER**

Le proprietà clinimetriche e l'utilizzabilità clinica della FAB sono state valutate in ulteriori due studi ad opera del centro – il primo focalizzantesi sullo spettro della malattia di Alzheimer (MdA) [Aiello *et al.*, 2022f] e il secondo sulla malattia di Huntington (MdH) [Solca *et al.*, 2022b]. Nello studio relativo alla MdA, la FAB si è dimostrata un utile test di screening nella differenziazione tra pazienti con *mild cognitive impairment* e demenza florida; in tale occasione, cut-off specifici sono stati derivati per discriminare tra i due livelli di gravità della malattia. Di rilievo come, nel suddetto studio, la presenza di MdA fosse stata certificata, in accordo con il sistema ATN [Jack *et al.*, 2018] mediante analisi del liquido cerebrospinale. Nel secondo studio, focalizzantesi sulla MdH, la FAB ha parimenti

dimostrato ottime proprietà psicométriche e diagnostiche; peraltro, anche in tale occasione, *cut-off* malattia-specifici sono stati derivati al fine di coadiuvare la detezione di deficit cognitivi. Rilevantemente, tale indagine sulla MdH risulta possedere un respiro non già ristretto al panorama Italiano, rispondendo direttamente all'esortazione, risalente al 2017, ad opera della Movement Disorders Society – presso cui fu evidenziata la scarsità di solidi studi clinimetrici relativi ai test di screening cognitivo nella MdH [Mestre *et al.*, 2017]. Infine, uno studio collaborativo del Centro con l'Università “Luigi Vanvitelli” si è focalizzato sullo studio delle proprietà psicométriche e diagnostiche della rinomata Beck Depression Inventory-II (BDI-II), un questionario *self-report* per lo screening della sintomatologia depressiva, nei pazienti con malattia di Parkinson (MdP) [Maggi *et al.*, 2023].

### ***AVANZAMENTI IN MATERIA DI VALUTAZIONE COGNITIVA DI SECONDO LIVELLO NELLE MALATTIE NEURODEGENERATIVE***

Due studi ad opera del Centro hanno poi avuto come oggetto di indagine lo studio clinimetrico e di utilizzabilità clinica di misure cognitive di approfondimento (ossia, di secondo livello) in due popolazioni neurodegenerative – *i.e.*, pazienti con SLA e con MdA. Il primo studio [Aiello *et al.*, 2022g] si è proposto di studiare approfonditamente le proprietà psicométriche e l'utilizzabilità clinica trasversale del rinomato Reading the Mind in the Eyes Test (RMET) – un *gold-standard* per la valutazione delle abilità socio-cognitive – in pazienti con SLA. In tale studio – giustificato da recenti evidenze metanalitiche suggestive del fatto che, a livello internazionale, tale strumento risultasse clinimetricamente solido in tale popolazione [Taule *et al.*, 2019] –, la bontà psicometrica dello RMET è stata confermata in una coorte di pazienti SLA non dementi, così come anche la capacità del test di discriminare i pazienti da soggetti di controllo normotipici. Rilevantemente, in tale studio, si è secondariamente dimostrato – per la prima volta nella letteratura internazionale concernente – come lo RMET fosse selettivamente associato con altre misure socio-cognitive, pertanto dimostrandone l'ottima validità di costrutto. Il secondo studio si è poi proposto di verificare l'utilità dei test di fluenza semantica, nonché della controintuitiva discrepanza tra le prestazioni alle fluenze semantiche e fonemiche (a favore delle ultime) [Vaughan *et al.*, 2016], come marcatore cognitivo in pazienti con MdA confermata a livello liquorale [Aiello *et al.*, 2023b]. In tale studio, prestazioni peggiori ad entrambe le misure suddette sono risultate correlare con concentrazioni patologiche di proteina tau<sub>181</sub> fosforilata nel liquor dei pazienti – ciò dimostrando come la nozione comune, e diffusa nella pratica clinica, per la quale i test di fluenza semantica risultano particolarmente efficaci nella detezione di declino cognitivo in pazienti con sospetta MdA, trova effettivamente riscontro nelle alterazioni neurochimiche riflettenti la patofisiologia della malattia stessa.

Infine, uno studio collaborativo con l'IRCCS Istituto Scientifico San Raffaele e pubblicato su *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Frontotemporal Degeneration* [Canu *et al.*, 2023] ha permesso la derivazione di dati normativi, nonché lo studio dell'utilizzabilità clinica e dei correlati neurali, degli indici di fluenza verbali corretti per le disabilità verbo-motorie nei pazienti con SLA.

### ***SEMEIOTICA DELL'APATIA NEI DISTURBI NEURODEGENERATIVI***

Uno studio collaborativo, seppur condotto dal Centro stesso, si è proposto di indagare comparativamente le manifestazioni fenotipiche e le determinanti motorie e non-motorie della sintomatologia apatica nei pazienti con SLA, MdH e MdP [Poletti *et al.*, 2022a]. In tale studio, che ha adottato la Dimensional Apathy Scale (DAS) [Santangelo *et al.*, 2017] – questionario valutante l'aporia al netto delle disabilità motorie, e infatti originariamente sviluppato al fine di valutarne la presenza in patologie affliggenti a vario titolo il sistema motorio –, si è osservato come: 1) i pazienti con MdP e MdH, ma non quelli con SLA, risultassero significativamente più apatici rispetto a soggetti di controllo normotipici; 2) i pazienti con MdH mostrassero una riduzione selettiva nell'iniziazione cognitivo-comportamentale e nell'attività *goal-oriented*; 3) i pazienti con MdP e MdH risultassero in generale più apatici rispetto a quelli con SLA; 4) la scolarità risultasse un fattore protettivo contro l'emergenza di sintomatologia apatica nei pazienti con SLA; 5) l'ansia – specialmente di stato risultasse un fattore di rischio per lo sviluppo di aporia nella SLA, nella MdH e, seppur in misura

minore, anche nella PD; 6) i deficit cognitivi – come valutati dall’ECAS – rappresentassero un fattore di rischio per l’emergenza di sintomi apatici unicamente nei pazienti con MDP e SLA; 7) elevati livelli depressivi determinassero una riduzione dell’attività *goal-oriented* nella MDP. Rilevantemente, tale studio non ha tuttora precedenti nell’ambito della letteratura nazionale ed internazionale – fornendo pertanto rilevanti informazioni semeiotiche di pratica applicazione clinica e sperimentale.

### ***CONFERMA STORICA DELL’ASSOCIAZIONE TRA SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA E DEGENERAZIONE FRONTOTEMPORALE***

Un’indagine a carattere storico, in collaborazione con il Dr. Stefano Zago, dirigente dell’Ambulatorio di Neuropsicologia presso l’U.O.C. di Neurologia della Fondazione IRCCS Ca’ Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, e sostenuta dal Dr. Lorenzo Lorusso, primario dell’U.O. di Neurologia e Stroke Unit dell’ASST di Merate, tramite la Biblioteca di Area Medica “Adolfo Ferrate” dell’Università di Pavia, ha messo in luce, attraverso l’analisi di manoscritti storici datati dalla fine dell’800 agli anni ’80 del ‘900, come l’associazione tra SLA e DFT fosse stata riconosciuta dalla comunità clinico-scientifica mondiale più di un secolo prima rispetto al momento in cui, comunemente, si data tale scoperta – ossia, attorno ai primi anni del presente secolo [Zago *et al.* 2022a]. Di rilievo, tale revisione storica ha suscitato interesse internazionale, come testimoniato dalla susseguente corrispondenza pubblicata con Autori francesi di spicco nell’ambito della SLA [Zago *et al.*, 2022b].

### ***ANALISI DELLE SEQUELE COGNITIVE DELL’INFEZIONE DA SARS-COV-2***

L’anno 2022 ha visto il Centro anche coinvolto nel prosieguo dell’indagine delle conseguenze neurologiche della COVID-19. Facendo infatti seguito allo studio longitudinale dimostrante la persistenza di disturbi cognitivi in tale popolazione clinica a distanza di un anno [Ferrucci *et al.*, 2022], due studi in cui il Centro è stato coinvolto hanno testimoniato, rispettivamente, alterazioni neurofunzionali, mediante tomografia a emissione di positroni, in una *case series* di pazienti con sindrome cognitiva post-COVID-19 [Ferrucci *et al.*, 2023], nonché la possibilità di semplici compiti attentivi di natura visuo-spaziale di rilevare la sintomatologia tipica della sindrome post-COVID-19 [Maiorana *et al.*, 2023].

### ***ISTITUTO VIRTUALE PARKINSON e PROGETTO ParkNET***

Nell’ambito dell’Istituto Virtuale l’Istituto Auxologio Italilano contribuisce attivamente a fornire la propria ciasistica di pazienti affetti da Malattia di Parkinson per screening genetico in relazione in particolare al gene *GBA*. Infatti dei 59 pazienti analizzati con pannello, 2 sono risultati mutati per il gene *GBA*. Obiettivo della collaborazione è quello di definire un protocollo ottimizzato da condividere tra i diversi istituti e procedere ad una attenta caratterizzazione clinica dei pazienti mutati contribuendo a fornire una casistica nazionale attentamente studiata. I pazienti sono registrati nel RedCap locale per poi essere raccolti su CBIM.

### ***DISFAGIA NELLA MALATTIA DI HUNTINGTON***

La Malattia di Huntington (MH - MIM ID #143100), è una patologia neurodegenerativa a trasmissione autosomica dominante causata dall’espansione di una tripletta CAG nel gene IT-15. La malattia ha una prevalenza di 5-10/100.000 persone ed esordio nella vita adulta (35-40 anni). Le caratteristiche cliniche della MH includono sintomi motori, alterazioni cognitive e disturbi psichiatrici principalmente legati alla disfunzione ed alla perdita dei neuroni dei gangli della base. La MH ha un decorso lentamente progressivo che porta al decesso dopo 15-20 anni, generalmente causato da polmonite *ab ingestis* a seguito della disfunzione della muscolatura bulbare. La disfagia in corso di Malattia di Huntington è ancora poco caratterizzata. Infatti, sebbene la pratica clinica sembrerebbe suggerire che difficoltà deglutitore si presentino anche in fase relativamente precoce, l’entità e la frequenza in relazione allo stadio di malattia ed alla terapia farmacologica in atto non sono ancora state studiate in maniera accurata.

Lo studio, in collaborazione con il Reparto di Foniatria dell’Ospedale L. Sacco (Prof. A. Schindler) e UOC Genetica Medica – Neurogenetica dell’INN C. Besta (Dott.ssa C. Mariotti) si propone di: 1)

valutare l'incidenza del disturbo disfagico in pazienti affetti da Malattia di Huntington a diversi stadi di malattia; 2) identificare quali disordini motori, cognitivi e/o comportamentali correlino con specifiche alterazioni della dinamica deglutoria; 3) individuazione di interventi riabilitativi e compensativi in MH e valutazione di efficacia tramite re-testing a 6 mesi.

Nel corso del 2017-2019 sono stati studiati più di 60 pazienti affetti da Malattia di Huntington e 30 controlli con valutazioni clinica e strumentali (fibrolaringoscopia) della disfagia. Una prima analisi dei dati ha permesso di identificare alterazioni della funzione deglutoria già nelle primissime fasi di malattia e di dimostrare una buona correlazione con alcuni aspetti fenotipici della malattia (Schindler A. et al., 2020). Successive analisi hanno permesso di identificare la correlazione tra disfagia e rischio di malnutrizione in HD (Pizzorni N. et al. 2022). Ulteriori studi sono in corso per la valutazione longitudinale del disturbo disfagico in HD.

### **CENTRO TRIAL**

Nel 2022 è stata rivolta particolare attenzione all' ulteriore sviluppo del Centro Trial volto al trattamento sperimentale con nuovi farmaci per rallentare il decorso, in particolare, della Sclerosi Laterale Amiotrofica. Presso il Centro, diretto dal Prof. V.Silani, vengono concluse attività diagnostiche (EMG e Potenziali Evocati), terapeutiche (dispensazione di Riluzolo e trattamenti sperimentali sia farmacologici, che non, come nel caso dell'elettroceutica che si pone l'obiettivo di modulare l'attività della corteccia cerebrale mediante magneti ad alto campo), e di ricerca, sia clinica che di base. L'attività comprende un servizio ambulatoriale di II° livello, con possibilità di eseguire tutti gli accertamenti clinici e strumentali necessari, e la successiva attivazione dei protocolli sperimentali. Nel corso del 2023, sono stati condotti trial clinici di Fase II e III sia a livello nazionale che internazionale (europeo e globale) con svariati protocolli protocolli

Tali protocolli hanno offerto la possibilità ai nostri Pazienti di partecipare allo studio di terapie nuove ed innovative. Il Centro SLA è diventato negli anni un Centro di riferimento con un'esperienza consolidata nell'ambito della ricerca scientifica, con pazienti afferenti da vari ospedali del Paese per partecipare ai numerosi Trial nazionali ed internazionali. Particolare attenzione è stata rivolta allo sviluppo di tecnologie alternative e da remoto per mantenere il rapporto ed il monitoraggio dei pazienti domiciliati.

L'attività Trial nel 2022 si è ampliata andando ad inserirsi anche nel mondo della terapia delle Cefalee ed in particolare dell'emicrania, partecipando a studi internazionali per il trattamento della stessa con innovativi farmaci (anticorpi anti CGRP) per il controllo di invalidità e dolore da essa generate (Studi PEARL, TRIUMPH).

### **L' ATTIVITÀ DEL CENTRO “DINO FERRARI” SI È ARTICOLATA NEL 2022 CON I SEGUENTI CENTRI:**

#### **CENTRO SCLEROSI LATERALE AMIOTROFICA (SLA)**

Nell'anno 2022, oltre 250 pazienti affetti da patologia motoneuronale (prevalentemente SLA) sono stati esaminati nel Centro SLA. Alla valutazione clinica sono state accostate diverse indagini ed iniziative terapeutiche:

- ricerca di mutazioni nei geni ad oggi associati a SLA mediante utilizzo di metodologia next-generation sequencing (NGS) con l'utilizzo di un pannello genico da noi disegnato a scopo diagnostico (tecnologia Illumina) comprendente 24 geni causativi di SLA: *ALS2, ANG, CHMP2B, DCTN1, FUS, GRN, HNRNPA1, HNRNPA2B1, MAPT, MATR3, NEK1, OPTN, PFN1, SETX, SOD1, SPAST, SPG11, SQSTM1, TARDBP, TBK1, TUBA4A, UBQLN2, VAPB, VCP*. La presenza di sequenze ripetute espansse nel gene *C9orf72* è stata valutata a parte rispetto al pannello NGS mediante metodiche diverse (Fragment lenght analysis in fluorescenza e Repet-primed PCR). Il pannello NGS da noi utilizzato comprende anche geni causativi di altre malattie neurodegenerative in stretta sovrapposizione clinico-molecolare tra loro (Demenza frontotemporale, Malattia di Alzheimer, Amiloidosi cerebrale, Malattia di Parkinson), consentendo un più ampio e completo inquadramento diagnostico dei pazienti;

- sviluppo di nuovi parametri neurofisiologici per definizione del numero residuo di Unità Motorie (MUNE) ed analisi neurofisiologica della funzionalità diaframmatici per porre indicazione alla NIV;
- analisi delle caratteristiche nutrizionali con studio della PEG, BMI, etc, in collaborazione con l'Unità di Endocrinologia dell'IRCCS Istituto Auxologico Italiano;
- valutazione neuropsicologica longitudinale dei pazienti affetti da SLA mediante valutazioni seriate nel tempo al fine di evidenziare la presenza e l'evolutività di specifici deficit cognitivi e/o comportamentali, tramite la somministrazione dello strumento di screening ECAS, messo a punto e validato nella sua versione italiana dal Servizio di Neuropsicologia e psicologia Clinica (Poletti et al., 2016);
- conduzione di trial terapeutici per la Sclerosi Laterale Amiotrofica

Il Centro "Dino Ferrari" ha partecipato a diverse iniziative nazionali ed internazionali per l'ottimizzazione delle cure palliative, la definizione dei costi della malattia, l'educazione dei medici e paramedici in stretto rapporto con l'AISLA (Associazione Italiana Sclerosi Laterale Amiotrofica), la definizione dei criteri di invalidità in collaborazione con la Regione Lombardia. Il Centro "Dino Ferrari" è implicato nel Gruppo di Studio Malattie del Motoneurone della Società Italiana di Neurologia - SIN) e nell' European ALS Consortium (ENCALS) e, più recentemente, nel Northeast ALS Consortium. Il Prof. Silani è membro del Website Management Committee della World Federation of Neurology in rapporto alla ALS/MND e dirige il Centro ERN EURO-NMD dedicato alla SLA ed altre malattie del motoneurone.

## **CENTRO MALATTIA di PARKINSON E DISORDINI DEL MOVIMENTO**

Nel corso dell'anno 2022, oltre 500 pazienti circa affetti da diversi disordini extrapiramidali del movimento (Morbo di Parkinson, Paralisi Sopranucleare Progressiva, Atrofia Multisistemica e Degenerazione Cortico-Basale, Corea di Huntington, ect.) sono stati esaminati e trattati presso il "Centro Disturbi del Movimento" che ha eseguito circa 1.500 visite ambulatoriali. È stata creata una stretta collaborazione con l'Associazione Parkinson Milano di cui il Prof. V. Silani fa parte del Comitato Scientifico creando un interscambio scientifico e di pazienti. È stata creata una équipe multispecialistica per la presa in carico del paziente. Il Centro è stato originariamente riconosciuto nell'ambito del NECTAR (Network for European CNS Transplantation and Regeneration) dedicato alle malattie extrapiramidali.

Il Centro offre la possibilità di accedere ad Ambulatorio di II livello in diverse sedi dell'Istituto Auxologico (Ospedale San Luca, poliambulatorio Procaccini, Poliambulatorio di Pioltello e di Meda) e di accedere a Day Hospital multispecialistico (Sede Ospedale San Luca).

Nel corso del 2022 è inoltre continuato il reclutamento di pazienti per lo studio di Validazione CASANOVA-PD (Validazione di una strumentazione ergonomica e superleggera per la misura quantitativa ed oggettiva del movimento degli arti superiori ed inferiori e della marcia nella malattia di Parkinson: studio trasversale, controllato, in aperto, pilota) che vede come promotore l'Istituto di BioRobotica, Scuola Superiore Sant'Anna e U.O. di Neurologia, Ospedale Apuane; AUSL Toscana Nord Ovest. I dati preliminari ottenuti sono in corso di pubblicazione.

Dal 2005 è presente un Centro dedicato alla Malattia di Huntington con creazione di una équipe plurispecialistica formata da neurologi, psichiatri, genetisti, neuropsicologi, logopedisti e fisiatri nell'intento di fornire un approccio interdisciplinare al paziente, garantendo così un supporto ed un riferimento costante nel tempo che è stato esteso anche ai familiari. Nell'ambito della Malattia di Huntington l'assenza di una cura risolutiva della malattia comporta un particolare impatto emotivo nel soggetto che ancora asintomatico decide di testarsi per la mutazione. Ciò impone un continuo supporto psicologico al paziente durante tutto il lungo processo che porta alla diagnosi pre-clinica. Per questo è stato sviluppato ed applicato un protocollo di test predittivo nella Malattia di Huntington secondo le linee guida dell'International Huntington Association e della Federazione Mondiale di Neurologia. Nel corso del 2022 sono state seguite varie famiglie affette da Malattia di Huntington e seguiti dieci pazienti nell'iter del test predittivo. Alla valutazione clinica sono state accostate diverse

indagini ed iniziative terapeutiche quali lo studio del sonno nei pazienti affetti da M. di Huntington in collaborazione con il Centro del Sonno (Dott.ssa Carolina Lombardi). Particolare attenzione è oggi dedicata alla cura della disfagia ed accanto alle complicanze polmonari principale causa di morte dei pazienti. Il Dott. Andrea Ciammola ha dato particolare impulso a questa iniziativa unitamente alla équipe multidisciplinare dedicata.

### **CENTRO DISTURBI COGNITIVI e DEMENZE (CDCD)**

Nell'anno 2022 si è registrato un considerevole numero di pazienti che si sono rivolti al nostro Centro per una valutazione neuropsicologica. Sono state effettuate oltre 3.000 prestazioni neuropsicologiche e psicodiagnostiche per pazienti degenti in regime di ricovero ordinario o in Day Hospital o per pazienti ambulatoriali, nonché 1.000 colloqui psicologici clinici in pazienti affetti da molteplici forme di coinvolgimento cognitivo quali Mild Cognitive Impairment (MCI), Malattia di Alzheimer, Demenza Fronto-Temporale, Demenza con Corpi di Lewy, Parkinson-Demenza, Malattia di Huntington, Paralisi Sopranucleare Progressiva e Degenerazione Cortico-Basale. Oltre all'ambulatorio neuropsicologico convenzionato S.S.N. è operativo un ambulatorio di Valutazione Multidimensionale dei Disturbi Cognitivi condotto congiuntamente da neurologo e neuropsicologo nell'ottica di fornire al paziente affetto da patologia cognitiva un'approccio multidisciplinare che tenga conto delle molteplici problematiche che spesso ne caratterizzano il decorso clinico. Particolare attenzione è stata posta alla valutazione neuropsicologica longitudinale dei pazienti affetti da patologia motoneuronale (SLA, PLS) esaminati nel Centro SLA. Sono stati organizzati diversi eventi formativi ECM in merito all'inquadramento dei disturbi cognitivi, agli aspetti di diagnosi differenziale e gestione dei disturbi psico-emotivi delle malattie neurodegenerative.

Il Centro lavora in sinergia con il Laboratorio di Neuroscienze e con il Laboratorio analisi, ove vengono effettuati saggi in chemiluminescenza (CLEIA) per il dosaggio su liquor dei biomarcatori della malattia di Alzheimer (frammento amiloide beta 1-42, frammento amiloide beta 1-40, proteina tau totale, proteina tau fosforilata).

Il Centro per i Disturbi Cognitivi e le Demenze (CDCD) dell'Ospedale San Luca-Istituto Auxologico Italiano IRCCS, di cui è responsabile il Dott. F. Verde e che afferisce al Dipartimento di Neurologia diretto dal Prof. V. Silani, è riconosciuto dalla Regione Lombardia ed inserito nell'elenco dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS).

Il Centro è uno dei componenti dell'Istituto Virtuale Demenze, nel quale il Dott. F. Verde ricopre l'incarico di co-task leader del task "Clinica".

### **CENTRO CEFALEE**

Il Centro Cefalee dell'Istituto Auxologico Italiano IRCCS, nell'anno 2022 ha ulteriormente incrementato l'attività clinica, ha maggiormente differenziato le prestazioni offerte e si è reso più attivo nell'ambito della ricerca clinica, partecipando a studi clinici nazionali ed internazionali.

L'attività del Centro Cefalee così si articola:

- 1) VISITE AMBULATORIALI: in diverse sedi dell'Istituto Auxologico, distribuite nell'area milanese e brianzola, vi sono ambulatori di II livello dedicati ai pz emicranici (Ospedale San Luca, Clinica San Carlo, poliambulatorio Procaccini, Poliambulatorio di Pioltello e di Meda), totalizzando circa 3000 visite nell'anno 2022
- 2) MACROATTIVITA' AMBULATORIALE COMPLESSA: costituita da trattamenti endovenosi, della durata di 5 giorni, finalizzati alla disassuefazione dei pazienti con emicrania cronica che hanno assunto in modo incongruo FANS e triptani. Nel 2022 sono stati effettuati 45 trattamenti
- 3) TERAPIA CON TOSSINA BOTULINICA: Un totale di circa 150 pazienti, affetti da emicrania cronica e non responsivi ai comuni farmaci di profilassi, sono stati sottoposti ad infiltrazioni di tossina botulinica nel 2022

- 4) TERAPIA PSICOCOMPORTAMENTALE: tecniche di rilassamento muscolare e di mindfulness si affiancano e supportano efficacemente le tradizionali terapie farmacologiche agendo sui fattori emotivi e comportamentali presenti nei pazienti emicranici.
- 5) NUOVE TERAPIE ANTIEMICRANICHE: La recente disponibilità di utilizzo di anticorpi monoclonali anti CGRP ha aperto nuove possibilità terapeutiche nell'ambito delle emicranie. Al Centro Cefalee dell'Auxologico è stata data la possibilità di utilizzare i tre anticorpi erenumab, galcanezumab e fremanezumab nei pazienti emicranici cronici, per i quali la terapia di profilassi tradizionale era risultata inefficace o causa di importanti effetti collaterali. Sono stati trattati complessivamente 130 pazienti
- 6) REGISTRO NAZIONALE EMICRANIE CRONICHE: Il Centro Cefalee dell'Auxologico partecipa, insieme ad altri centri italiani, al progetto di costituzione di un registro nazionale della emicrania cronica, iniziativa promossa dall'Istituto Superiore di Sanità, con l'intento di definire con precisione l'epidemiologia, l'impatto sociale e il peso economico dell'emicrania cronica. La registrazione dei pz è iniziata nel 2021e proseguirà per 5 anni. Al momento sono stati arruolati 60 pazienti.
- 7) TRIAL CLINICI: Il Centro Cefalee dell'Auxologico sta partecipando a diversi studi clinici internazionali e nazionali:
  - Studio paneuropeo prospettico osservazionale sull'efficacia di fremanezumab in pazienti con emicrania cronica ed episodica nella vita reale (PEARL)
  - Trattamento preventivo dell'emicrania: outcome dei pazienti ed efficacia dei farmaci di profilassi nella pratica clinica (Triumph)
- 8) DIETA CHETOGENICA: La validità scientifica, supportata da numerose ricerche, della dieta chetogenica, la rende una utile misura da affiancare ai farmaci. Quindi la presenza, all'interno dell'Istituto Auxologico, di una dietologa specializzata nella prescrizione della dieta chetogenica va incontro alla richiesta di un numero sempre maggiore di pazienti che, oltre alle terapie tradizionali, richiedono trattamenti non farmacologici per la cefalea

## CENTRO DI MEDICINA DEL SONNO

È continuata nel corso del 2022 l'attività del Centro di Medicina del Sonno presso l'IRCCS Istituto Auxologico Italiano, Ospedale San Luca, diretto dalla Prof.ssa Lombardi.

Nello 2022 sono state eseguite circa oltre 1.000 visite ambulatoriali e polisonnografie portatili, 200 video polisonnografie in laboratorio di medicina del sonno, 60 monitoraggi polisonnografici prolungati (24 ore) e 20 actigrafie.

Le patologie osservate nel centro, vista anche l'ispirazione volutamente multidisciplinare, riguardano ad ampio spettro le malattie cardiovascolari associate a disturbi respiratori durante il sonno (ipertensione arteriosa, scompenso cardiaco, stroke) e tutte le patologie neurologiche coinvolgenti il sonno, comprendendo quindi i disturbi del respiro in corso di sonno (Sindrome delle Apnee Ostruttive nel Sonno – OSAS -, Sindrome delle Apnee Centrali, Ipoventilazione Centrale, alterazioni del pattern ventilatorio nelle patologie neuromuscolari), le ipersonnie (narcolessia, ipersonnie secondarie a malattie neurodegenerative), le parasonnie REM e NREM (disturbo comportamentale della fase REM, sonnambulismo, bruxismo ecc), le epilessie ad estrinsecazione prevalentemente notturna (Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy) i disturbi del movimento in corso di sonno (Sindrome delle Gambe senza Risposo) e tutte le forme di insonnia. Oltre alle attività assistenziali, il Centro cura un'ampia sfera di ricerca

## PRODUZIONE SCIENTIFICA ANNO 2022

Al Khleifat A, Iacoangeli A, Jones AR, van Vugt JJFA, Moisse M, Shatunov A, Zwamborn RAJ, van der Spek RAA, Cooper-Knock J, Topp S, van Rheenen W, Kenna B, Van Eijk KR, Kenna K, Byrne R, López V, Opie-Martin S, Vural A, Campos Y, Weber M, Smith B, Fogh I, Silani V, Morrison KE, Dobson R, van Es MA, McLaughlin RL, Vourc'h P, Chio A, Corcia P, de Carvalho M, Gotkine M, Panades MP, Mora JS, Shaw PJ, Landers JE, Glass JD, Shaw CE, Basak N, Hardiman O, Robberecht W, Van Damme P, van den Berg LH, Veldink JH, Al-Chalabi A.

*Telomere length analysis in amyotrophic lateral sclerosis using large-scale whole genome sequence data.*

**Front Cell Neurosci.** 2022 Dec 15;16:1050596. doi: 10.3389/fncel.2022.1050596.

Brusati A, Ratti A, Pensato V, Peverelli S, Gentilini D, Dalla Bella E, Sorce MN, Meneri M, Gagliardi D, Corti S, Gellera C, Lauria Pinter G, Ticozzi N, Silani V.

*Analysis of miRNA rare variants in amyotrophic lateral sclerosis and in silico prediction of their biological effects.*

**Front Genet.** 2022 Dec 7;13:1055313. doi: 10.3389/fgene.2022.1055313.

Santangelo S, Bossolasco P, Magri S, Colombrita C, Invernizzi S, Gellera C, Nanetti L, Di Bella D, Silani V, Taroni F, Ratti A.

*Generation of an iPSC line from a patient with spastic paraplegia type 10 carrying a novel mutation in KIF5A gene.*

**Stem Cell Res.** 2023 Feb;66:103008. doi: 10.1016/j.scr.2022.103008.

Aiello EN, Greco LC, La Tona A, Solca F, Torre S, Carelli L, Pain D, Radici A, Lizio A, Casiraghi J, Cerri F, Brugnera A, Compare A, Woolley S, Murphy J, Tremolizzo L, Appollonio I, Verde F, Silani V, Ticozzi N, Lunetta C, Sansone VA, Poletti B.

*Clinimetrics of the cognitive section of the Italian ALS Cognitive Behavioral Screen (ALS-CBS™).*  
**Neurol Sci.** 2022 Dec 22. doi: 10.1007/s10072-022-06569-9.

Aiello EN, Verde F, Milone I, Giacopuzzi Grigoli E, Dubini A, Carelli L, Ferrucci R, Priori A, Ratti A, Torresani E, Ticozzi N, Silani V, Poletti B.

*The Frontal Assessment Battery (FAB) effectively discriminates between MCI and dementia within the clinical spectrum of neurochemically confirmed Alzheimer's disease.*

**Front Psychol.** 2022 Nov 30;13:1054321. doi: 10.3389/fpsyg.2022.1054321.

Solca F, Aiello EN, Migliore S, Torre S, Carelli L, Ferrucci R, Priori A, Verde F, Ticozzi N, Maffi S, Ceccarelli C, Squitieri F, Silani V, Ciammola A, Poletti B.

*Diagnostic properties of the Frontal Assessment Battery (FAB) in Huntington's disease.*

**Front Psychol.** 2022 Nov 30;13:1031871. doi: 10.3389/fpsyg.2022.1031871.

Maiorana N, Brugnera A, Galiano V, Ferrara R, Poletti B, Marconi AM, Garzia E, Ticozzi N, Silani V, Priori A, Ferrucci R.

*Emotional and autonomic response to visual erotic stimulation in patients with functional hypothalamic amenorrhea.*

**Front Endocrinol (Lausanne).** 2022 Dec 2;13:982845. doi: 10.3389/fendo.2022.982845.

Lattuada C, Santangelo S, Peverelli S, McGoldrick P, Rogaea E, Zinman L, Haase G, Géli V, Silani V, Robertson J, Ratti A, Bossolasco P.

*Generation of five induced pluripotent stem cells lines from four members of the same family carrying a C9orf72 repeat expansion and one wild-type member.*

**Stem Cell Res.** 2023 Feb;66:102998. doi: 10.1016/j.scr.2022.102998.

Verde F, Milone I, Maranzano A, Colombo E, Torre S, Solca F, Doretti A, Gentile F, Manini A, Bonetti R, Peverelli S, Messina S, Maderna L, Morelli C, Poletti B, Ratti A, Silani V, Ticozzi N. *Serum levels of glial fibrillary acidic protein in patients with amyotrophic lateral sclerosis.* **Ann Clin Transl Neurol.** 2023 Jan;10(1):118-129. doi: 10.1002/acn3.51708.

Solca F, Aiello EN, Torre S, Carelli L, Ferrucci R, Verde F, Ticozzi N, Silani V, Monti A, Poletti B. *Prevalence and determinants of language impairment in non-demented amyotrophic lateral sclerosis patients.*

**Eur J Neurol.** 2022 Nov 29. doi: 10.1111/ene.15652.

Giacopuzzi Grigoli E, Solca F, Milone I, Aiello EN, Dubini A, Ratti A, Torresani E, Poletti B, Ticozzi N, Ciusani E, Silani V, Verde F.

*Cerebrospinal fluid/serum albumin quotient (Q-Alb) is not increased in Alzheimer's disease compared to neurological disease controls: a retrospective study on 276 patients.*

**Neurol Sci.** 2023 Feb;44(2):709-713. doi: 10.1007/s10072-022-06530-w.

Poletti B, Aiello EN, Solca F, Torre S, Carelli L, Ferrucci R, Verde F, Ticozzi N, Silani V.

*Diagnostic properties of the Italian ECAS Carer Interview (ECAS-CI).*

**Neurol Sci.** 2022 Nov 23. doi: 10.1007/s10072-022-06505-x.

Poletti B, Solca F, Maffi S, Torre S, Carelli L, Aiello EN, Ferrucci R, Priori A, Monti A, Verde F, Ticozzi N, Migliore S, Scaricamazza E, Casella M, Squitieri F, Ciambola A, Silani V.

*Semiology and determinants of apathy across neurodegenerative motor disorders: A comparison between amyotrophic lateral sclerosis, Parkinson's and Huntington's disease.*

**Front Aging Neurosci.** 2022 Nov 2;14:1031908. doi: 10.3389/fnagi.2022.1031908.

Aiello EN, Carelli L, Solca F, Torre S, Ferrucci R, Priori A, Verde F, Silani V, Ticozzi N, Poletti B. *Validity and diagnostics of the Reading the Mind in the Eyes Test (RMET) in non-demented amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients.*

**Front Psychol.** 2022 Nov 2;13:1031841. doi: 10.3389/fpsyg.2022.1031841.

Opie-Martin S, Iacoangeli A, Topp SD, Abel O, Mayl K, Mehta PR, Shatunov A, Fogh I, Bowles H, Limbachiya N, Spargo TP, Al-Khleifat A, Williams KL, Jockel-Balsarotti J, Bali T, Self W, Henden L, Nicholson GA, Ticozzi N, McKenna-Yasek D, Tang L, Shaw PJ, Chio A, Ludolph A, Weishaupt JH, Landers JE, Glass JD, Mora JS, Robberecht W, Damme PV, McLaughlin R, Hardiman O, van den Berg L, Veldink JH, Corcia P, Stevic Z, Siddique N, Silani V, Blair IP, Fan DS, Esselin F, de la Cruz E, Camu W, Basak NA, Siddique T, Miller T, Brown RH, Al-Chalabi A, Shaw CE.

*The SOD1-mediated ALS phenotype shows a decoupling between age of symptom onset and disease duration.*

**Nat Commun.** 2022 Nov 12;13(1):6901. doi: 10.1038/s41467-022-34620-y.

Zago S, Aiello EN, Poletti B, Lorusso L, Silani V.

*Has the association between ALS and FTD been actually acknowledged since the nineteenth century?*

**Neurol Sci.** 2022 Nov 3. doi: 10.1007/s10072-022-06468-z.

Keller Sarmiento IJ, Fraint A, Kinsley L, Akhtar RS, Silani V, Lubbe SJ, Krainc D, Mencacci NE. *Novel THAP1 missense variant with incomplete penetrance in a case of generalized young onset dystonia showing good response to deep brain stimulation.*

**Parkinsonism Relat Disord.** 2022 Dec;105:7-8. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.10.022.

Colombo E, Poletti B, Maranzano A, Peverelli S, Solca F, Colombrita C, Torre S, Tiloca C, Verde F, Bonetti R, Carelli L, Morelli C, Ratti A, Silani V, Ticozzi N,

*Motor, cognitive and behavioural profiles of C9orf72 expansion-related amyotrophic lateral sclerosis.*

**J Neurol.** 2022 Oct 29. doi: 10.1007/s00415-022-11433-z.

Aiello EN, Solca F, Torre S, Carelli L, Monti A, Ferrucci R, Verde F, Ticozzi N, Silani V, Poletti B. *Reliable change indices for the Italian Edinburgh Cognitive and Behavioral ALS Screen (ECAS).* **Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.** 2022 Oct 26:1-4. doi: 10.1080/21678421.2022.2134801. Online ahead of print. PMID: 36286187

Keller Sarmiento IJ, Afshari M, Kinsley L, Silani V, Akhtar RS, Simuni T, Lubbe SJ, Krainc D, Mencacci NE.

*Novel bi-allelic FBXO7 variants in a family with early-onset typical Parkinson's disease.* **Parkinsonism Relat Disord.** 2022 Nov;104:88-90. doi: 10.1016/j.parkreldis.2022.10.014.

Tiloca C, Goldwurm S, Calcagno N, Verde F, Peverelli S, Calini D, Zecchinelli AL, Sangalli D, Ratti A, Pezzoli G, Silani V, Ticozzi N.

*TARDBP mutations in a cohort of Italian patients with Parkinson's disease and atypical parkinsonisms.*

**Front Aging Neurosci.** 2022 Sep 29;14:1020948. doi: 10.3389/fnagi.2022.1020948.

Bossolasco P, Cimini S, Maderna E, Bardelli D, Canafoglia L, Cavallaro T, Ricci M, Silani V, Marucci G, Rossi G.

*GRN-/ iPSC-derived cortical neurons recapitulate the pathological findings of both frontotemporal lobar degeneration and neuronal ceroidlipofuscinosis.*

**Neurobiol Dis.** 2022 Dec;175:105891. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105891.

Aiello EN, Solca F, Torre S, Carelli L, Ferrucci R, Priori A, Verde F, Silani V, Ticozzi N, Poletti B. *Diagnostics and clinical usability of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) in amyotrophic lateral sclerosis.*

**Front Psychol.** 2022 Sep 23;13:1012632. doi: 10.3389/fpsyg.2022.1012632.

Aiello EN, Solca F, Torre S, Carelli L, Ferrucci R, Priori A, Verde F, Ticozzi N, Silani V, Poletti B. *Feasibility and diagnostics of the Frontal Assessment Battery (FAB) in amyotrophic lateral sclerosis.* **Neurol Sci.** 2023 Feb;44(2):587-592. doi: 10.1007/s10072-022-06438-5.

Aiello EN, Feroldi S, De Luca G, Guidotti L, Arrigoni E, Appollonio I, Solca F, Carelli L, Poletti B, Verde F, Silani V, Ticozzi N.

*Primary progressive aphasia and motor neuron disease: A review.*

**Front Aging Neurosci.** 2022 Sep 8;14:1003792. doi: 10.3389/fnagi.2022.1003792. Review.

Giacopuzzi Grigoli E, Cinnante C, Doneddu PE, Calcagno N, Lenti S, Ciampola A, Maderna L, Ticozzi N, Castellani M, Beretta S, Rovaris M, Silani V, Verde F.

*Progressive motor neuron syndromes with single CNS lesions and CSF oligoclonal bands: never forget solitary sclerosis!*

**Neurol Sci.** 2022 Dec;43(12):6951-6954. doi: 10.1007/s10072-022-06407-y.

Verde F, Aiello EN, Giacopuzzi Grigoli EG, Milone I, Dubini A, Ratti A, Poletti B, Ticozzi N, Silani V.

*CSF A $\beta$ 40 and P-tau181 might differentiate atypical from typical AD phenotypes: preliminary evidence.*

**Neurodegener Dis.** 2022 Sep 15. doi: 10.1159/000526888.

Kacem I, Sghaier I, Peverelli S, Souissi E, Ticozzi N, Gharbi A, Ratti A, Berrechid AG, Silani V, Gouider R.

*Genotype-phenotype correlation in Tunisian patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis.*

**Neurobiol Aging.** 2022 Dec;120:27-33. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2022.08.002.

Domanin M, Bennati L, Vergara C, Bissacco D, Malloggi C, Silani V, Parati G, Trimarchi S, Casana R.

Fluid structure interaction analysis to stratify the behavior of different atheromatous carotid plaques. **J Cardiovasc Surg** (Torino). 2022 Sep 14. doi: 10.23736/S0021-9509.22.12170-1.

Zago S, Lorusso L, Aiello EN, Ugolini M, Poletti B, Ticozzi N, Silani V.

*Cognitive and behavioral involvement in ALS has been known for more than a century.*

**Neurol Sci.** 2022 Dec;43(12):6741-6760. doi: 10.1007/s10072-022-06340-0. Review.

Pasquini J, Firbank MJ, Ceravolo R, Silani V, Pavese N.

*Diffusion Magnetic Resonance Imaging Microstructural Abnormalities in Multiple System Atrophy: A Comprehensive Review.*

**Mov Disord.** 2022 Oct;37(10):1963-1984. doi: 10.1002/mds.29195.

Manini A, Ratti A, Brusati A, Maranzano A, Fogh I, Peverelli S, Messina S, Gentilini D, Verde F, Poletti B, Morelli C, Silani V, Ticozzi N.

*TMEM106B Acts as a Modifier of Cognitive and Motor Functions in Amyotrophic Lateral Sclerosis.* **Int J Mol Sci.** 2022 Aug 17;23(16):9276. doi: 10.3390/ijms23169276.

Castelnovo V, Canu E, Magno MA, Gatti E, Riva N, Pain D, Mora G, Poletti B, Silani V, Filippi M, Agosta F.

*Pallidal functional connectivity changes are associated with disgust recognition in pure motor amyotrophic lateral sclerosis.*

**Neuroimage Clin.** 2022;35:103145. doi:10.1016/j.nicl.2022.103145.

Conca F, Esposito V, Rundo F, Quaranta D, Muscio C, Manenti R, Caruso G, Lucca U, Galbussera AA, Di Tella S, Baglio F, L'Abbate F, Canu E, Catania V, Filippi M, Mattavelli G, Poletti B, Silani V, Lodi R, De Matteis M, Stanzani Maserati M, Arighi A, Rotondo E, Tanzilli A, Pace A, Garramone F, Cavaliere C, Pardini M, Rizzetto C, Sorbi S, Perri R, Tiraboschi P, Canessa N, Cotelli M, Ferri R, Weintraub S, Marra C, Tagliavini F, Catricalà E, Cappa SF.

*Italian adaptation of the Uniform Data Set Neuropsychological Test Battery (I-UDSNB 1.0): development and normative data.*

**Alzheimers Res Ther.** 2022 Aug 19;14(1):113. doi: 10.1186/s13195-022-01056-x.

Verde F, Aiello EN, Milone I, Giacopuzzi Grigoli E, Dubini A, Ratti A, Poletti B, Ticozzi N, Silani V.

*A + T ± status across MCI and dementia due to AD: a clinic-based, retrospective study.*

**Neurol Sci.** 2022 Nov;43(11):6547-6550. doi: 10.1007/s10072-022-06346-8.

Spinelli EG, Ghirelli A, Riva N, Canu E, Castelnovo V, Domi T, Pozzi L, Carrera P, Silani V, Chiò A, Filippi M, Agosta F.

*Profiling morphologic MRI features of motor neuron disease caused by TARDBP mutations.*

**Front Neurol.** 2022 Jul 15;13:931006. doi: 10.3389/fneur.2022.931006.

Tagini S, Brugnera A, Ferrucci R, Priori A, Compare A, Parolin L, Pravettoni G, Silani V, Poletti B. *Behind the Scenes of COVID-19 Vaccine Hesitancy: Psychological Predictors in an Italian Community Sample.*

**Vaccines** (Basel). 2022 Jul 21;10(7):1158. doi: 10.3390/vaccines10071158.

Carelli L, Solca F, Tagini S, Torre S, Verde F, Ticozzi N, Ferrucci R, Pravettoni G, Aiello EN, Silani V, Poletti B.

*Gaze-Contingent Eye-Tracking Training in Brain Disorders: A Systematic Review.*

**Brain Sci.** 2022 Jul 16;12(7):931. doi:10.3390/brainsci12070931.Review.

Pasquini J, Trogu F, Morelli C, Poletti B, Girotti F, Peverelli S, Brusati A, Ratti A, Ciommola A, Silani V, Ticozzi N.

*Parkinsonian Syndromes in Motor Neuron Disease: A Clinical Study.*

**Front Aging Neurosci.** 2022 Jun 27;14:917706. doi: 10.3389/fnagi.2022.917706.

Kacem I, Sghaier I, Ticozzi N, Mrabet S, Paverelli S, Nasri A, Ratti A, Ben Djebara M, Gargouri-Berrachid A, Silani V, Gouider R.

*Expanding the phenotype of TARDBP mutation in a Tunisian family with clinical phenotype heterogeneity.*

**Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.** 2022 Nov;23(7-8):623-626. doi: 10.1080/21678421.2022.2089856.

Verde F, Milone I, Bulgarelli I, Peverelli S, Colombrita C, Maranzano A, Calcagno N, Ticozzi N, Perego GB, Parati G, Torresani E, Ratti A, Silani V.

*Serum neurofilament light chain levels in Covid-19 patients without major neurological manifestations.*

**J Neurol.** 2022 Nov;269(11):5691-5701. doi: 10.1007/s00415-022-11233-5.

Canu E, Calderaro D, Castelnovo V, Basaia S, Magno MA, Riva N, Magnani G, Caso F, Caroppo P, Prioni S, Villa C, Pain D, Mora G, Tremolizzo L, Appollonio I, Poletti B, Silani V, Filippi M, Agosta F.

*Resting state functional brain networks associated with emotion processing in frontotemporal lobar degeneration.*

**Mol Psychiatry.** 2022 Nov;27(11):4809-4821. doi: 10.1038/s41380-022-01612-9.

Ferrucci R, Dini M, Rosci C, Capozza A, Groppo E, Reitano MR, Allocchio E, Poletti B, Brugnera A, Bai F, Monti A, Ticozzi N, Silani V, Centanni S, D'Arminio Monforte A, Tagliabue L, Priori A. One-year cognitive follow-up of COVID-19 hospitalized patients.

**Eur J Neurol.** 2022 Jul;29(7):2006-2014. doi: 10.1111/ene.15324. Epub 2022 Mar 29.

Hop PJ, Zwamborn RAJ, Hannon E, Shireby GL, Nabais MF, Walker EM, van Rheenen W, van Vugt JJFA, Dekker AM, Westeneng HJ, Tazelaar GHP, van Eijk KR, Moisse M, Baird D, Al Khleifat A, Iacoangeli A, Ticozzi N, Ratti A, Cooper-Knock J, Morrison KE, Shaw PJ, Basak AN, Chiò A, Calvo A, Moglia C, Canosa A, Brunetti M, Grassano M, Gotkine M, Lerner Y, Zabari M, Vourc'h P, Corcia P, Couratier P, Mora Pardina JS, Salas T, Dion P, Ross JP, Henderson RD, Mathers S, McCombe PA, Needham M, Nicholson G, Rowe DB, Pamphlett R, Mather KA, Sachdev PS, Furlong S, Garton FC, Henders AK, Lin T, Ngo ST, Steyn FJ, Wallace L, Williams KL; BIOS Consortium; Brain MEND Consortium; Neto MM, Cauchi RJ, Blair IP, Kiernan MC, Drory V, Povedano M, de Carvalho M, Pinto S, Weber M, Rouleau GA, Silani V, Landers JE, Shaw CE, Andersen PM, McRae AF, van Es MA, Pasterkamp RJ, Wray NR, McLaughlin RL, Hardiman O, Kenna KP, Tsai E, Runz H, Al-Chalabi A, van den Berg LH, Van Damme P, Mill J, Veldink JH.

*Genome-wide study of DNA methylation shows alterations in metabolic, inflammatory, and cholesterol pathways in ALS.*

**Sci Transl Med.** 2022 Feb 23;14(633):eabj0264. doi: 10.1126/scitranslmed.abj0264.

Al Khleifat A, Iacoangeli A, van Vugt JJFA, Bowles H, Moisse M, Zwamborn RAJ, van der Spek RAA, Shatunov A, Cooper-Knock J, Topp S, Byrne R, Gellera C, López V, Jones AR, Opie-Martin S, Vural A, Campos Y, van Rheenen W, Kenna B, Van Eijk KR, Kenna K, Weber M, Smith B, Fogh I, Silani V, Morrison KE, Dobson R, van Es MA, McLaughlin RL, Vourc'h P, Chio A, Corcia P, de Carvalho M, Gotkine M, Panades MP, Mora JS, Shaw PJ, Landers JE, Glass JD, Shaw CE, Basak N, Hardiman O, Robberecht W, Van Damme P, van den Berg LH, Veldink JH, Al-Chalabi A.

*Structural variation analysis of 6,500 whole genome sequences in amyotrophic lateral sclerosis.*

**NPJ Genom Med.** 2022 Jan 28;7(1):8. doi: 10.1038/s41525-021-00267-9.

Maranzano A, Poletti B, Solca F, Torre S, Colombo E, Faré M, Ferrucci R, Carelli L, Verde F, Morelli C, Silani V, Ticozzi N.

*Upper motor neuron dysfunction is associated with the presence of behavioural impairment in patients with amyotrophic lateral sclerosis.*

**Eur J Neurol.** 2022 May;29(5):1402-1409. doi: 10.1111/ene.15243.

Bocci T, Campiglio L, Silani V, Berardelli A, Priori A.

*A nationwide survey on clinical neurophysiology education in Italian schools of specialization in neurology.*

**Neurol Sci.** 2022 May;43(5):3407-3413. doi: 10.1007/s10072-021-05641-0.

Halbggbauer S, Steinacker P, Verde F, Weishaupt J, Oeckl P, von Arnim C, Dorst J, Feneberg E, Mayer B, Rosenbohm A, Silani V, Ludolph AC, Otto M.

*Comparison of CSF and serum neurofilament light and heavy chain as differential diagnostic biomarkers for ALS.*

**J Neurol Neurosurg Psychiatry.** 2022 Jan;93(1):68-74. doi: 10.1136/jnnp-2021-327129.

Greco LC, Lizio A, Casiraghi J, Sansone VA, Tremolizzo L, Riva N, Solca F, Torre S, Ticozzi N, Filippi M, Silani V, Poletti B, Lunetta C.

*A preliminary comparison between ECAS and ALS-CBS in classifying cognitive-behavioural phenotypes in a cohort of non-demented amyotrophic lateral sclerosis patients.*

**J Neurol.** 2022 Apr;269(4):1899-1904. doi: 10.1007/s00415-021-10753-w.

Ratti A, Peverelli S, D'Adda E, Colombrita C, Gennuso M, Prelle A, Silani V,  
*Genetic and epigenetic disease modifiers in an Italian C9orf72 family expressing ALS, FTD or PD clinical phenotypes.*

**Amyotroph Lateral Scler Frontotemporal Degener.** 2022 May;23(3-4):292-298. doi: 10.1080/21678421.2021.1962355.

**Totale I.F. 291.257**

## INIZIATIVE DIDATTICHE ISTITUZIONALI

### Charcotiadi: i giovedì dell'aggiornamento

- Clinico
- Laboratorio di Neuroscienze
- Clinico/Laboratorio
- Lezioni magistrali di diversi ospiti

### I mercoledì dell'aggiornamento del Laboratorio di Neuroscienze

- Discussione dei dati di laboratorio relativi ai differenti gruppi di ricerca

### I mercoledì del gruppo di lavoro SLA/FTD

- Aggiornamenti sulle Linee Guida
- Novità cliniche e terapeutiche
- Sperimentazioni nazionali ed internazionali

### Partecipazione Editorial Board Internazionali

- Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Neuron Disorders
- European Neurology
- American Journal of Neurodegenerative Diseases
- Annals of Transplantation Research

- Exploration of Neuroprotective Therapy

## Fondi Acquisiti nel corso del 2022

GRANT ATTIVI NEL 2022			
Tipo bando e finanziamento	Ente Finanziatore	Titolo	Finanziamento quota IAI (Atteso)
RF	Ministero Salute	Cross-disease analysis of molecular and cellular mechanisms in KIF5A-associated neurodegenerative disorders	€ 150.150,00
Era-Net CVD 2	Ministero Salute	Genomic Instability of Expanded Repeats in HD and ALS/FTD	€ 210.000,00
RF	Ministero Salute	Dysfunction of RNA processing and autophagy in human ALS disease cell models: a bioassay for new therapeutic strategies	€ 260.000,00
RF	Ministero Salute	Peripheral Nervous System involvement in Amyotrophic Lateral Sclerosis: from diagnosis to disease understanding.	€ 175.000,00
RF	Ministero Salute	Targeting synapse dysfunction in Parkinson's disease	€ 30.000,00
Call for Applications for ALS research projects	AriSla	Autozygosity mapping followed by next generation sequencing in unrelated consanguineous individuals to identify novel ALS-associated genes	€ 178.500,00
<b>TOTALE</b>			<b>€ 1.003.650,00</b>

GRANT VINTI NEL 2022			
Tipo bando e finanziamento	Ente Finanziatore	Titolo	Finanziamento quota IAI (Atteso)
RF	Ministero Salute	Biomarker-driven phenotypic dissection of amyotrophic lateral sclerosis	€ 177.000,00
PNRR-M6C2	Ministero Salute	Towards a personalized medicine in amyotrophic lateral sclerosis by a patient-tailored genetic/biomarker/IPSC combined approach	€ 177.000,00
RF Giovani ricercatori	Ministero Salute	Autoimmune Dementia: predictors of neuronal synaptic antibodies in patients with new-ONset cognitive Impairment and their relevance in non-encephalitic forms. The ADONIS Study	€ 154.000,00
<b>TOTALE</b>			<b>€ 508.000,00</b>
<b>TOTALE</b>			<b>€ 1.511.650,00</b>

TRIALS ATTIVI NEL 2022		
Ente Finanziatore	Titolo	Valorizzazione in caso di arruolamento completo
Eli Lilly and Company	Trattamento preventivo dell'emicrania: risultati su pazienti nei sistemi sanitari del mondo reale (TRIUMPH)	€ 27.555,00
Institut Dr. Schauerte (IDS)	Studio osservazionale Pan-Europeo sull'efficacia di fremanezumab nei pazienti con emicrania cronica o episodica nel mondo-reale: studio PEARL	€ 21.240,00
AB Science S.A.	Studio prospettico, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo, a gruppi paralleli, di fase III, per confrontare l'efficacia e la sicurezza di masitinib in combinazione con riluzolo versus placebo in combinazione con riluzolo nel trattamento di pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)	€ 21.100,00
Cytokinetics Inc.	Studio Clinico Multicentrico di Fase 3, in Doppio Cieco, Randomizzato, Controllato verso Placebo per Valutare l'Efficacia e la Sicurezza di Reldesentiv in Pazienti Affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)	€ 25.930,00
Mitsubishi Tanabe Pharma Development America, Inc	Studio di Fase 3b, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco per valutare l'efficacia e la sicurezza di edaravone orale somministrato per un periodo di 48 settimane a soggetti con sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	€ 25.930,00
Julius Clinical Research B.V.	Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo, per valutare la sicurezza e l'efficacia di FAB122 in pazienti affetti da Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)	€ 102.877,20
Julius Clinical Research B.V.	Studio di fase III, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, volto a valutare la sicurezza e l'efficacia di AMX0035 rispetto al placebo per il trattamento di 48 settimane di pazienti adulti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	€ 75.600,00
ICON Clinical Research Limited	Studio di estensione di fase IIIb, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco per valutare il mantenimento dell'efficacia e della sicurezza di edaravone orale somministrato per un periodo aggiuntivo fino a 48 settimane dopo lo studio MT-1186-A02 a soggetti con sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	€ 45.120,00
Mitsubishi Tanabe Pharma Development America, Inc	Studio di estensione di fase IIIb, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco per valutare il mantenimento dell'efficacia e della sicurezza di edaravone orale somministrato per un periodo aggiuntivo fino a 48 settimane dopo lo studio MT-1186-A02 a soggetti con sclerosi laterale amiotrofica (SLA)	€ 55.546,20
<b>TOTALE</b>		<b>€ 400.898,40</b>

**LABORATORIO DI BIOLOGIA MOLECOLARE, CITOGENETICA,  
ANALISI BIOCHIMICO-CLINICHE, BIOINFORMATICA- IRCCS E.  
MEDEA- SEDE DISTACCATA DEL CENTRO “DINO FERRARI”**

**RESPONSABILE:**

Dott. M.T. Bassi

**PERSONALE STRUTTURATO:**

**BIOLOGI:**

Dott. Sara Bertuzzo

Dott. Maria Clara Bonaglia

Dott. Rachele Cagliani- Biologo

Dott. Andrea Daga

Dott Roberto Giorda

Dott Alessandra Mozzi

Dott. Manuela Sironi

Dott. Chiara Vantaggiato

**BIOINGEGNERE:**

Ing Uberto Pozzoli

**BIOTECNOLOGI:**

Dott. Andrea Citterio

Dott. Diego Forni

Dott. Marco Pozzi

Dott. Elena Panzeri

**PERSONALE LAUREATO BORSISTA-CONTRATTISTA: BIOTECNOLOGI**

Dott. Luca Fumagalli

Dott. Fabiana Mambretti

Dott. Francesca Brivio

**PERSONALE TECNICO STRUTTURATO**

Cinzia Baschirotto

Luca Cesana

Paola Pozzi

Sandra Belluschi

L'attività di ricerca relativa all'anno 2022, del laboratorio di Genetica molecolare, Citogenetica e Bioinformatica, sezione distaccata del Centro Dino Ferrari, si è articolata su diversi filoni di ricerca già in corso. In particolare nell'ambito della Genetica molecolare è proseguita l'attività di screening genetico per l'identificazione del difetto molecolare di diversi gruppi di pazienti, nel contesto di progetti ministeriali ed extra ministeriali in corso.

In particolare sono state analizzate 10 famiglie con quadri neuromuscolari e neurodegenerativi complessi; tra queste di particolare interesse sono le mutazioni identificate in una famiglia con 2 sorelle affette con un quadro clinico di atassia del tronco, declino cognitivo e cataratta congenita. Alla risonanza entrambe mostrano segni di ipomielinizzazione della sostanza bianca, e accumuli di ferro. In entrambe segregano due varianti in eterozigosi composta nel gene *PEX11B*, una variante frameshift che porta a interruzione prematura della proteina ed una microdelezione di circa 2.8 Mb sull'altro allele che comprende parte del gene *PEX11B*. Il gene *PEX11B* è associato al disordine della biogenesi dei perossisomi di tipo 14B (PBD14B) ad ereditarietà autosomico recessiva, caratterizzato da disabilità intellettiva, cataratta congenita, progressiva perdita dell'udito, polineuropatia. In un'altra famiglia con una figlia affetta da distrofia muscolare congenita ed epilessia sono state identificate due delezioni intrageniche in eterozigosi composta nel gene *LAMA2*, gene mutato in una forma recessiva congenita di distrofia muscolare con deficit parziale o totale di merosina tipo 1A e nella forma recessiva di distrofia muscolare dei cingoli, tipo 23.

Parallelamente, si è proseguita la caratterizzazione delle basi molecolari del sottotipo di paraparesi spastica pura e complicata (SPG76). L'attività svolta si è concentrata sulla caratterizzazione molecolare e cellulare di una mutazione identificata nel gene *CAPN1* (Calpaina 1) associato ad una forma di paraparesi spastica, SPG76. Il lavoro condotto in vitro su modelli cellulari indicano che l'assenza di calpaina1 in SPG76, insieme all'aumento dei livelli di calpaina 2, riduce l'attivazione del pathway di sopravvivenza Akt, riduce l'inibizione del fattore pro-apoptotico GSK3β e induce un'eccessiva attivazione della risposta UPR, portando all'attivazione di CHOP e delle caspasi. Il lavoro è poi proseguito con l'obiettivo di identificare composti che possano portare al rescue dell'apoptosi in cellule SPG76 modulando il signalling Akt/GSK3β usando specifici inibitori. Abbiamo quindi testato nelle cellule SPG76 alcune sostanze che permettono di attivare il pathway Akt/GSK3β, allo scopo di ottenere il rescue del fenotipo patologico. In particolare abbiamo testato inibitori di calpaina2 (ALLN, MDL28170, Olesoxime), inibitori di GSK3β (SB216763, Tideglusib, litio cloruro, sodio valproato, TDZD8), inibitori di PTEN (SF1670, bpV(pic) e bpV(HOpic) e naringenin, un flavonoide naturale con azione neuroprotettiva e antiapoptotica. Abbiamo analizzato l'effetto di ogni composto sui livelli di attivazione di Akt e GSK3β, sui livelli di espressione dei geni della risposta UPR (ATF4, IRE1, GRP78, GRP94, XBP1 e CHOP) in condizioni basali e in condizioni di stress (indotto con EBSS). Abbiamo dimostrato che gli inibitori di calpaina 2, ALLN, MDL28170, Olesoxime, e gli inibitori di PTEN, bpV(pic) e bpV(HOpic), aumentano i livelli di attivazione di Akt riducendo l'attivazione del fattore pro-apoptotico GSK3β. Inoltre riducono i livelli di espressione dei geni della risposta UPR e l'induzione dell'apoptosi. Queste sostanze infatti riducono i livelli di attivazione delle caspasi e la morte cellulare indotta in cellule SPG76 in seguito a trattamento con EBSS.

Nell'ambito del laboratorio di Citogenetica, l'attività di ricerca è volta alla traslazione routinaria della diagnostica citogenetica molecolare postnatale in ricerca attiva per capire perché e quando si origina qualsiasi variante genomica e tutte le possibili conseguenze in relazione ai geni coinvolti all'interno o fiancheggianti la regione riarrangiata. Nell'ambito biomedico sono stati sviluppati numerosi studi tesi a definire regioni critiche associate a riarrangiamenti cromosomici nei disordini del neurosviluppo e anomalie multiple congenite.

I principali ambiti di studio riguardano a) la Sindrome di Phelan McDermid; b) correlazioni genotipo-fenotipo in condizioni sindromiche caratterizzate da disabilità intellettiva, ASD,epilessia e malformazioni cerebrali; c) identificazione delle cause molecolari dei riarrangiamenti genomici attraverso analisi di citogenetica classica (FISH, array-CGH) e sequenziamento dell'intero genoma di seconda e terza generazione (short-reads e long-reads genome sequencing, rispettivamente) in

pazienti con disordini del neurosviluppo afferenti all'Istituto e inviati da numerose altre strutture italiane ed estere

Per quanto riguarda la sezione di bioinformatica nel corso del 2022, abbiamo ampliato ed approfondito l'utilizzo di strumenti di evoluzione molecolare per studiare la diversità e l'adattamento alla nostra specie di virus estremamente diffusi come gli herpes o di virus zoonotici, come i poxvirus. Ci siamo in particolare concentrati sull'uso di metodiche di evoluzione molecolare per studiare la storia evolutiva e la diversità genetica di HSV1/HSV-2, MPXV/hMPXV1 (monkeypox virus e human monkeypox virus 1), VARV (Variola virus) e VACV (vaccinia virus).

Abbiamo inoltre perfezionato e sviluppato approcci che consentono di analizzare l'evoluzione, la distribuzione geografica e l'origine di patogeni umani di grande rilevanza dal punto di vista della salute pubblica. L'obiettivo è comprendere i dettagli molecolari delle interazioni ospite-patogeno al fine di fornire informazioni utili per comprendere i determinanti molecolari di virulenza e per la produzione di vaccini o per lo sviluppo di composti ad azione antimicrobica. Chiaramente, molte di queste analisi sono rese possibili dalla crescente disponibilità di dati di sequenza presenti nei database pubblici. In particolare, la pandemia di COVID-19 ha dato il via ad uno sforzo internazionale senza precedenti e, durante il 2021, sono stati sequenziati numerosissimi genomi di SARS-CoV-2. La stessa cosa è avvenuta, anche se in maniera più limitata, con l'epidemia di hMPXV1. Questo rende estremamente utili approcci che, come quelli da noi applicati, possano estrarre informazioni da dati genomici ed interpretarli. Inoltre, analisi simili a quelle qui descritte sono ora in corso per lo studio di altri patogeni umani. Tra questi ultimi, ad esempio, stiamo studiando l'adattamento alla nostra specie di EBV e la possibile interazione tra varianti virali e suscettibilità a sclerosi multipla.

Per quanto riguarda il resto dell'attività del gruppo abbiamo messo a punto durante il 2020 due metodi per l'analisi di esperimenti di ChIP-seq e Exome-seq. In particolare il primo è in grado di identificare modelli computazionali delle preferenze di binding di Fattori di trascrizione o altre proteine che legano acidi nucleici. Il secondo è invece in grado di identificare gruppi di geni funzionalmente associati che presentano un arricchimento di varianti non sinonime. Il primo metodo può essere impiegato sia nella identificazione di varianti regolatorie che nella comprensione dei meccanismi regolatori di geni di interesse (in particolare per quanto riguarda la regolazione della trascrizione e delle splicing). Il secondo consente di identificare funzioni o fenotipi molecolari associati a gruppi di pazienti.

#### **Elenco dei progetti sviluppati nel corso del 2022 presso il laboratorio di biologia molecolare citogenetica e bioinformatica:**

- Genetica delle Malattie neurologiche rare: modelli cellulari e meccanismi patogenetici- R corrente
- Un approccio omico per la caratterizzazione delle conseguenze funzionali e fenotipiche delle varianti genomiche strutturali rare nella disabilità del neurosviluppo e anomalie congenite- R corrente
- Studio evolutivo di conflitti genetici di interesse biomedico- R corrente
- Sottoprogetto - Analisi del significato funzionale dei siti selezionati positivamente nel genoma di HCMV- R corrente
- Il ruolo della diversità genetica in EBV nella suscettibilità alla Sclerosi Multipla- prog 5X mille
- Multimodalità, intelligenza artificiale e big data: rianalisi, razionalizzazione e integrazione di basi dati raccolte in studi esistenti- prog 5X Mille

- Citogenetica di nuova generazione”: impatto delle tecnologie di sequenziamento cromosomico di terza generazione nella diagnosi genetica dei disordini del neurosviluppo con o senza malformazioni congenite” OPTICAL GENOME MAPPING- prog 5X Mille
- An integrated omics approach for patients with rare neurological disorders: towards personalized clinical care and trial readiness- CARE4NEURORARE (Bando Fondazione Regionale Lombarda per la ricerca biomedica).
- Caratterizzazione delle sequenze codificanti di SARS-CoV-2 e valutazione del loro ruolo nella patogenesi di COVID-19-(Bando Regione Lombardia- DG Welfare).
- Functional and clinical studies of lipid linked hereditary spastic paraplegia- RF-2019-12370112

## **COLLABORAZIONI NAZIONALI**

Prof Luca De Gioia - Department of Biotechnology and Biosciences, University of Milan-Bicocca, 20126 Milan, Italy.

Prof. Mario Clerici -Department of Physiopathology and Transplantation, University of Milan, 20090 Milan, Italy. and Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, 20148 Milan, Italy.

Prof Giuseppe Bianchi - Nephrology and Dialysis Unit, San Raffaele Scientific Institute, University Vita Salute San Raffaele, Milan, Ita

Dott. Franca Guerini - Don C. Gnocchi Foundation ONLUS, IRCCS, 20100 Milan, Italy

Dott. Mara Biasin - Department of Biomedical and Clinical Sciences, University of Milan, 20157 Milan, Italy

Prof. Roberto de Franchis - IBD Unit, Chair of Gastroenterology, Luigi Sacco University Hospital, 20157 Milan

Dott. Sergio Lo Caputo - S. Maria Annunziata Hospital, 50122 Florence, Italy

Dott. Rosanna Asselta - Dipartimento di Biotecnologie Mediche e Medicina Traslazionale, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy.

Dott. Matteo Cereda - Department of Experimental Oncology, European Institute of Oncology (IEO), 20139 Milan, Italy

## **COLLABORAZIONI INTERNAZIONALI**

Dott. FM Santorelli- Fondazione Stella Maris, Pisa University of Cologne Joseph-Stelzmann-Str. 26 50931 Köln Germany

Edward J Hollox - Department of Genetics, University of Leicester, Leicester LE2 1TE, UK

Nasser M. Al-Daghri - Biomarker research program, Biochemistry Department, College of Science, King Saud University, Riyadh 11451, Kingdom of Saudi Arabia (KSA) and Prince Mutaib Chair for Biomarkers of Osteoporosis, Biochemistry Department, College of science, King Saud University, Riyadh, KSA

Dott. Juan Antonio Pineda - Infectious Diseases and Microbiology Clinical Unit. Valme Hospital, Seville, Spain

Dott. Antonio Rivero-Juarez - Maimonides Institut for Biomedical Research (IMIBIC)-Reina Sofia University Hospital-University of Cordoba, Spain

Dott. Antonio Caruz - Immunogenetics Unit, Department of Experimental Biology, University of Jaen, Jaen, Spain

Dott. Manuel Comabella - Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH). Barcelona, Spain

Dott. Matteo Fumagalli - UCL Genetics Institute, Department of Genetics, Evolution and Environment, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, United Kingdom

Abati Elena\*, Manini Arianna\*, Velardo Daniele, Del Bo Roberto, Napoli Barbara, Rizzo Federica, Moggio Maurizio, Bresolin Nereo, Bellone Emilia, Bassi Maria Teresa, D'Angelo Maria Grazia, Comi Giacomo Pietro, Corti Stefania (2022);

*Clinical and Genetic Features of a cohort of patients with mfn2-Related Neuropathy;*

**Scientific Reports**, 12(1):6181

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.1038/s41598-022-10220-0 PMID: 35418194 I.F.4,997

Battini Vera\*, Mari Alessandra\*, Gringeri Michele, Casini Francesca, Bergamaschi Francesco, Mosini Giulia, Guarnieri Greta, Pozzi Marco, Nobile Maria, Zuccotti Gian Vincenzo, Clementi Emilio, Radice Sonia, Fabiano Valentina, Carnovale Carla (2022);

*Antibiotic-Induced Neutropenia in Pediatric Patients: New Insights from Pharmacoepidemiological Analyses and A Systematic Review;*

**Frontiers in Pharmacology**, 13:877932

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.3389/fphar.2022.877932 PMID: 35721197 I.F. 5,988

Bonaglia Maria Clara, Fichera Marco, Marelli Susan, Romaniello Romina, Zuffardi Orsetta (2022); *Low-Level Complex Mosaic with Multiple Cell Lines Affecting The 18q21.31q21.32 Region in a Patient With De Novo 18q Terminal Deletion;*

**European Journal of Medical Genetics**, 65(11):104596

DOI: 10.1016/j.ejmg.2022.104596 PMID: 36064004 I.F. 2,465

Carnovale Carla\*, Perrotta Cristiana\*, Baldelli Sara, Cattaneo Dario, Montrasio Cristina, Barbieri Silvia S., Pompilio Giulio, Vantaggiato Chiara, Clementi Emilio^, Pozzi Marco^ (2022); *Antihypertensive drugs and Brain Function: Mechanisms Underlying Therapeutically Beneficial And Harmful Neuropsychiatric Effects;*

**Cardiovascular Research, Invited Review in press**

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

^ Co-last authors

DOI: 10.1093/cvr/cvac110 PMID: 35895876 I.F. 14,239

Della Vecchia Stefania, Tessa Alessandra§, Dosi Claudia, Baldacci Jacopo, Pasquariello Rosa, Antenora Antonella, Astrea Guja, Bassi Maria Teresa, Battini Roberta, Casali Carlo, Cioffi Ettore, Conti Greta, De Michele Giovanna, Ferrari Anna Rita, Filli Alessandro, Fiorillo Chiara, Fusco Carlo, Gallone Salvatore, Germiniasi Chiara, Guerrini Renzo, Haggiag Shalom, Lopergolo Diego, Martinuzzi Andrea, Melani Federico, Mignarri Andrea, Panzeri Elena, Pini Antonella, Pinto Anna Maria, Pochiero Francesca, Primiano Guido, Procopio Elena, Renieri Alessandra, Romaniello Romina, Sancricca Cristina, Servidei Serena, Spagnoli Carlotta, Ticci Chiara, Rubegni Anna, Santorelli Filippo Maria§ (2022);

Monoallelic Kif1a-Related Disorders:

A Multicenter Cross Sectional Study And Systematic Literature Review;

**Journal of Neurology**, 269(1):437-450

§ Co-corresponding authors

DOI: 10.1007/s00415-021-10792-3 PMID: 34487232 I.F. 6,682

Epifanio Roberta\*, Giorda Roberto, Merlano Maria Carolina, Zanotta Nicoletta, Romaniello Romina, Marelli Susan, Russo Silvia, Cogliati Francesca, Bassi Maria Teresa\*, Zucca Claudio\* (2022); *Scn2a Pathogenic variants and Epilepsy: Heterogeneous Clinical, Genetic and Diagnostic Features*; **Brain Sciences**, 12(1):18 –

Case Report \* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.3390/brainsci12010018 PMID: 35053762 I.F. 3,333

Forni Diego, Cagliani Rachele, Clerici Mario, Sironi Manuela (2022);

*Disease-Causing Human Viruses: Novelty and Legacy*;

**Trends in Microbiology**, 30(12):1232-1242 - Review

DOI: 10.1016/j.tim.2022.07.002 PMID: 35902319 I.F. 18,230

Forni Diego, Cagliani Rachele, Molteni Cristian, Arrigoni Federica, Mozzi Alessandra, Clerici Mario, De Gioia Luca, Sironi Manuela (2022);

Homology-Based Classification of Accessory Proteins in Coronavirus Genomes Uncovers Extremely Dynamic Evolution of Gene Content;

**Molecular Ecology**, 31(13):3672-3692

DOI: 10.1111/mec.16531 PMID: 35575901 I.F. 2021: 6,622

Forni Diego, Cagliani Rachele, Molteni Cristian, Clerici Mario, Sironi Manuela (2022);

*Monkeypox virus: the changing Facets of a Zoonotic Pathogen*;

**Infection, Genetics and Evolution**, 105:105372

DOI: 10.1016/j.meegid.2022.105372 PMID: 36202208 I.F. 2021: 4,393

Forni Diego, Cagliani Rachele, Pontremoli Chiara, Clerici Mario, Sironi Manuela (2022);

*The Substitution Spectra of Coronavirus Genomes*;

**Briefings in Bioinformatics**, 23(1):1-12

DOI: 10.1093/bib/bbab382 PMID: 34518866 I.F. 13,994

Forni Diego, Cagliani Rachele, Pozzoli Uberto, Mozzi Alessandra, Arrigoni Federica, De Gioia Luca, Clerici Mario, Sironi Manuela (2022);

Dating the Emergence of Human Endemic Coronaviruses;

**Viruses**, 14(5):1095

DOI: 10.3390/v14051095 PMID: 35632836 I.F. 5,818

Forni Diego\*, Molteni Cristian\*, Cagliani Rachele, Sironi Manuela (2022);

*Geographic Structuring and Divergence Time Frame of Monkeypox Virus in the Endemic Region*;

**Journal of Infectious Diseases**, in press

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.1093/infdis/jiac298 PMID: 35831941 I.F. 7,759

Forni Diego, Sironi Alessandra, Cagliani Rachele (2022);

*Evolutionary History of Type II Transmembrane Serine Proteases Involved in Viral Priming*;

**Human Genetics**, 141(11):1705-1722

DOI: 10.1007/s00439-022-02435-y PMID: 35122525 I.F. 5,881

Irzan Hassna, Pozzi Marco, Chikhladze Nino, Cebanu Serghei, Tadevosyan Artashes, Calcii Cornelius, Tsiskaridze Alexander, Melbourne Andrew, Strazzer Sandra, Modat Marc, Molteni Erika (2022);

*Emerging Treatments for Disorders of Consciousness in Paediatric Age*;

**Brain Sciences**, 12(2):198 - Commentary

DOI: 10.3390/brainsci12020198 PMID: 35203961 I.F. 3,333

Kuhn Jens H., Adkins Scott, Alkhovsky Sergey V., Avsic-Zupanc Tatjana, Aylzon Maria A., Bahl Justin, Balkema-Buschmann Anne, Ballinger Matthew J., Bandte Martina, Beer Martin, ..., Sharpe Stephen R., Shi Mang, Sironi Manuela, Smither Sophie, Song Jin-Won, ..., Ye Gongyin, Zhang Yong-Zhen, Okland Arnfinn Lodden (2022); 2022

*Taxonomic update of Phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), Including the Large Orders Bunyavirales and Mononegavirales;*

**Archives of Virology**, 167(12):2857-2906

DOI: 10.1007/s00705-022-05546-z PMID: 36437428 I.F. 2,685

Mascheroni Eleonora, Schiavolin Paola, Mariani Wigley Isabella Lucia Chiara, Giorda Roberto, Pozzoli Uberto, Morandi Francesco, Fontana Camilla, Mosca Fabio, Fumagalli Monica, Montirocco Rosario (2022);

*Serotonin Transporter Gene Methylation and Emotional Regulation in Preschool Children Born Preterm: A Longitudinal Evaluation of The Role of Negative Emotionality in Infancy;*

**Infant Mental Health Journal**, 43(4):589-596 – Brief Report

DOI: 10.1002/imhj.21990 PMID: 35619334 I.F. 2,150

Minghetti Sara, Giorda Roberto, Mastrangelo Massimo, Tassi Laura, Zanotta Nicoletta, Galbiati Sara, Bassi Maria Teresa^, Zucca Claudio^ (2022);

*Epilepsia Partialis Continua Associated with the P.Arg403cys Variant of The Dnm1l Gene: An Unusual Clinical Progression with Two Episodes of Super-Refractory Status Epilepticus with A 13-Year Remission Interval;*

**Epileptic Disorders**, 24(1):176-182 - Clinical Commentary

^ Co-senior authors

DOI: 10.1684/epd.2021.1375 PMID: 34787083 I.F. 2,333

Molteni Cristian, Forni Diego, Cagliani Rachele, Clerici Mario, Sironi Manuela (2022);

*Genetic Ancestry and Population Structure of Vaccinia Virus;*

**Vaccines**, 7(1):92

DOI: 10.1038/s41541-022-00519-4 PMID: 35953491 I.F. 4,961

Mozzi Alessandra\*, Cagliani Rachele\*, Pontremoli Chiara, Forni Diego, Saulle Irma, Saresella Marina, Pozzoli Uberto, Cappelletti Gioia, Vantaggiato Chiara, Clerici Mario, Biasin Mara, Sironi Manuela (2022);

*Simplexviruses Successfully Adapt to Their Host by Fine-Tuning Immune Responses;*

**Molecular Biology and Evolution**, 39(7): msac142

DOI: 10.1093/molbev/msac142/6613336 PMID: 35731846 I.F. 8,800

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

Nazzari Sarah, Reali Pierluigi, Ceppi Elisa, Giorda Roberto, Piazza Caterina, Bianchi Anna Maria, Reni Gianluigi, Frigerio Alessandra (2022);

*Respiratory Sinus Arrhythmia (Rsa) Stress Response in Preschool Age Varies by Serotonin Transporter Polymorphism (5-HT1pr): A Preliminary Report;*

**Journal of Experimental Child Psychology**, 219:105413 – Brief Report

DOI: 10.1016/j.jecp.2022.105413 PMID: 35303525 I.F. 2,547

Nuovo Sara, Micalizzi Alessia, Romaniello Romina, Arrigoni Filippo Silvio Aldo, Ginevrino Monia, Casella Antonella, Serpieri Valentina, D'Arrigo Stefano, Briguglio Marilena, Salerno Grazia Gabriella, Rossato Sara, Sartori Stefano, Leuzzi Vincenzo, Battini Roberta, Ben-Zeev Bruria, Graziano Claudio, Mirabelli-Badenier Marisol, Brankovic Vesna, Nardocci Nardo, Spiegel Ronen, Petkovic Ramadza Danijela, Vento Giovanni, Marti Itxaso, Simonati Alessandro, Dipresa Savina, Freri Elena, Mazza Tommaso, Bassi Maria Teresa, Bosco Luca, Travaglini Lorena, Zanni Ginevra, Bertini Enrico, Vanacore Nicola, Borgatti Renato, Valente Enza Maria (2022);

*Refining the Mutational Spectrum and Gene-Phenotype Correlates in Pontocerebellar Hypoplasia: Results of a Multicentric Study;*

**Journal of Medical Genetics**, 59(4):399-409

DOI: 10.1136/jmedgenet-2020-107497 PMID: 34085948 I.F. 5,954

Pelleri Maria Chiara, Locatelli Chiara, Mattina Teresa, Bonaglia Maria Clara, Piazza Francesca, Magini Pamela, Antonaros Francesca, Ramacieri Giuseppe, Vione Beatrice, Vitale Lorenza, Seri Marco, Strippoli Pierluigi, Cocchi Guido, Piovesan Allison, Caracausi Maria (2022);

*Partial Trisomy 21 With or Without Highly Restricted Down Syndrome Critical Region (Hr-Dscr): Report of Two New Cases and Reanalysis Of The Genotype-Phenotype Association; Bmc*

**Medical Genetics**, 15(1):266

DOI: 10.1186/s12920-022-01422-6 PMID: 36544206 I.F. 3,622

Pelleri Maria Chiara, Mattina Teresa, Bonaglia Maria Clara, Piazza Francesca, Magini Pamela, Antonaros Francesca, Ramacieri Giuseppe, Vione Beatrice, Vitale Lorenza, Seri Marco, Strippoli Pierluigi, Cocchi Guido, Piovesan Allison, Caracausi Maria (2022);

*With Or Without Highly Restricted-Down Syndrome Critical Region (Hr-Dsr). Report Of Two New Partial Trisomy 21 Cases and Review Of The Recent Literature;*

Abstract e-Poster P08.020.B from the 54th European Society of Human Genetics (ESHG) Conference - Virtual Conference, 28-31.08.2021;

**European Journal of Human Genetics**, 30(Suppl. 1):235

DOI: 10.1038/s41431-021-01026-1 I.F. 5,351

Pozzi Marco, Mauri Maddalena, Bertella Silvana, Gatti Erika, Nobile Maria (2022);

*Attention Deficit Hyperactivity Disorder; In "Comprehensive Pharmacology"*,

Editor-in-Chief Terry Kenakin,

**Elsevier** DOI: 10.1016/B978-0-12-820472-6.00164-X

Pozzi Marco\*, Zanotta Nicoletta\*, Epifanio Roberta, Baldelli Sara, Cattaneo Dario, Clementi Emilio, Zucca Claudio (2022);

*Lacosamide Effectiveness and Tolerability in Patients with Drug-Resistant Epilepsy and Severe Disability Under Polytherapy: Therapy Optimization as Emerging From An Observational Study;*

**Epilepsy & Behavior**, 128:108598

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.1016/j.yebeh.2022.108598 PMID: 35151192 I.F. 3,337

Provenzi Livio, Mambretti Fabiana, Villa Marco, Grumi Serena, Citterio Andrea, Borgatti Renato, MOM-COPE Study Group (Citterio Andrea, Mambretti Fabiana, Villa Marco) (2022);

*Chasing The Footprints of Covid-19-Related Stress: Behavioral and Epigenetics Effects In Pregnant Women And Their Infants;*

Abstract Symposium The COVID-19 Generation - Society of Biological Psychiatry 77th Annual Scientific Convention and Meeting, New Orleans, LA, USA, 28-30.04.2022;

**Biological Psychiatry**, 91(S1):S25 I.F. 12,810

Provenzi Livio, Villa Marco, Mambretti Fabiana, Citterio Andrea, Grumi Serena, Bertazzoli Emanuela, Biasucci Giacomo, Decembrino Lidia, Gardella Barbara, Giacchero Roberta, Magnani Maria Luisa, Nacinovich Renata, Pisoni Camilla, Prefumo Federico, Orcesi Simona, Scelsa Barbara, Giorda Roberto, Borgatti Renato, MOM-COPE Study Group (2022);

Is Brain-Derived Neurotropic Factor Methylation Involved in The Association Between Prenatal Stress and Maternal Postnatal Anxiety During The Covid-19 Pandemic?

**Frontiers in Psychiatry**, 13:950455

DOI: 10.3389/fpsyg.2022.950455 PMID: 35911240 I.F. 5,435

Romaniello Romina, Pasca Ludovica, Panzeri Elena, D'Abrusco Fulvio, Travaglini Lorena, Serpieri Valentina, Signorini Sabrina, Aiello Chiara, Bertini Enrico Silvio, Bassi Maria Teresa, Valente Enza Maria, Zanni Ginevra, Borgatti Renato, Arrigoni Filippo Silvio Aldo (2022);  
*Superior Cerebellar Atrophy: An Imaging Clue to Diagnose Itpk1-Related Disorders;*  
**International Journal of Molecular Sciences**, 23(12):6723  
DOI: 10.3390/ijms23126723 PMID: 35743164 I.F. 6,208

Rossi Salvatore, Rubegni Anna, Riso Vittorio, Barghigiani Melissa, Bassi Maria Teresa, Battini Roberta, Bertini Enrico Silvio, Cereda Cristina, Cioffi Ettore, Criscuolo Chiara, Dal Fabbro Beatrice, Dato Clemente, D'Angelo Maria Grazia, Di Muzio Antonio, Diamanti Luca, Dotti Maria Teresa, Filli Alessandro, Gioiosa Valeria, Liguori Rocco, Martinuzzi Andrea, Massa Roberto, Mignarri Andrea, Moroni Rossana, Musumeci Olimpia, Nicita Francesco, Orologio Ilaria, Orsi Laura, Pegoraro Elena, Petrucci Antonio, Plumari Massimo, Ricca Ivana, Rizzo Giovanni, Romano Silvia, Rumore Roberto, Sampaolo Simone, Scarlato Marina, Seri Marco, Stefan Cristina, Straccia Giulia, Tessa Alessandra, Travaglini Lorena, Trovato Rosanna, Ulgheri Lucia, Vazza Giovanni, Orlacchio Antonio, Silvestri Gabriella^, Santorelli Filippo Maria^, Melone Mariarosa Anna Beatrice^, Casali Carlo^ (2022);  
*Clinical-Genetic Features Influencing Disability In Spastic Paraplegia Type 4. A Cross-Sectional Study by The Italian Daisy Network;*

**Neurology-Genetics**, 8(2):e664

^ Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro (co-senior/last authors)

DOI: 10.1212/NXG.0000000000000664 PMID: 35372684 I.F. 3,663

Vantaggiato Chiara\*, Orso Genny\*, Guarato Giulia, Brivio Francesca, Napoli Barbara, Panzeri Elena, Masotti Simona, Santorelli Filippo Maria, Lamprou Maria, Gumeni Sentiljana, Clementi Emilio, Bassi Maria Teresa (2022);

Rescue Of Lysosomal Function as Therapeutic Strategy For Spg15 Hereditary Spastic Paraplegia;  
**Brain**, in press \* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro

DOI: 10.1093/brain/awac308 PMID: 36029068 I.F. 15,255

Velardo Daniele, D'Angelo Maria Grazia, Citterio Andrea, Panzeri Elena, Napoli Laura, Cinnante Claudia, Moggio Maurizio, Comi Giacomo Pietro, Ronchi Dario, Bassi Maria Teresa (2022);  
Case Reports: Novel Missense Variants in The Filamin C Actin Binding Domain Cause Variable Phenotypes;

**Frontiers in Neurology**, 13:9300039 – Case Report

DOI: 10.3389/fneur.2022.9300039 PMID: 35903116 I.F. 4,086

Zuffardi Orsetta§, Fichera Marco§, Bonaglia Maria Clara§ (2022);

*The Embryo Battle Against Adverse Genomes: Are De Novo Terminal Deletions the Rescue of Unfavorable Zygotic Imbalances?*

**European Journal of Medical Genetics**, 65(8):194532 - Review

\* Autori che hanno contribuito in ugual misura al lavoro e § co-corresponding authors

DOI: 10.1016/j.ejmg.2022.104532 PMID: 35724817 I.F. 2,465

“Centro Dino Ferrari”  
Il Coordinatore Scientifico  
Prof. Giacomo Pietro Comi