

## **Studi di neuropsicologia, di neuroimmagini e di tecniche innovative per la ricerca di biomarcatori nelle malattie neurodegenerative**

### **Introduzione:**

Scopo del presente progetto è quello di individuare soggetti a rischio di sviluppare un declino cognitivo attraverso lo sviluppo di una matrice complessa in grado di integrare marcatori molecolari (genetici ed epigenetici), biologici (infiammazione), cognitivi e cerebrali.

Il presente progetto ha consentito di pervenire alla selezione ed al reclutamento di 268 soggetti a rischio di declino cognitivo. Inoltre, analisi genetiche e biochimiche sono state condotte al fine di identificare biomarcatori molecolari diagnostici e prognostici e fattori coinvolti nell'insorgenza di declino cognitivo come potenziali marcatori e target terapeutici. Parallelamente, è stata effettuata l'elaborazione del protocollo di training multimodale.

Il reclutamento delle casistiche è stato effettuato nei primi 2 mesi. L'individuazione di soggetti a rischio di declino cognitivo (ARCD) ha richiesto 3 mesi. Le analisi genetiche, biochimiche e molecolari sono state effettuate nell'arco di 6 mesi. L'elaborazione del training multimodale è stata effettuata in 3 mesi.

### **Obiettivi di ricerca:**

- Sviluppo di una matrice diagnostica innovativa basata su protocolli di medicina di precisione che, combinando dati comportamentali e neurobiologici risulti sensibile e specifica nell'individuare eventuali segni di neurodegenerazione incipiente, e sviluppo di un training multimodale (Multimodal Training, -MT-) che integri stimolazione cognitiva, esercizio fisico, intervento nutrizionale e controllo dei fattori di rischio cardio-vascolari.
- Caratterizzare i biomarcatori genomici che potrebbero contribuire all'invecchiamento biologico e allo sviluppo e progressione del declino cognitivo e di demenza, fornendo informazioni sulla suscettibilità e sviluppo di declino cognitivo e demenza in maniera da identificare i pazienti con un rischio maggiore.

### **Risultati:**

Nei primi due mesi del progetto, dal database del Laboratorio di Neuropsichiatria della Fondazione Santa Lucia, sono stati selezionati 618 soggetti sani, dei quali 309 sono stati classificati come soggetti potenzialmente a rischio di sviluppare di deterioramento cognitivo. Tale rischio è stato calcolato tramite due procedure: seguendo il protocollo originale, infatti, sono stati definiti come soggetti a rischio coloro i quali avessero familiarità di primo grado con la demenza ed un punteggio >10 (intermedio o elevato) secondo il CAIDE risk score, calcolato tramite un'app per ambienti iOS (<https://itunes.apple.com/it/app/caide-risk-score-app/id897853817?mt=8>). L'app computa il calcolo basandosi su alcuni fattori di rischio, quali età, genere, scolarità, pressione arteriosa, body mass index, colesterolo ed attività fisica. La seconda modalità attraverso cui è stato calcolato il rischio è l'utilizzo del Dementia Risk Calculator, un tool che, tramite l'inserimento di informazioni relative alla presenza di familiarità per demenza, genere, età e fattori di rischio cardiovascolari (pressione sanguigna, diabete, problemi cardiaci,

colesterolo, fumo e peso), restituisce un rischio (in termini categoriali “alto” e “basso”) di sviluppare demenza (<http://www.medindia.net/patients/calculators/dementia-risk-calculator.asp>). Le due procedure sono risultate del tutto sovrapponibili (non sorprendentemente, dato il fatto che i fattori di rischio utilizzati dai due sistemi sono gli stessi).

I criteri di inclusione per il campione generale sono stati: a) età tra i 40 e i 70 anni; b) assenza di demenza (cioè assenza dei criteri diagnostici del DSM-5 per il disturbo cognitivo maggiore e moderato); c) idoneità per la risonanza magnetica. I criteri di esclusione per entrambi i campioni sono stati: a) presenza di un disordine psichiatrico in asse I o II, b) storia di trauma cranico, c) patologie mediche rilevanti (escluso il diabete compensato), d) storia di dipendenza da alcool o droga, e) ritardo mentale.

I soggetti sono stati quindi contattati telefonicamente ed è stato proposto loro di partecipare allo studio e, del campione iniziale, hanno accettato 268 partecipanti.

E' stata quindi creata una batteria altamente innovativa che fosse in grado di rilevare alterazioni precoci a diversi livelli (comportamentale, cognitivo e funzionale). In particolare, la batteria valuta: i) il grado di consapevolezza dei propri disturbi, se presenti; ii) la presenza di sintomi neuropsichiatrici anche sub-clinici; iii) la resilienza, lo stile di coping e la componente cognitiva ed affettiva del benessere personale; iv) lo stato cognitivo generale; v) le capacità attentive; vi) la memoria di lavoro; vii) le capacità mnesiche; viii) la capacità linguistica; ix) il funzionamento esecutivo; x) la rapidità del processo informativo; xi) il funzionamento nella vita di tutti i giorni; xii) Informazioni riguardanti lo stile di vita.

Inoltre, è stato costruito un questionario apposito per la raccolta delle informazioni riguardanti le attività cognitivamente stimolanti/hobbies, sulla base di criteri predefiniti.

Parallelamente, è stato definito un protocollo di acquisizione di imaging cerebrale tramite risonanza magnetica ad alto campo. Nel dettaglio, le sequenze implementate sono: i) una sequenza 3D pesata in T1 ad alta risoluzione, ii) immagini di Diffusion Tensor Imaging (DTI) a 30 direzioni, iii) sequenze cliniche standard (FLAIR, Densità Protonica e immagini peate in T2). Le diverse tipologie di immagini sono state elaborate con differenti modalità, allo scopo di quantificare le più sottili variazioni del tessuto cerebrale sia a livello macrostrutturale (tramite elaborazione di immagini T1) che a livello microstrutturale (tramite elaborazione di immagini DTI).

Come già riportato, il campione totale dei soggetti ARCD era composto da 268 partecipanti, con età media di 56.8 anni ( $\pm 9.1$ ) e scolarità media di 13.5 anni ( $\pm 3.8$ ), di cui il 42% di maschi. Una prima analisi ha permesso di individuare un sottogruppo ( $n=30$ ) di soggetti con lesioni vascolari della sostanza bianca che presentano, rispetto agli individui senza lesioni, livelli più alti di ansia ed apatia ed un volume ippocampale ridotto, variabili, queste, altamente predittive di un futuro sviluppo di decadimento cognitivo. I risultati di questa analisi sono stati appena pubblicati sulla rivista *Journal of Personalized Medicine* (*J Pers Med.* 2020;10(4):1-18. doi:10.3390/jpm10040172).

L'analisi genetica è stata effettuata analizzando specifiche varianti a singolo nucleotide (SNVs) situate in geni bersaglio. Al fine di effettuare la genotipizzazione, sono state utilizzate tecnologie ad alta processività, le piattaforme Open Array e Axiom. :

In particolare, per la piattaforma Open Array è stato costruito ed utilizzato un pannello di 120 SNVs localizzate in geni coinvolti in pathways molecolari rilevanti nell'ambito del declino cognitivo e dei meccanismi neurodegenerativi (risposta immunitaria, vitalità e degenerazione cellulare, neuroinfiammazione), selezionate a partire da dati di letteratura e consultando database e tools bioinformatico-predittivi.

Le analisi sulla piattaforma Open Array sono state effettuate su 343 pazienti affetti da malattia di Parkinson sporadica, 400 pazienti affetti dalla forma neovascolare di Degenerazione Maculare legata all'età, (AMD) 143 soggetti affetti da malattia di Alzheimer (AD) e 307 affetti da declino cognitivo lieve (MCI):

-Lo studio effettuato sui soggetti affetti da malattia di Parkinson ha consentito di evidenziare 26 geni associati alla malattia, di cui 11 identificati per la prima volta. Inoltre, successive analisi biostatistiche e bioinformatiche hanno consentito di inquadrare la funzione di tali geni all'interno di networks coinvolti nei processi molecolari legati alla patologia, pervenendo anche all'identificazione di alcuni geni e microRNAs (miRNAs) come regolatori importanti di tali interazioni, come ad esempio il gene codificante per l'Interleuchina 6 (IL6). Nell'insieme, tale studio propone le varianti ed i relativi geni risultati associati come potenziali biomarcatori utili ai fini della diagnosi della malattia ed alla rilevazione di decadimento cognitivo. Inoltre, tali geni potrebbero essere soggetti a valutazione come potenziali target terapeutici.

-La caratterizzazione di pazienti affetti da AMD ha consentito di individuare 23 SNVs associate con la malattia, per le quali estensive analisi biostatistiche e bioinformatiche, hanno consentito di identificarne un ruolo in diversi processi biologici condivisi da varie malattie neurodegenerative (come AD e PD), tra i quali principalmente pathways metabolici (vie di segnalazione legate alle Sirtuine), neuroinfiammazione e sinaptogenesi. Nell'insieme, tale studio ha consentito di identificare fattori genetici potenzialmente fruibili come biomarcatori diagnostici di AMD ma anche valutabili come marcatori di alterazioni cognitive e di insorgenza di neurodegenerazioni.

-Inoltre, nell'ambito del supporto dell'analisi bioinformatica alla gestione, analisi ed interpretazione del dato genomico-molecolare, sono stati evidenziati e descritti vari metodi basati sull'Intelligenza Artificiale e sul deep learning. Tali metodi potrebbero essere utilizzati ed implementati al fine di integrare tali informazioni con ulteriori dati molecolari, dati clinici e di neuroimaging, al fine di pervenire ad una caratterizzazione più raffinata ed accurata del paziente a rischio o affetto di AD e PD.

Per quanto riguarda l'analisi dei marcatori biochimici (BDNF e neurofilamenti), durante i primi 6 mesi di progetto sono stati validati i metodi di laboratorio necessari a rilevare i livelli del BDNF e dei Neurofilamenti leggeri (NF-L) nel sangue dei partecipanti. Non essendo disponibili sistemi certificati per la diagnostica in vitro, abbiamo definito i livelli in una popolazione di donatori sani, confrontandoli con un sottogruppo di pazienti con malattie neurologiche o depressione. Il livello di BDNF libero nei soggetti sani è risultato di 22085,04 ±4229 pg/ml, mentre nei pazienti con depressione è di 23780,75±6964 pg/ml. La differenza tra i due gruppi non è statisticamente significativa. I livelli di NF-L nei soggetti sani sono di 7,01 pg/ml, mentre nei pazienti con malattie neurodegenerative sono 12,62 pg/ml, con una differenza tra i due gruppi statisticamente significativa.