

## **INDICE**

### **1. Attività Scientifica**

*Struttura organizzativa IRCCS San Raffaele*

*Comitato Scientifico*

*Produzione scientifica*

*Premi, riconoscimenti e incarichi*

*Linee di Ricerca*

3.2.1. Linea 1. Fattori preclinici determinanti l'efficacia della riabilitazione

3.2.2. Linea 2. Clinica della disabilità

3.2.3. Linea 3. Innovazione in medicina e riabilitazione

*Ricerca Finalizzata e Giovani Ricercatori*

*Altra tipologia di ricerca*

*Comitato Etico e Clinical Trial Center*

*Convenzioni e Collaborazioni istituzionali nazionali ed internazionali*

*Università telematica*

### **4. Attività di formazione**

*Corsi ECM*

### **5. Attività assistenziale**

### **6. Indirizzi utili**

## ATTIVITA' SCIENTIFICA

---

## STRUTTURA ORGANIZZATIVA IRCCS SAN RAFFAELE

L'assetto organizzativo del network San Raffaele coinvolge l'IRCCS nella costituzione di 3 Dipartimenti che svolgono attività di indirizzo, coordinamento, verifica e valutazione sia nell'ambito dell'assistenza, che in quello della ricerca scientifica.

<b>DIPARTIMENTO A - SCIENZE NEUROLOGICHE E RIABILITATIVE</b>	
<b>Responsabile: Paolo Maria Rossini</b>	
<b>Reperti</b>	<b>Laboratori di ricerca</b>
<b>Codice 56 Day Hospital Pediatria</b>	<b>Neurobiologia Molecolare e Cellulare Patologia molecolare, cellulare e ultrastrutturale Elettrofisiologia Neurofisiologia Sperimentale Brain Connectivity Bioingegneria della Riabilitazione Immunopatologia Sinaptica</b>

<b>DIPARTIMENTO B - SCIENZE CARDIOLOGICHE E RESPIRATORIE</b>	
<b>Responsabile: Maurizio Volterrani</b>	
<b>Reperti</b>	<b>Laboratori di ricerca</b>
<b>Riabilitazione Cardiologica Riabilitazione Respiratoria</b>	<b>Endocrinologia Cardiovascolare Farmacologia Cellulare e Molecolare</b>

<b>DIPARTIMENTO C – AGING E CRONICITÀ</b>	
<b>Responsabile: Massimiliano Celi</b>	
<b>Reperti</b>	<b>Laboratori di ricerca</b>
<b>Medicina Ex art. 26</b>	<b>Biochimica dell'Invecchiamento e Nutrizione</b>

## AREE DI RICERCA IRCCS SAN RAFFAELE PISANA

Le attività di ricerca prevedono una organizzazione secondo Aree di Ricerca ciascuna con un proprio responsabile.

AREA DI RICERCA	RESPONSABILE
Neuroscienze e Riabilitazione Neuromotoria	Paolo Maria Rossini
Riabilitazione Neuromotoria e Robotica Riabilitativa	Marco Franceschini
Centro del Farmaco e Clinical Trial Center	Carlo Tomino
Parkinson e Disturbi del Movimento	Fabrizio Stocchi
Cefalee e Dolore Neuropatico	Piero Barbanti
Riabilitazione Cardiovascolare, Telemedicina, e-Health	Maurizio Volterrani
Pneumologia Riabilitativa	Vittorio Cardaci
Centro di Ricerca Clinica e Sperimentale	Giuseppe Rosano
Epidemiologia Clinica e Biostatistica	Stefano Bonassi
Disabilità dello Sviluppo e Riabilitazione	Claudia Condoluci
Biobanca - Biotecnologie Avanzate e BiomarkerDiscovery	Fiorella Guadagni
Organizzazione e Gestione dei Servizi	Amalia Allocca
Diagnostica per Immagini	Alberto Pierallini

**CENTRO RICERCHE  
RICERCA DI BASE - TRASLAZIONALE**

<b>LABORATORIO</b>	<b>RESPONSABILE</b>	<b>STAFF</b>	<b>COLLABORAZIONE</b>
<b>Endocrinologia Cardiovascolare</b>	Massimiliano Caprio	Andrea Armani, Alessandra Feraco, Stefania Gorini, Caterina Mammi, Vincenzo Marzolla	
<b>Neurobiologia molecolare e cellulare</b>	Leonardo Lupacchini	Chiara De Dominicis	Daniela Merlo, Istituto Superiore di Sanità
<b>Patofisiologia della Cachessia dello Scompenso Cardiaco</b>		Alessandra Feraco	
<b>Patologia molecolare, cellulare e ultra strutturale</b>	Matteo Antonio Russo	Federica Limana, Luigi Sansone, Giada Tomaselli, Enza Vernucci	Marco Tafani, Università Sapienza
<b>Elettrofisiologia</b>	Gabriele Ruffolo	Eleonora De Felice	Eleonora Palma, Università Sapienza
<b>Biochimica dell'Invecchiamento</b>	Sara Baldelli	Fabio Ciccarone	Maria Rosa Ciriolo, Università Tor Vergata e in convenzione con Università Telematica San Raffaele
<b>Brain Connectivity</b>	Fabrizio Vecchio	Francesca Alù, Francesca Miraglia, Alessandro Orticoni	
<b>Bioingegneria della Riabilitazione</b>	Francesco Infarinato	Marco Ottaviani, Paola Romano	
<b>Epidemiologia Molecolare</b>	Patrizia Russo	Alessia Santoro	
<b>Microbiologia delle Patologie cronico- degenerative</b>	Limongi Dolores	Cecilia Ambrosi, Paola Checconi	Anna Teresa Palamara, Università Sapienza

<b>Fisiologia e Farmacologia del Dolore</b>	Ilari Sara	Malafoglia Valentina	Vincenzo Mollace, Università Magna Graecia Catanzaro
<b>Neurofisiologia Sperimentale</b>	Barbara Picconi	Valeria Calabrese, Antonella Cardinale, Antonio de Iure	Paolo Calabresi (Università di Perugia) e in convenzione con Università Telematica San Raffaele
<b>Immunopatologia sinaptica</b>	Georgia Mandolesi	Silvia Bullitta, Diego Freseigna, Antonietta Gentile, Livia Guadalupi, Rosella Mechelli, Alessandra Musella, Monica Nencini, Valentina Vanni	Diego Centonze (Università Tor Vergata) e in convenzione con Università Telematica San Raffaele

## COMITATO TECNICO SCIENTIFICO

Il Comitato Tecnico-Scientifico è presieduto dal Professore Enrico Garaci.

Ha funzioni di indirizzo e di supporto all'attività di ricerca.

Formula il parere sulla relazione scientifica inerente all'attività di ricerca.

Formula i criteri per la valutazione dei risultati di ricerca.

Valuta e approva il programma annuale di ricerca elaborato dal Direttore Scientifico e ne propone l'attuazione al Consiglio di Amministrazione.

Il Comitato Tecnico-Scientifico promuove inoltre la formazione professionale per incentivare la produttività scientifica e tutte le condizioni necessarie per il raggiungimento e il mantenimento dell'eccellenza sia scientifica che assistenziale.

---

Prof. Enrico Garaci	
Amalia Allocca	Anna Teresa Palamara
Lucio Annunziato	Guido Rasi
Giorgio Bernardi	Giovanni Rezza
Paolo Calabresi	Paolo Maria Rossini
Marcello Celestini	Matteo Antonio Russo
Diego Centonze	Valter Santilli
Massimo Fini	Orazio Schillaci
Marco Franceschini	Fabrizio Stocchi
Fiorella Guadagni	Vilberto Stocchi
Giovanni Muto	Ennio Tasciotti
Giuseppe Novelli	Maurizio Volterrani

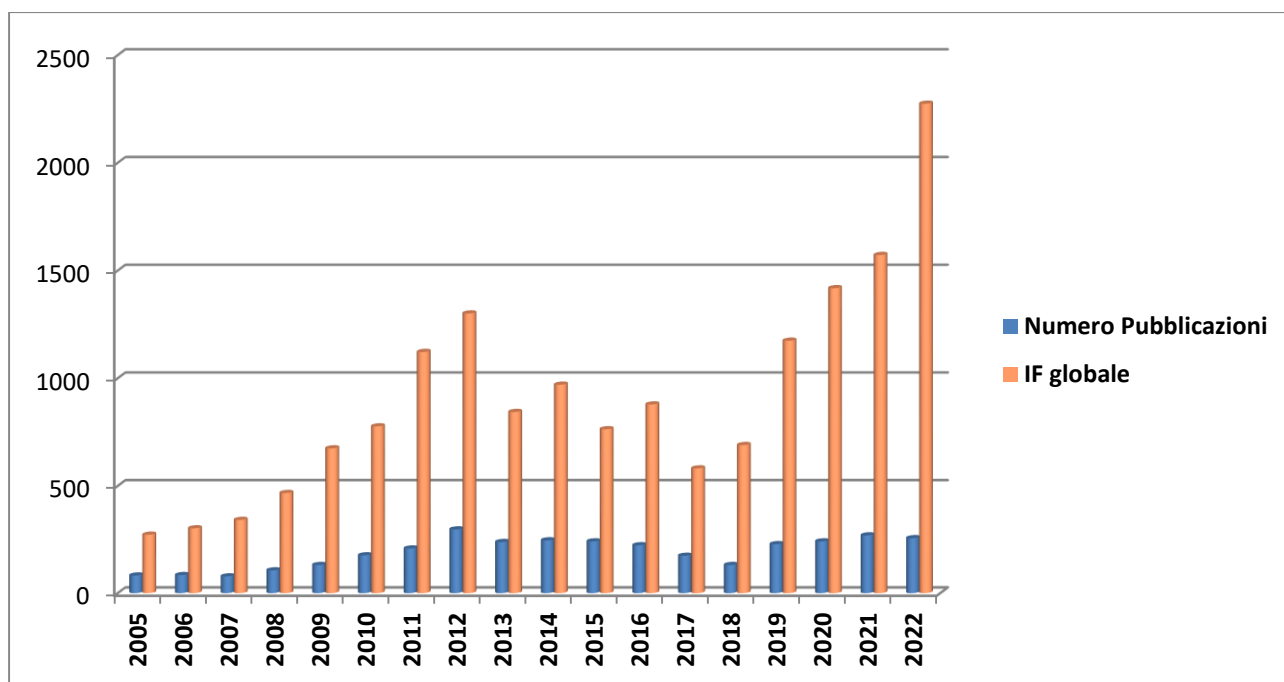
---

## PRODUZIONE SCIENTIFICA

Nel 2022 l'attività scientifica dell'IRCCS San Raffaele è documentata 256 pubblicazioni. Tale produzione scientifica costituisce anche il frutto delle collaborazioni di ricerca con altri gruppi e istituti a livello nazionale ed internazionale.

L'impact factor totale per gli articoli pubblicati nel 2022 è pari a 2.274.

Le pubblicazioni sono espressione delle attività di ricerca clinica, traslazionale, di base e dell'eccellenza di assistenza svolte anche in collaborazione con altri gruppi di ricerca ed altre strutture.



*Impact Factor totale degli articoli pubblicati dall' IRCCS San Raffaele Pisana nel periodo 2005-2022*



Opattova A, Langie S A S, Milic M, Collins A, Brevik A, Coskun E, Working Group 5 of hCOMET (Cost action CA15132).

**A pooled analysis of molecular epidemiological studies on modulation of DNA repair by host factors.**

Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 876–877(503447), 503447. doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503447

Mariani F, Valentini P, Yamba M, Turay A S, Bulubisi H, Moscato U, Buonsenso D.

**Changes in childhood immunizations and intermittent preventive malaria treatment in a peripheral, referral immunization center during the first 12 months of COVID-19 pandemic in Sierra Leone, western Africa.**

Frontiers in Pediatrics, 10, 774281. doi:10.3389/fped.2022.774281

Ilari S, Russo P, Proietti S, Vitiello L, Muscoli C, Tomino C, Bonassi S.

**DNA damage in dementia: evidence from patients affected by severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and meta-analysis of most recent literature.**

Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 878(503499), 503499. doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503499

Bini C, Paoletti M, Marcellusi A, Tomino C, Mennini F. S.

**Valutazione economica di treosulfan in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.**

Global & Regional Health Technology Assessment Italian Northern Europe and Spanish, 9, 105–116. doi:10.33393/grhta.2022.2412

Centofanti F, Alonzi T, Latini A, Spitalieri P, Murdocca M, Chen X, Pandolfi P. P.

**Indole-3-carbinol in vitro antiviral activity against SARS-Cov-2 virus and in vivo toxicity.**

Cell Death Discovery, 8(1), 491. doi:10.1038/s41420-022-01280-2

Trubetskoy V, Pardiñas A F, Qi T., Panagiotaropoulou G, Awasthi S, Bigdeli TB, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium.

**Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia.**

Nature, 604(7906), 502–508. doi:10.1038/s41586-022-04434-5

Vitiello L, Ilari S, Sansone L, Belli M, Cristina M, Marcolongo F, Russo, P.

**Preventive measures against pandemics from the beginning of civilization to nowadays-how everything has remained the same over the Millennia.**

Journal of Clinical Medicine, 11(7), 1960. doi:10.3390/jcm11071960

Infante M, Vitiello L, Fabbri A, Ricordi C, Padilla N, Pacifici F, Uccioli L.

**Prolonged clinical remission of type 1 diabetes sustained by calcifediol and low-dose basal insulin: a case report.**

Immunotherapy, 15(13), 1009–1019. doi:10.2217/imt-2022-0266

Russo S & Bonassi S.

**Prospects and pitfalls of machine learning in nutritional epidemiology.**

Nutrients, 14(9), 1705. doi:10.3390/nu14091705

Valencia-Quintana R, Bahena-Ocampo IU, González-Castañeda G, Bonilla E, Milić M, Bonassi S, & Sánchez-Alarcón J.

**miRNAs: A potentially valuable tool in pesticide toxicology assessment-current experimental and epidemiological data review.**

Chemosphere, 295(133792), 133792. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133792

Russo V, Lallo E, Munnia A, Spedicato M, Messerini L, D'Aurizio R, Peluso M.

**Artificial intelligence predictive models of response to cytotoxic chemotherapy alone or combined to targeted therapy for metastatic colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis.**

Cancers, 14(16), 4012. doi:10.3390/cancers14164012

Ferroni P, Palmirotta R, Egeo G, Aurilia C, Valente M G, Spila, A, Guadagni F.

**Association of LTA and SOD gene polymorphisms with cerebral white matter hyperintensities in migraine patients.**

International Journal of Molecular Sciences 23(22), 13781. doi:10.3390/ijms232213781

Genovese C, Garozzo A, D'Angeli F, Malfa GA, Bellia F, Tomasello B, Acquaviva, R.

**Orobanche crenata Forssk. Extract affects human breast cancer cell MCF-7 survival and viral replication.**

Cells (Basel, Switzerland), 11(10), 1696. doi:10.3390/cells11101696

Imarisio A, Pilotto A, Garrafa E, Conforti F, Masciocchi S, Turrone R, Padovani A

**Plasma cystatin C correlates with plasma NFL levels and predicts disease progression in Parkinson's disease.**

Neuro-Degenerative Diseases, 21(5–6), 109–116. doi:10.1159/000523982

Raparelli V, Nocella C, Proietti M, Romiti GF, Corica B, Bartimoccia S, EVA Collaborators

**Testosterone-to-estradiol ratio and platelet thromboxane release in ischemic heart disease: the EVA project.**

Journal of Endocrinological Investigation, 45(7), 1367–1377. doi:10.1007/s40618-022-01771-0

Russo A, Incorvaia L, Capoluongo E, Tagliaferri P, Galvano A, Del Re M, Beretta G.

**The challenge of the molecular tumor board empowerment in clinical oncology practice: a position paper on behalf of the AIOM- SIAPEC/IAP-SIBioC-SIC-SIF-SIGU-SIRM Italian Scientific Societies.**

Critical Reviews in Oncology/Hematology, 169(103567), 103567. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103567

Castelli S, Ciccarone F, De Falco P, Ciriolo MR

**Adaptive antioxidant response to mitochondrial fatty acid oxidation determines the proliferative outcome of cancer cells.**

Cancer Letters, 554(216010), 216010. doi:10.1016/j.canlet.2022.216010

Ravaioli F, Zampieri M, Morandi L, Pirazzini C, Pellegrini C, De Fanti S, Bacalini M. G.  
**DNA methylation analysis of ribosomal DNA in adults with Down syndrome.**  
Frontiers in Genetics, 13, 792165. doi:10.3389/fgene.2022.792165

Pinton G, Boumya S, Ciriolo MR, Ciccarone, F.  
**Epigenetic insights on PARP-1 activity in cancer therapy.**  
Cancers, 15(1), 6. doi:10.3390/cancers15010006

Desideri E, Castelli S, Dorard C, Toifl S, Grazi GL, Ciriolo MR, Baccarini, M.  
**Impaired degradation of YAP1 and IL6ST by chaperone-mediated autophagy promotes proliferation and migration of normal and hepatocellular carcinoma cells.**  
Autophagy, 19(1), 152–162. doi:10.1080/15548627.2022.2063004

Castelli, S., Desideri, E., & Ciriolo, M. R.  
**ROS-mediated activation of p38 protects hepatocellular carcinoma cells from caspase-independent death elicited by lysosomal damage.**  
Biochemical Pharmacology, 198(114983), 114983. doi:10.1016/j.bcp.2022.114983

Iachettini S, Ciccarone F, Maresca C, D' Angelo C, Petti E, Di Vito S, Biroccio, A.  
**The telomeric protein TERF2/TRF2 impairs HMGB1-driven autophagy.**  
Autophagy, 19(5), 1479–1490. doi:10.1080/15548627.2022.2138687

Vitiello L, Gatta L, Ilari S, Bonassi S, Cristina M, Ciatti F, Limongi, D.  
**Long lasting cellular immune response induced by mRNA vaccination: Implication for prevention strategies.**  
Frontiers in Immunology, 13, 836495. doi:10.3389/fimmu.2022.836495

Cifelli P, Ruffolo, G, Ceccanti M, Cambieri C, Libonati L, Palma E, Inghilleri, M.  
**Classical and unexpected effects of ultra-micronized PEA in neuromuscular function.**  
Biomolecules, 12(6), 758. doi:10.3390/biom12060758

Ceccanti M, Libonati L, Ruffolo G, Cifelli P, Moret F, Frasca V, Cambieri C.  
**Effects of 3,4-diaminopyridine on myasthenia gravis: Preliminary results of an open-label study.**  
Frontiers in Pharmacology, 13, 982434. doi:10.3389/fphar.2022.982434

Ruffolo G, Alfano V, Romagnolo A, Zimmer T, Mills JD, Cifelli P, Palma E.  
**GABAA receptor function is enhanced by Interleukin-10 in human epileptogenic gangliogliomas and its effect is counteracted by Interleukin-1 $\beta$ .**  
Scientific Reports, 12(1), 17956. doi:10.1038/s41598-022-22806-9

Ruffolo G, Gaeta A, Cannata B, Pinzaglia C, Aronica E, Morano A, Palma, E.  
**GABAergic neurotransmission in human tissues is modulated by cannabidiol.**  
Life (Basel, Switzerland), 12(12), 2042. doi:10.3390/life12122042

Scalise S, Zannino C, Lucchino V, Lo Conte M, Scaramuzzino L, Cifelli P, Parrotta EI  
**Human iPSC modeling of genetic febrile seizure reveals aberrant molecular and physiological features underlying an impaired neuronal activity.**

Biomedicines, 10(5), 1075. doi:10.3390/biomedicines10051075

Morano A, Cerulli Irelli E, Salamone EM, Orlando B, Fanella M, Tinelli E, Di Bonaventura C.  
**Late-onset seizures and epilepsy: Electroclinical features suggestive of autoimmune etiology.**  
Frontiers in Neurology, 13, 924859. doi:10.3389/fneur.2022.924859

Mikroulis A, Ledri M, Ruffolo G, Palma E, Sperk G, Dalli J, Kokaia, M.  
**Lipid mediator n-3 docosapentaenoic acid-derived protectin D1 enhances synaptic inhibition of hippocampal principal neurons by interaction with a G-protein-coupled receptor.**  
FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 36(3), e22203. doi:10.1096/fj.202101815R

Morano A, Cerulli Irelli E, Fanella M, Orlando B, Salamone EM, Tinelli E, Di Bonaventura, C.  
**Olfactory impairment in autoimmune encephalitis: another piece of the puzzle.**  
Journal of Neurology, 269(5), 2762–2768. doi:10.1007/s00415-022-10959-6

Alfano V, Romagnolo A, Mills JD, Cifelli P, Gaeta A, Morano A, Ruffolo, G.  
**Unexpected effect of IL-1 $\beta$  on the function of GABAA receptors in pediatric focal cortical dysplasia.**  
Brain Sciences, 12(6), 807. doi:10.3390/brainsci12060807

Marzolla V, Infante M, Armani A, Rizzo M, Caprio, M.  
**Efficacy and safety of finerenone for treatment of diabetic kidney disease: current knowledge and future perspective.**  
Expert Opinion on Drug Safety, 21(9), 1161–1170. doi:10.1080/14740338.2022.2130889

Conte C, Camajani E, Lai A, Caprio, M.  
**Review of Not all very-low-carbohydrate diets are created equal.**  
Diabetologia, 66(9), 1752–1753. doi:10.1007/s00125-023-05961-0

Ilari S, Proietti S, Russo P, Malafoglia V, Gliozzi M, Maiuolo J, Muscoli C.  
**A systematic review and meta-analysis on the role of nutraceuticals in the management of neuropathic pain in in vivo studies.**  
Antioxidants (Basel, Switzerland), 11(12). doi:10.3390/antiox11122361

Maiuolo J, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C, Scarano F, Nucera S, Mollace V.  
**Involvement of the intestinal Microbiota in the appearance of multiple sclerosis: Aloe vera and citrus bergamia as potential candidates for intestinal health.**  
Nutrients, 14(13), 2711. doi:10.3390/nu14132711

Ilari S, Passacatini LC, Malafoglia V, Oppedisano F, Maiuolo J, Gliozzi M, Muscoli, C. (2022).  
**Tantali fibromyalgic supplicium: is there any relief with the antidepressant employment? A systematic review.**  
Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society, 186(106547), 106547. doi:10.1016/j.phrs.2022.106547

Maiuolo J, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C, Oppedisano F, Nucera S, Mollace V.

**The employment of genera *Vaccinium*, *Citrus*, *Olea*, and *Cynara* polyphenols for the reduction of selected anti-cancer drug side effects.**

Nutrients, 14(8), 1574. doi:10.3390/nu14081574

Laboy Cintron D, Muir AM, Scott A, McDonald M, Monaghan KG, Santiago-Sim, T, Mefford HC.

**A recurrent, de novo pathogenic variant in *ARPC4* disrupts actin filament formation and causes microcephaly and speech delay.**

HGG Advances, 3(1), 100072. doi:10.1016/j.xhgg.2021.100072

Asif M, Kaygusuz E, Shinawi M, Nickelsen A, Hsieh TC, Wagle P, Hussain MS.

**De novo variants of *CSNK2B* cause a new intellectual disability-craniodigital syndrome by disrupting the canonical Wnt signaling pathway.**

HGG Advances, 3(3), 100111. doi:10.1016/j.xhgg.2022.100111

Hirsch N, Dahan I, D'haene E, Avni M, Vergult S, Vidal-García M, Birnbaum RY

**HDAC9 structural variants disrupting *TWIST1* transcriptional regulation lead to craniofacial and limb malformations.**

Genome Research, 32(7), 1242–1253. doi:10.1101/gr.276196.121

Fortugno P, Monetta R, Belli M, Botti E, Angelucci F, Palmerini MG, Brancati F.

**RIPK4 regulates cell-cell adhesion in epidermal development and homeostasis.**

Human Molecular Genetics, 31(15), 2535–2547. doi:10.1093/hmg/ddac046

Parenti I, Leitão E, Kuechler A, Villard L, Goizet C, Courdier C, Depienne C.

**The different clinical facets of *SYN1*-related neurodevelopmental disorders.**

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 10, 1019715. doi:10.3389/fcell.2022.1019715

Romano S, Romano C, Peconi M, Fiore A, Bellucci G, Morena E, Ristori G.

**Circulating *U13* small nucleolar RNA as a potential biomarker in Huntington's disease: A pilot study.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(20), 12440. doi:10.3390/ijms232012440

Alborghetti M, Bellucci G, Gentile A, Calderoni C, Nicoletti F, Capra R, Centonze D.

**Drugs used in the treatment of multiple sclerosis during COVID-19 pandemic: A critical viewpoint.**

Current Neuropharmacology, 20(1), 107–125. doi:10.2174/1570159X19666210330094017

Musella, A., & Centonze, D.

**Electrophysiology of endocannabinoid signaling.**

Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 2576, 461–475. doi:10.1007/978-1-0716-2728-0\_38

Gilio L, Buttari F, Pavone L, Iezzi E, Galifi G, Dolcetti E, Stampanoni Bassi M.

**Fatigue in multiple sclerosis is associated with reduced expression of interleukin-10 and worse prospective disease activity.**

Biomedicines, 10(9), 2058. doi:10.3390/biomedicines10092058

Bruno A, Dolcetti E, Azzolini F, Moscatelli A, Gambardella S, Ferese R, Stampanoni Bassi M.

Interleukin 6 SNP rs1818879 regulates radiological and inflammatory activity in multiple sclerosis. *Genes*, 13(5). doi:10.3390/genes13050897

Sciarretta F, Ceci V, Tiberi M, Zaccaria F, Li H, Zhou ZY, Lettieri-Barbato D.  
**Lipocalin-2 promotes adipose-macrophage interactions to shape peripheral and central inflammatory responses in experimental autoimmune encephalomyelitis.**  
*Molecular Metabolism*, 76(101783), 101783. doi:10.1016/j.molmet.2023.101783

Umeton R, Bellucci G, Bigi R, Romano S, Buscarinu MC, Reniè R, Ristori G  
**Multiple sclerosis genetic and non-genetic factors interact through the transient transcriptome.**  
*Scientific Reports*, 12(1), 7536. doi:10.1038/s41598-022-11444-w

Azzolini F, Gilio L, Pavone L, Iezzi E, Dolcetti E, Bruno A, Stampanoni Bassi M.  
**Neuroinflammation is associated with GFAP and sTREM2 levels in multiple sclerosis.**  
*Biomolecules*, 12(2), 222. doi:10.3390/biom12020222

Gilio L, Fresegha D, Gentile A, Guadalupi L, Sanna K, De Vito F, Stampanoni Bassi M.  
**Preventive exercise attenuates IL-2-driven mood disorders in multiple sclerosis.**  
*Neurobiology of Disease*, 172(105817), 105817. doi:10.1016/j.nbd.2022.105817

Dolcetti E, Bruno A, Azzolini F, Gilio L, Moscatelli A, De Vito F, Stampanoni Bassi M.  
**The BDNF Val66Met polymorphism (rs6265) modulates inflammation and neurodegeneration in the early phases of multiple sclerosis.**  
*Genes*, 13(2), 332. doi:10.3390/genes13020332

Sarshar M, Scribano D, Limongi D, Zagaglia, C, Palamara A T, Ambrosi C.  
**Adaptive strategies of uropathogenic Escherichia coli CFT073: from growth in lab media to virulence during host cell adhesion.**  
*International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 25(3), 481–494. doi:10.1007/s10123-022-00235-y

Prezioso C, Passerini S, Limongi D, Palamara AT, Moens U, Pietropaolo V.  
**COS-7 and SVGp12 cellular models to study JCPyV replication and MicroRNA expression after infection with archetypal and rearranged-NCCR viral strains.**  
*Viruses*, 14(9). doi:10.3390/v14092070

Annino G, Manzi V, Alashram AR, Romagnoli C, Coniglio M, Lamouchideli N, Padua E.  
**COVID-19 as a potential cause of muscle injuries in professional Italian Serie A soccer players: A retrospective observational study.**  
*International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), 11117. doi:10.3390/ijerph191711117

Passerini S, Prezioso C, Prota A, Babini G, Coppola, L, Lodi A. Ciotti M.  
**Detection analysis and study of genomic region variability of JCPyV, BKPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 and QPyV in the urine and plasma of HIV-1-infected patients.**  
*Viruses*, 14(11), 2544. doi:10.3390/v14112544

Prezioso C, Ciotti M, Brazzini G, Piacentini F, Passerini S, Grimaldi A, Pietropaolo V.  
**Diagnostic value of JC Polyomavirus viremia, viremia, serostatus and microRNA expression in multiple sclerosis patients undergoing immunosuppressive treatment.**  
Journal of Clinical Medicine, 11(2), 347. doi:10.3390/jcm11020347

Cipriani C, Tartaglione AM, Giudice M, D'Avorio E, Petrone V, Toschi N, Balestrieri E.  
**Differential expression of endogenous retroviruses and inflammatory mediators in female and male offspring in a mouse model of maternal immune activation.**  
International Journal of Molecular Sciences, 23(22). doi:10.3390/ijms232213930

Behzadi P, Ambrosi C, Scribano D, Zanetti S, Sarshar M, Gajdács M, Donadu MG.  
**Editorial: Current perspectives on Pseudomonas aeruginosa: epidemiology, virulence and contemporary strategies to combat multidrug-resistant (MDR) pathogens.**  
Frontiers in Microbiology, 13, 975616. doi:10.3389/fmicb.2022.975616

Moens U, Prezioso C, Pietropaolo V.  
**Functional domains of the early proteins and experimental and epidemiological studies suggest a role for the novel human polyomaviruses in cancer.**  
Frontiers in Microbiology, 13, 834368. doi:10.3389/fmicb.2022.834368

Marazzato M, Scribano D, Sarshar M, Brunetti F, Fillo S, Fortunato A, Ambrosi C.  
**Genetic diversity of antimicrobial resistance and key virulence features in two extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii isolates.**  
International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(5), 2870.  
doi:10.3390/ijerph19052870

Bitossi C, Viscido A, Prezioso C, Brazzini G, Trancassini M, Borrazzo C, Scagnolari C.  
**High prevalence of Merkel cell polyomavirus is associated with dysregulation in transcript levels of TLR9 and type I IFNs in a large cohort of CF patients from the Italian (Lazio) reference center for cystic fibrosis.**  
Microbial Pathogenesis, 169(105644), 105644. doi:10.1016/j.micpath.2022.105644

De Angelis M, Amatore D, Checconi P, Zevini A, Fraternali A, Magnani M, Nencioni L.  
**Influenza virus down-modulates G6PD expression and activity to induce oxidative stress and promote its replication.**  
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 804976. doi:10.3389/fcimb.2021.804976

Checconi P, Coni C., Limongi, D., Baldelli, S., Ciccarone, F., De Angelis, M., ... Palamara, A. T. (2023).  
**Influenza virus replication is affected by glutaredoxin1-mediated protein deglutathionylation.**  
FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 37(2), e22729. doi:10.1096/fj.202201239RR

Prezioso C, Brazzini G, Passerini S, Di Fabio C, Cosio T, Bernardini S, Ciotti M.  
**Prevalence of MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV in actinic keratosis biopsy specimens.**  
Viruses, 14(2), 427. doi:10.3390/v14020427

di Gioia C, Zullo F, Bruno Vecchio R C, Pajno C, Perrone G, Galoppi P, Brunelli R.

**Stillbirth and fetal capillary infection by SARS-CoV-2.**

American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM, 4(1), 100523.  
doi:10.1016/j.ajogmf.2021.100523

Sarshar M, Scribano D, Palamara AT, Ambrosi C, Masotti A.

**The Acinetobacter baumannii model can explain the role of small non-coding RNAs as potential mediators of host-pathogen interactions.**

Frontiers in Molecular Biosciences, 9, 1088783. doi:10.3389/fmolb.2022.1088783

Marcocci ME, Jackowska BG, Prezioso C, Protto V, De Angelis M, Di Leva FS, Nencioni L.

**The inhibition of DNA viruses by the amphibian antimicrobial peptide temporin G: A virological study addressing HSV-1 and JPCyV.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(13), 7194. doi:10.3390/ijms23137194

Behzadi P, Sameer AS, Nissar S, Banday MZ, Gajdács M, García-Perdomo HA, Ambrosi C.

**The interleukin-1 (IL-1) superfamily cytokines and their single nucleotide polymorphisms (SNPs).**

Journal of Immunology Research, 2022, 2054431. doi:10.1155/2022/2054431

Mollinari C, De Dominicis C, Lupacchini L, Sansone L, Caprini D, Casciola CM, Merlo, D.

**Detection of pathological markers of neurodegenerative diseases following microfluidic direct conversion of patient fibroblasts into neurons.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(4), 2147. doi:10.3390/ijms23042147

Cipriani C, Giudice M, Petrone V, Fanelli M, Minutolo A, Miele MT, Balestrieri E.

**Modulation of human endogenous retroviruses and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells from autistic children and their parents.**

Retrovirology, 19(1), 26. doi:10.1186/s12977-022-00603-6

Calabrese V, Picconi B, Heck N, Campanelli F, Natale G, Marino G, Charvin D.

**A positive allosteric modulator of mGlu4 receptors restores striatal plasticity in an animal model of l-Dopa-induced dyskinesia.**

Neuropharmacology, 218(109205), 109205. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109205

Mancini A, de Iure A, Picconi B.

**Basic mechanisms of plasticity and learning.**

Handbook of Clinical Neurology, 184, 21–34. doi:10.1016/B978-0-12-819410-2.00002-3

Frustaci A, Najafian B, Donato G, Verardo R, Chimenti C, Sansone L, Russo MA

**Divergent impact of enzyme replacement therapy on human cardiomyocytes and enterocytes affected by Fabry disease: Correlation with mannose-6-phosphate receptor expression.**

Journal of Clinical Medicine, 11(5), 1344. doi:10.3390/jcm11051344

Frustaci A, Verardo R, Scialla R, Bagnato G, Verardo M, Alfarano M, Russo MA.

**Downregulation of mannose-6-phosphate receptors in Fabry disease cardiomyopathy: A potential target for enzyme therapy enhancement.**

Journal of Clinical Medicine, 11(18), 5440. doi:10.3390/jcm11185440



Foglio E, Pellegrini L, Russo MA, Limana F.

**HMGB1-mediated activation of the inflammatory-reparative response following myocardial infarction.**

Cells (Basel, Switzerland), 11(2), 216. doi:10.3390/cells11020216

Frustaci A, Russo MA, Chimenti C.

**Review of Individualized immunosuppression in virus-negative inflammatory cardiomyopathy.**

European heart journal, 43(45), 4760. doi:10.1093/eurheartj/ehac559

Sansone L, de Iure A, Cristina M, Belli M, Vitiello L, Marcolongo F, Russo P.

**Nicotine in combination with SARS-CoV-2 affects cells viability, inflammatory response and ultrastructural integrity.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(16), 9488. doi:10.3390/ijms23169488

Frustaci A, Verardo R, Galea N, Alfarano M, Sansone L, Russo MA, Chimenti C.

**Removal of cardiac AL amyloid with positive remodelling of cardiomyocytes and of restrictive cardiomyopathy.**

ESC Heart Failure, 9(6), 4330–4334. doi:10.1002/ehf2.14017

Aventaggiato M, Barreca F, Sansone L, Pellegrini L, Russo M A, Cordani M, Tafani M

**Sirtuins and hypoxia in EMT control.**

Pharmaceuticals (Basel, Switzerland), 15(6), 737. doi:10.3390/ph15060737

Astanina E, Doronzo G, Corà D, Neri F, Oliviero S, Genova T, Bussolino F.

**The TFEB-TGIF1 axis regulates EMT in mouse epicardial cells.**

Nature Communications, 13(1), 5191. doi:10.1038/s41467-022-32855-3

Bauza-Mayol G, Quintela M, Brozovich A, Hopson M, Shaikh S, Cabrera F, Taraballi F.

**Biomimetic scaffolds modulate the posttraumatic inflammatory response in articular cartilage contributing to enhanced neoformation of cartilaginous tissue in vivo.**

Advanced Healthcare Materials, 11(1), e2101127. doi:10.1002/adhm.202101127

Hendrickson T, Lupo C, Bauza G, Tavares L, Ingram S, Wang S, Taraballi F.

**Thermally responsive hydrogel for atrial fibrillation related stroke prevention.**

Materials Today. Bio, 14(100240), 100240. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100240

Algieri C, Bernardini C, Marchi S, Forte M, Tallarida MA, Bianchi F, Nesci S.

**1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles counteract mitochondrial dysfunction acting on F1FO-ATPase in models of cardiovascular diseases.**

Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society, 187(106561), 106561. doi:10.1016/j.phrs.2022.106561

Authors/Task Force Members, McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, ESC Scientific Document Group.

**2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC).**

With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Journal of Heart Failure*, 24(1), 4–131. doi:10.1002/ejhf.2333

Zeppenfeld K, Tfelt-Hansen J, de Riva M, Winkel BG, Behr ER, Blom NA, ESC Scientific Document Group.

**2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death.**

*European Heart Journal*, 43(40), 3997–4126. doi:10.1093/eurheartj/ehac262

Kapłon-Cieślicka A, Benson L, Chioncel O, Crespo-Leiro MG, Coats AJS, Anker SD, on behalf of the Heart Failure Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Heart Failure Long-Term Registry Investigators. (2022).

**A comprehensive characterization of acute heart failure with preserved versus mildly reduced versus reduced ejection fraction - insights from the ESC-HFA EORP Heart Failure Long-Term Registry.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(2), 335–350. doi:10.1002/ejhf.2408

Caminiti G, Perrone MA, Iellamo F, D'Antoni V, Catena M, Franchini A, Volterrani M. (

**Acute left atrial response to different eccentric resistance exercise loads in patients with heart failure with middle range ejection fraction: A pilot study.**

*Journal of Personalized Medicine*, 12(5). doi:10.3390/jpm12050689

Tomasoni D, Adamo M, Bozkurt B, Heidenreich P, McDonagh T, Rosano GMC, Metra M.

**Aiming at harmony. Comparing and contrasting International HFrEF Guidelines.**

*European Heart Journal Supplements: Journal of the European Society of Cardiology*, 24(Suppl L), L20–L28. doi:10.1093/eurheartjsupp/suac124

Burton JO, Coats AJS, Kovesdy CP, Palmer BF, Piña IL, Rosano G, Zieroth S.

**An international Delphi consensus regarding best practice recommendations for hyperkalaemia across the cardiorenal spectrum.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(9), 1467–1477. doi:10.1002/ejhf.2612

D'Amari D, Rodolico D, Rosano GMC, Dahlström U, Crea F, Lund LH, Savarese G.

**Association between dosing and combination use of medications and outcomes in heart failure with reduced ejection fraction: data from the Swedish Heart Failure Registry.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(5), 871–884. doi:10.1002/ejhf.2477

Ferrannini G, Lund LH, Benson L, Rizzo M, Almahmeed W, Rosano GMC, Cosentino F.

**Association between use of novel glucose-lowering drugs and COVID-19 hospitalization and death in patients with type 2 diabetes: a nationwide registry analysis.**

*European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy*, 9(1), 10–17. doi:10.1093/ehjcvp/pvac044

Infante M, Fabbri A, Padilla N, Pacifici F, Di Perna P, Vitiello L, Uccioli L.

**BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine does not impact the honeymoon phase in type 1 diabetes: A case report.**

*Vaccines*, 10(7), 1096. doi:10.3390/vaccines10071096

Condorelli RA, Aversa A, Basile L, Cannarella R, Mongioì LM, Cimino L, La Vignera S.  
**Beneficial effects of the very-low-calorie ketogenic diet on the symptoms of male accessory gland inflammation.**  
Nutrients, 14(5), 1081. doi:10.3390/nu14051081

Seferović P, Farmakis D, Bayes-Genis A, Ben Gal T, Böhm M, Chioncel O, Coats AJS.  
**Biomarkers for the prediction of heart failure and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(7), 1162–1170. doi:10.1002/ejhf.2575

Bayes-Genis A, Aimo A, Jhund P, Richards M, de Boer RA, Arfsten H, Januzzi JL.  
**Biomarkers in heart failure clinical trials. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(10), 1767–1777. doi:10.1002/ejhf.2675

González A, Richards AM, de Boer RA, Thum T, Arfsten H, Hülsmann M, Bayés-Genís A.  
**Cardiac remodelling - Part 1: From cells and tissues to circulating biomarkers. A review from the Study Group on Biomarkers of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(6), 927–943. doi:10.1002/ejhf.2493

Aimo A, Vergaro G, González A, Barison A, Lupón J, Delgado V, Bayes-Genis A.  
**Cardiac remodelling - Part 2: Clinical, imaging and laboratory findings. A review from the Study Group on Biomarkers of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(6), 944–958. doi:10.1002/ejhf.2522

Visco V, Lippi ME, Salerno G, Licata MAVAC, de Dominicis C, Antolino G, Sciacchitano S.  
**Challenges in diagnosis and clinical management of COVID-19 in patient with B-cell chronic Lymphocytic leukemia (CLL): Report of one case.**  
Hematology Reports, 14(1), 31–37. doi:10.3390/hematolrep14010006

Barrea L, Caprio M, Camajani E, Verde L, Elce A, Frias-Toral E, Muscogiuri G.  
**Clinical and nutritional management of very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with psoriasis and obesity: a practical guide for the nutritionist.**  
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–17. doi:10.1080/10408398.2022.2083070

Mollace R, Macrì R, Tavernese A, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Mollace V.  
**Comparative effect of bergamot polyphenolic fraction and red yeast rice extract in rats fed a hyperlipidemic diet: Role of antioxidant properties and PCSK9 expression.**  
Nutrients, 14(3), 477. doi:10.3390/nu14030477

Iellamo F, Perrone MA, Cimini A, Caminiti G, Chiaravalloti A, Parisi A, Schillaci O.  
**Complementary role of combined indirect and direct cardiac sympathetic (hyper)activity assessment in patients with heart failure by spectral analysis of heart rate variability and nuclear imaging: Possible application in the evaluation of exercise training effects.**  
Journal of Cardiovascular Development and Disease, 9(6), 181. doi:10.3390/jcdd9060181

- Caminiti G, Iellamo F, Perrone MA, Marazzi G, Gismondi A, Cerrito A, Volterrani M.  
**Concurrent aerobic plus resistance training elicits different effects on short-term blood pressure variability of hypertensive patients in relation to their nocturnal blood pressure pattern.**  
Medicina (Kaunas, Lithuania), 58(11), 1682. doi:10.3390/medicina58111682
- Núñez J, de la Espriella R, Rossignol P, Voors AA, Mullens W, Metra M, Bayes-Genis A.  
**Congestion in heart failure: a circulating biomarker-based perspective. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association, European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(10), 1751–1766. doi:10.1002/ejhf.2664
- Barrea L, Caprio M, Watanabe M, Cammarata G, Feraco A, Muscogiuri G, and on behalf of Obesity Programs of nutrition, Education, Research and Assessment (OPERA) Group.  
**Could very low-calorie ketogenic diets turn off low grade inflammation in obesity? Emerging evidence.**  
Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1–17. doi:10.1080/10408398.2022.2054935
- Aktaa S, Batra G, Cleland JGF, Coats A, Lund LH, McDonagh T, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.  
**Data standards for heart failure: the European Unified Registries for Heart Care Evaluation and Randomized Trials (EuroHeart).**  
European Heart Journal, 43(23), 2185–2195. doi:10.1093/eurheartj/ehac151
- Infante M, Padilla N, Alejandro R, Caprio M, Della-Morte D, Fabbri A, Ricordi C.  
**Diabetes-modifying antirheumatic drugs: The roles of DMARDs as glucose-lowering agents.**  
Medicina (Kaunas, Lithuania), 58(5), 571. doi:10.3390/medicina58050571
- Kapelios CJ, Lund LH, Benson L, Dahlström U, Rosano GMC, Hauptman PJ, Savarese G.  
**Digoxin use in contemporary heart failure with reduced ejection fraction: an analysis from the Swedish Heart Failure Registry. European Heart Journal.**  
Cardiovascular Pharmacotherapy, 8(8), 756–767. doi:10.1093/ehjcvp/pvab079
- Hryciw DH, Stocker CJ, Morris MJ, Caprio M.  
**Editorial: Leptin, obesity and diet at a glance.**  
Frontiers in Endocrinology, 13, 1073850. doi:10.3389/fendo.2022.1073850
- Mullens W, Coats A, Seferovic P, Metra M, Mebazaa A, Ruschitzka F, Rosano GMC.  
**Education and certification on heart failure of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**  
European Journal of Heart Failure, 24(2), 249–253. doi:10.1002/ejhf.2430
- Mancin L, Amatori S, Caprio M, Sattin E, Bertoldi L, Cenci L, Paoli A (2022).  
**Effect of 30 days of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts on athletes' gut microbiome composition.**  
Frontiers in Nutrition, 9, 979651. doi:10.3389/fnut.2022.979651
- Mollace A, Macrì R, Mollace R, Tavernese A, Gliozzi M, Musolino V, Mollace V.

**Effect of ferric carboxymaltose supplementation in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Role of attenuated oxidative stress and improved endothelial function.**

Nutrients, 14(23), 5057. doi:10.3390/nu14235057

Caminiti G, Perrone MA, Volterrani M, Iellamo F, Marazzi G, Selli S, Padua E. (2022).

**Effects of concurrent aerobic plus resistance training on blood pressure variability and blood pressure values in patients with hypertension and coronary artery disease: Gender-related differences.**

Journal of Cardiovascular Development and Disease, 9(6). doi:10.3390/jcdd9060172

Volpe M, Gallo G, Rubattu S.

**Endocrine functions of the heart: from bench to bedside.**

European Heart Journal, 44(8), 643–655. doi:10.1093/eurheartj/ehac759

Tamargo J, Kjeldsen KP, Delpón E, Semb AG, Cerbai E, Dobrev D, Niessner A.

**Facing the challenge of polypharmacy when prescribing for older people with cardiovascular disease. A review by the European Society of Cardiology Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy.**

European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy, 8(4), 406–419. doi:10.1093/ehjcvp/pvac005

Barrea L, Vetrani C, Caprio M, Cataldi M, Ghoch ME, Elce A, Muscogiuri, G.

**From the ketogenic diet to the Mediterranean diet: The potential dietary therapy in patients with obesity after COVID-19 infection (post COVID syndrome).**

Current Obesity Reports, 11(3), 144–165. doi:10.1007/s13679-022-00475-z

Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS.

**Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology.**

Cardiovascular Research, 118(17), 3272–3287. doi:10.1093/cvr/cvac013

Bayés-Genís A, Aimo A, Metra M, Anker S, Seferovic P, Rapezzi C, Coats AJS.

**Head-to-head comparison between recommendations by the ESC and ACC/AHA/HFSA heart failure guidelines.**

European Journal of Heart Failure, 24(6), 916–926. doi:10.1002/ejhf.2542

Butler J, Khan MS, Friede T, Jankowska EA, Fabien V, Goehring UM, Ponikowski P.

**Health status improvement with ferric carboxymaltose in heart failure with reduced ejection fraction and iron deficiency.**

European Journal of Heart Failure, 24(5), 821–832. doi:10.1002/ejhf.2478

Seferović PM, Rosano GMC, Vardas P, Milinković I, Polovina M, Timmis A, Coats AJS. Heart Failure Association/European Society of Cardiology Atlas second edition: new insights into understanding the burden of heart failure.

European Heart Journal, 43(48), 4973–4975. doi:10.1093/eurheartj/ehac513

Riccardi M, Sammartino AM, Piepoli M, Adamo M, Pagnesi M, Rosano G, Tomasoni D.

**Heart failure: an update from the last years and a look at the near future.**

ESC Heart Failure, 9(6), 3667–3693. doi:10.1002/ehf2.14257

Gentile S, Satta E, Strollo F, Guarino G, Romano C, Della Corte T, Study Group AMD-OSDI on Injection Technique, and Nefrocenter Research & Nyx Start-up. (2021).

**Insulin-induced skin lipohypertrophies: A neglected cause of hypoglycemia in dialysed individuals with diabetes.**

Diabetes & Metabolic Syndrome, 15(4), 102145. doi:10.1016/j.dsx.2021.05.018

Pradhan A, Tiwari A, Caminiti G, Salimei C, Muscoli S, Sethi R, Perrone MA.

**Ideal P2Y12 inhibitor in acute coronary syndrome: A review and current status.**

International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(15), 8977. doi:10.3390/ijerph19158977

Rosano GMC, Seferovic P, Savarese G, Spoletini I, Lopatin Y, Gustafsson F, Coats AJS.

**Impact analysis of heart failure across European countries: an ESC-HFA position paper.**

ESC Heart Failure, 9(5), 2767–2778. doi:10.1002/ehf2.14076

Metra M, Jankowska EA, Pagnesi M, Anker SD, Butler J, Dorigotti F, AFFIRM-AHF Investigators.

**Impact of ischaemic aetiology on the efficacy of intravenous ferric carboxymaltose in patients with iron deficiency and acute heart failure: insights from the AFFIRM-AHF trial.**

European Journal of Heart Failure, 24(10), 1928–1939. doi:10.1002/ejhf.2630

Rosano GMC, Celant S, Olimpieri P P, Colatrella A, Onder G, Di Lenarda A, Russo P.

**Impact of the COVID-19 pandemic on prescription of sacubitril/valsartan in Italy.**

European Journal of Heart Failure, 24(5), 855–860. doi:10.1002/ejhf.2490

Lombardo M, Feraco A, Bellia C, Prisco L, D'Ippolito I, Padua E, Bellia, A. (2022).

**Influence of nutritional status and physical exercise on immune response in metabolic Syndrome.**

Nutrients, 14(10), 2054. doi:10.3390/nu14102054

De Giorgi A, Marra AM, Iacoviello M, Triggiani V, Rengo G, Cacciatore F, T.O.S.CA. Investigators.  
**Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) as predictor of cardiovascular mortality in heart failure patients: data from the T.O.S.CA. registry.**

Internal and Emergency Medicine, 17(6), 1651–1660. doi:10.1007/s11739-022-02980-4

Mone P, Izzo R, Marazzi G, Manzi MV, Gallo P, Campolongo G, Trimarco V.

**L-arginine enhances the effects of cardiac rehabilitation on physical performance: New insights for managing cardiovascular patients during the COVID-19 pandemic.**

The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 381(3), 197–203. doi:10.1124/jpet.122.001149

Heidecker B, Dagan N, Balicer R, Eriksson U, Rosano G, Coats A, Lüscher TF.

**Myocarditis following COVID-19 vaccine: incidence, presentation, diagnosis, pathophysiology, therapy, and outcomes put into perspective. A clinical consensus document supported by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.**

European Journal of Heart Failure, 24(11), 2000–2018. doi:10.1002/ejhf.2669

Armani A, Feraco A, Camajani E, Gorini S, Lombardo M, Caprio M.

**Nutraceuticals in brown adipose tissue activation.**

Cells (Basel, Switzerland), 11(24), 3996. doi:10.3390/cells11243996

Rosano GMC, Rodriguez-Martinez MA, Spoletini I, Regidor PA.

**Obesity and contraceptive use: impact on cardiovascular risk.**

ESC Heart Failure, 9(6), 3761–3767. doi:10.1002/ehf2.14104

Lindberg F, Lund LH, Benson L, Schrage B, Edner M, Dahlström U, Savarese G.

**Patient profile and outcomes associated with follow-up in specialty vs. primary care in heart failure.**

ESC Heart Failure, 9(2), 822–833. doi:10.1002/ehf2.13848

Piepoli MF, Adamo M, Barison A, Bestetti RB, Biegus J, Böhm M, Hoes A.

**Preventing heart failure: a position paper of the Heart Failure Association in collaboration with the European Association of Preventive Cardiology.**

European Journal of Preventive Cardiology, 29(1), 275–300. doi:10.1093/eurjpc/zwab147

Piepoli MF, Adamo M, Barison A, Bestetti RB, Biegus J, Böhm M, Hoes A.

**Preventing heart failure: a position paper of the Heart Failure Association in collaboration with the European Association of Preventive Cardiology.**

European Journal of Heart Failure, 24(1), 143–168. doi:10.1002/ejhf.2351

Ruilope LM, Ortiz A, Lucia A, Miranda B, Alvarez-Llamas G, Barderas M G, Pitt B.

**Prevention of cardiorenal damage: importance of albuminuria.**

European Heart Journal, 44(13), 1112–1123. doi:10.1093/eurheartj/ehac683

Salzano A, D'Assante R, Iacoviello M, Triggiani, V, Rengo G, Cacciatore F, T.O.S.CA. Investigators.  
**Progressive right ventricular dysfunction and exercise impairment in patients with heart failure and diabetes mellitus: insights from the T.O.S.CA. Registry.**

Cardiovascular Diabetology, 21(1), 108. doi:10.1186/s12933-022-01543-3

Marcolongo F, Scarlata S, Tomino C, De Dominicis, C, Giacconi R, Malavolta M, Prinzi G.

**Psycho-cognitive assessment and quality of life in older adults with chronic obstructive pulmonary disease-carrying the rs4713916 gene polymorphism (G/A) of gene FKBP5 and response to pulmonary rehabilitation: a proof of concept study.**

Psychiatric Genetics, 32(3), 116–124. doi:10.1097/YPG.0000000000000308

Anker SD, Ponikowski P, Khan MS, Friede T, Jankowska EA, Fabien V, Butler J.

**Responder analysis for improvement in 6-min walk test with ferric carboxymaltose in patients with heart failure with reduced ejection fraction and iron deficiency.**

European Journal of Heart Failure, 24(5), 833–842. doi:10.1002/ejhf.2491

Casasco M, Iellamo F, Scorcu M, Parisi A, Tavcar I, Brugin E, Pigozzi F.

**Return to play after SARS-CoV-2 infection in competitive athletes of distinct sport disciplines in Italy: A FMSI (Italian Federation of Sports Medicine) study.**

Journal of Cardiovascular Development and Disease, 9(2), 59. doi:10.3390/jcdd9020059

Rosano GMC, Vitale C, Adamo M, Metra M.

**Roadmap for the management of heart failure patients during the vulnerable phase after heart failure hospitalizations: how to implement excellence in clinical practice.**

Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.), 23(3), 149–156. doi:10.2459/JCM.0000000000001221

Fauvel C, Bonnet G, Mullens W, Giraldo CIS, Mežnar AZ, Barasa A, Mewton N.

**Sequencing and titrating approach of therapy in heart failure with reduced ejection fraction following the 2021 European Society of Cardiology guidelines: an international cardiology survey.** European Journal of Heart Failure, 25(2), 213–222. doi:10.1002/ejhf.2743

Vukadinović D, Abdin A, Anker SD, Rosano GMC, Mahfoud F, Packer M, Böhm, M.

**Side effects and treatment initiation barriers of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in heart failure: a systematic review and meta-analysis.**

European Journal of Heart Failure, 24(9), 1625–1632. doi:10.1002/ejhf.2584

Tomasoni D, Fonarow GC, Adamo M, Anker SD, Butler J, Coats A JS, Metra M.

**Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors as an early, first-line therapy in patients with heart failure and reduced ejection fraction.**

European Journal of Heart Failure, 24(3), 431–441. doi:10.1002/ejhf.2397

Butler J, Usman MS, Anstrom KJ, Blaustein RO, Bonaca MP, Ezekowitz JA, Zannad F.

**Soluble guanylate cyclase stimulators in patients with heart failure with reduced ejection fraction across the risk spectrum.**

European Journal of Heart Failure, 24(11), 2029–2036. doi:10.1002/ejhf.2720

Stollo F, Gentile S, Pipicelli A. M. V, Mambro A, Monici M, Magni P.

**Space flight-promoted insulin resistance as a possible disruptor of wound healing.**

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, 868999. doi:10.3389/fbioe.2022.868999

Seferović PM, Polovina M, Seferović J, Rosano G.

**Strength in synergy: Cardiometabolic effects of sacubitril/valsartan in heart failure and diabetes.**

International Journal of Cardiology, 371, 293–294. doi:10.1016/j.ijcard.2022.09.019

Marra AM, D'Assante R, Salzano A, Iacoviello M, Triggiani V, Rengo G, T.O.S.CA. Investigators.  
**Testosterone deficiency independently predicts mortality in women with HFrEF: insights from the T.O.S.CA. registry.**

ESC Heart Failure, 10(1), 159–166. doi:10.1002/ehf2.14117

Maiuolo J, Carresi C, Gliozzi M, Mollace R, Scarano F, Scicchitano M, Mollace V.

**The contribution of gut Microbiota and endothelial dysfunction in the development of arterial hypertension in animal models and in humans.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(7), 3698. doi:10.3390/ijms23073698



Gentile S, Guarino G, Della Corte T, Marino G, Satta E, Pasquarella M, Nefrocenter and Nyx Start-up, AMDOSDI Study Group on Injection Techniques, and ANIAD.

**The economic burden of insulin injection-induced lipohypertrophy. Role of education: The ISTERP-3 study.**

Advances in Therapy, 39(5), 2192–2207. doi:10.1007/s12325-022-02105-5

Lombardo M, Feraco A, Ottaviani M, Rizzo G, Camajani E, Caprio M, Armani, A.

**The efficacy of vitamin D supplementation in the treatment of fibromyalgia syndrome and chronic musculoskeletal pain.**

Nutrients, 14(15), 3010. doi:10.3390/nu14153010

Voors AA, Angermann CE, Teerlink JR, Collins SP, Kosiborod M, Biegus J, Ponikowski P.

**The SGLT2 inhibitor empagliflozin in patients hospitalized for acute heart failure: a multinational randomized trial.**

Nature Medicine, 28(3), 568–574. doi:10.1038/s41591-021-01659-1

Cowie MR, Mourilhe-Rocha R, Chang HY, Volterrani M, Ban HN, Campos de Albuquerque, D, OPTIMIZE Heart Failure Care program coordinators.

**The impact of the COVID-19 pandemic on heart failure management: Global experience of the OPTIMIZE Heart Failure Care network.**

International Journal of Cardiology, 363, 240–246. doi:10.1016/j.ijcard.2022.06.022

Rizzo G, Feraco A, Storz MA, Lombardo M.

**The role of soy and soy isoflavones on women's fertility and related outcomes: an update.**

Journal of Nutritional Science, 11(e17), e17. doi:10.1017/jns.2022.15

Rosano GMC, Metra M, Volterrani M.

**The strategic vision of the 2022-2024 mandate - greater involvement of members, young specialists for an HFA community without borders.**

European Journal of Heart Failure, 24(9), 1458–1459. doi:10.1002/ejhf.2702

Lindberg F, Lund LH, Benson L, Dahlström U, Karlström P, Linde C, Savarese G.

**Trajectories in New York Heart Association functional class in heart failure across the ejection fraction spectrum: data from the Swedish Heart Failure Registry.**

European Journal of Heart Failure, 24(11), 2093–2104. doi:10.1002/ejhf.2644

Camajani E, Feraco A, Basciani S, Gnessi L, Barrea L, Armani A, Caprio, M.

**VLCKD in combination with physical exercise preserves skeletal muscle mass in sarcopenic obesity after severe COVID-19 disease: A case report.**

Healthcare (Basel, Switzerland), 10(3), 573. doi:10.3390/healthcare10030573

Camajani E, Feraco A, Proietti S, Basciani S, Barrea L, Armani A, Caprio, M.

**Corrigendum: Very low calorie ketogenic diet combined with physical interval training for preserving muscle mass during weight loss in sarcopenic obesity: A pilot study.**

Frontiers in Nutrition, 9, 1076667. doi:10.3389/fnut.2022.1076667

Camajani E, Persichetti A, Watanabe M, Contini S, Vari M, Di Bernardo S, Basciani, S.

**Whey protein, L-leucine and vitamin D supplementation for preserving lean mass during a low-calorie diet in sarcopenic obese women.**

Nutrients, 14(9), 1884. doi:10.3390/nu14091884

Gentile S, Guarino G, Della Corte T, Marino G, Satta E, Pasquarella M, Nefrocenter, Nyx Start-up, AMD-OSDI Study Group on Injection Techniques, ANIAD.

**Why do so many people with type 2 diabetes who take insulin have lipohypertrophy? Fate or educational deficiencies?**

Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders, 14(1), 179–191. doi:10.1007/s13300-022-01341-w

Metra M, Tomasoni D, Adamo M, Bayes-Genis A, Filippatos G, Abdelhamid M, Rosano G.  
**Worsening of chronic heart failure: definition, epidemiology, management and prevention. A clinical consensus statement by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

European Journal of Heart Failure, 25(6), 776–791. doi:10.1002/ejhf.2874

Ornello R, Baraldi C, Guerzoni S, Lambru G, Andreou AP, Raffaelli B, Sacco, S.

**Comparing the relative and absolute effect of erenumab: is a 50% response enough? Results from the ESTEEMen study.**

The Journal of Headache and Pain, 23(1), 38. doi:10.1186/s10194-022-01408-w

Piccardi L, Palmiero M, Cofini V, Verde P, Boccia M, Palermo L, Nori R .

**‘Where am I?’ A snapshot of the developmental topographical disorientation among young Italian adults.**

PloS One, 17(7), e0271334. doi:10.1371/journal.pone.0271334

Stocchi F, Peckham EL, De Pandis MF, Sciarappa K, Kleiman R, Agbo F, Navia B.

**A randomized thorough QT study of apomorphine sublingual film in patients with Parkinson’s disease.**

Clinical Pharmacology in Drug Development, 11(9), 1068–1077. doi:10.1002/cpdd.1147

Mariani L, Cilfone A, Nicastrì M, Pipitone LL, Stella F, de Vincentiis M, Ruoppolo, G. (2022).  
**Accuracy of Dysphagia Standard Assessment (DSA®) bedside screening test: a flowchart for patient eligibility.**

Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 43(9), 5411–5419. doi:10.1007/s10072-022-06175-9

Babiloni C, Noce G, Di Bonaventura C, Lizio R, Eldellaa A, Tucci F, Del Percio C.

**Alzheimer’s disease with epileptiform EEG activity: Abnormal cortical sources of resting state delta rhythms in patients with amnesic mild cognitive impairment.**

Journal of Alzheimer’s Disease: JAD, 88(3), 903–931. doi:10.3233/JAD-220442

Bini C, Mennini FS, Marcellusi A, Paoletti M, Tomino C. 91-98 10.33393/grhta.2022.2413

**Ita journal article analisi di impatto di budget di un nuovo sistema di cura in pazienti affetti da malattia di Parkinson.**

Global & Regional Health Technology Assessment Italian Northern Europe and Spanish, 9, 91–98.  
doi:10.33393/grhta.2022.2413

Ferrario C, Condoluci C, Tarabini M, Galli M.

**Corrigendum to ‘Energy analysis of gait in patients with down syndrome’ [Heliyon 8 (11) (November 2022) Article e11702].**

Heliyon, 9(4), e14382. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14382

Mostile G, Geroin C, Erro R, Luca A, Marcuzzo E, Barone P, Tinazzi M

**Data-driven clustering of combined Functional Motor Disorders based on the Italian registry.**

Frontiers in Neurology, 13, 987593. doi:10.3389/fneur.2022.987593

Di Vita A, Vecchione F, Boccia M, Bocchi A, Cinelli MC, Mirino P, Guariglia C.

**DiaNe: A new first-level computerized tool assessing memory, attention, and visuospatial processing to detect early pathological cognitive decline.**

Journal of Alzheimer’s Disease: JAD, 86(2), 891–904. doi:10.3233/JAD-215294

Kantor D, Farlow M, Ludolph A, Montaner J, Sankar R, Sawyer RN, Jr Hadjiat, Y.

**Digital scientific platform for independent content in neurology: Rigorous quality guideline development and implementation.**

Interactive Journal of Medical Research, 11(1), e35698. doi:10.2196/35698

Giancola M, Palmiero M, Bocchi A, Piccardi L, Nori R, D’Amico, S.

**Divergent thinking in Italian elementary school children: the key role of probabilistic reasoning style.**

Cognitive Processing, 23(4), 637–645. doi:10.1007/s10339-022-01104-2

Ercoli T, Tinazzi M, Geroin C, Marcuzzo E, Erro R, Cuoco S, Defazio G.

**Do demographic and clinical features and comorbidities affect the risk of spread to an additional body site in functional motor disorders?**

Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria), 129(10), 1271–1276. doi:10.1007/s00702-022-02537-x

Ferreira JJ, Poewe W, Rascol O, Stocchi F, Antonini A, Moreira J, Soares-da-Silva, P.

**Effect of opicapone on levodopa pharmacokinetics in patients with fluctuating Parkinson’s disease.**

Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society, 37(11), 2272–2283.  
doi:10.1002/mds.29193

Padovani A, Antonini A, Barone P, Bellelli G, Fagiolini A, Ferini Strambi L, Stocchi, F.

**Exploring depression in Alzheimer’s disease: an Italian Delphi Consensus on phenomenology, diagnosis, and management.**

Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology. doi:10.1007/s10072-023-06891-w

Isaacson SH, Bowling A, Zhang I, Pappert E, Stocchi F, CTH-300 and CTH-301 Study Investigators. **Motor response with apomorphine sublingual film and levodopa in patients with OFF episodes.** *Neurodegenerative Disease Management*, 13(2), 75–84. doi:10.2217/nmt-2022-0038

Ferreira JJ, Poewe W, Rascol O, Stocchi F, Antonini A, Moreira J, Soares-da-Silva, P. **Opicapone as an add-on to levodopa in patients with Parkinson's disease without motor fluctuations: Rationale and design of the phase III, double-blind, randomised, placebo-controlled EPSILON trial.** *Neurology and Therapy*, 11(3), 1409–1425. doi:10.1007/s40120-022-00371-7

Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Lopez S, Pennica A, Roma P, Noce G. **Parietal intrahemispheric source connectivity of resting-state electroencephalographic alpha rhythms is abnormal in Naïve HIV patients.** *Brain Research Bulletin*, 181, 129–143. doi:10.1016/j.brainresbull.2022.01.015

Babiloni C, Lorenzo I, Lizio R, Lopez S, Tucci F, Ferri R, Noce G. **Reactivity of posterior cortical electroencephalographic alpha rhythms during eyes opening in cognitively intact older adults and patients with dementia due to Alzheimer's and Lewy body diseases.** *Neurobiology of Aging*, 115, 88–108. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2022.04.001

Stocchi F, Antonini A, Berg D, Bergmans B, Jost W, Katzenschlager R, Ray Chaudhuri, K. **Safinamide in the treatment pathway of Parkinson's Disease: a European Delphi Consensus.** *NPJ Parkinson's Disease*, 8(1), 17. doi:10.1038/s41531-022-00277-z

Nicastri M, Giallini I, Inguscio BMS, Turchetta R, Guerzoni L, Cuda D, Mancini P. **The influence of auditory selective attention on linguistic outcomes in deaf and hard of hearing children with cochlear implants. European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology** *Head and Neck Surgery*, 280(1), 115–124. doi:10.1007/s00405-022-07463-y

LeWitt PA, Stocchi F, Arkadir D, Caraco Y, Adar L, Perlstein I, Giladi N. **The pharmacokinetics of continuous subcutaneous levodopa/carbidopa infusion: Findings from the ND0612 clinical development program.** *Frontiers in Neurology*, 13, 1036068. doi:10.3389/fneur.2022.1036068

Rocha J-F, Ebersbach G, Lees A, Tolosa E, Ferreira JJ, Poewe W, Soares-da-Silva, P. **The safety/tolerability of opicapone when used early in Parkinson's disease patients with levodopa-induced motor fluctuations: A post-hoc analysis of BIPARK-I and II.** *Frontiers in Neurology*, 13, 994114. doi:10.3389/fneur.2022.994114

Yener G, Hünenli-Gündüz D, Yıldırım E, Aktürk T, Başar-Eroğlu C., Bonanni L., Babiloni C. **Treatment effects on event-related EEG potentials and oscillations in Alzheimer's disease.** *International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 177, 179–201. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.05.008

Lang AE, Siderowf AD, Macklin EA, Poewe W, Brooks DJ, Fernandez HH, SPARK Investigators.

**Trial of cinpanemab in early Parkinson's disease.**

The New England Journal of Medicine, 387(5), 408–420. doi:10.1056/NEJMoa2203395

Pagano G, Taylor KI, Anzures-Cabrera J, Marchesi M, Simuni T, Marek K, Prasinezumab Study Group.

**Trial of prasinezumab in early-stage Parkinson's disease.**

The New England Journal of Medicine, 387(5), 421–432. doi:10.1056/NEJMoa2202867

D'Antonio F, Boccia M, Di Vita A, Suppa A, Fabbrini A, Canevelli M, Ffytche D.

**Visual hallucinations in Lewy body disease: pathophysiological insights from phenomenology.**

Journal of Neurology, 269(7), 3636–3652. doi:10.1007/s00415-022-10983-6

Del Percio C, Noce G, Lopez S, Tucci F, Carlin G, Lizio R, Babiloni C.

**What a single electroencephalographic (EEG) channel can tell us about patients with dementia due to Alzheimer's disease.**

International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology, 182, 169–181. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.10.011

Forni R, Jacot E, Ruoppolo G, Amitrano A, Ognà A.

**Resuming swallowing and oral feeding in tracheostomized COVID-19 patients: Experience of a Swiss COVID-Center and narrative literature review.**

Medical Sciences (Basel, Switzerland), 10(4). doi:10.3390/medsci10040057

Gourdeau D, Potvin O, Archambault P, Chartrand-Lefebvre C, Dieumegarde L, Forghani R, Duchesne S.

**Tracking and predicting COVID-19 radiological trajectory on chest X-rays using deep learning.**

Scientific Reports, 12(1), 5616. doi:10.1038/s41598-022-09356-w

De Marchis M, Cioeta M, Cannataro M.

**'what are the applications for remote rehabilitation management in cystic fibrosis?': A scoping review protocol.**

International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(21), 14014. doi:10.3390/ijerph192114014

Valle G, Iberite F, Strauss I, D'Anna E, Granata G, Di Iorio R, Micera S.

**A psychometric platform to collect somatosensory sensations for neuroprosthetic use.**

Frontiers in Medical Technology, 3, 619280. doi:10.3389/fmedt.2021.619280

Rodrigues IM, Lima AG, Santos AED, Santos ACA, Nascimento LS, Serra MVCL, Zanona A, de F.

**A single session of virtual reality improved tiredness, shortness of breath, anxiety, depression and well-being in hospitalized individuals with COVID-19: A randomized clinical trial.**

Journal of Personalized Medicine, 12(5), 829. doi:10.3390/jpm12050829

Rossini PM, Miraglia F, Vecchio F.

**Review of Commentary on comparison of machine learning-based approaches to predict the conversion to Alzheimer's disease from mild cognitive impairment.**

Neuroscience, 514, 141–142. doi:10.1016/j.neuroscience.2022.12.018

Paolucci T, de Sire A, Agostini F, Bernetti A, Salomè A, Altieri M, Paoloni, M.

**Efficacy of interoceptive and embodied rehabilitative training protocol in patients with mild multiple sclerosis: A randomized controlled trial.**

Frontiers in Neurology, 13, 1095180. doi:10.3389/fneur.2022.1095180

Ferrario C, Condoluci C, Tarabini M, Galli M.

**Energy analysis of gait in patients with down syndrome.**

Heliyon, 8(11), e11702. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11702

Antal A, Lubner B, Brem A-K, Bikson M, Brunoni AR, Cohen Kadosh R, Paulus W.

**Non-invasive brain stimulation and neuroenhancement.**

Clinical Neurophysiology Practice, 7, 146–165. doi:10.1016/j.cnp.2022.05.002

Geri T, Botticchio A, Rossettini G, Pournajaf S, Pellicciari L, Di Antonio S, Castaldo M.

**Pressure pain threshold of the upper trapezius trigger point: a systematic review with meta-analysis of baseline values and their modification after physical therapy.**

Journal of Clinical Medicine, 11(23), 7243. doi:10.3390/jcm11237243

Angilecchia D, Stano F, Signorelli M, Giovannico G, Pournajaf S, Pellicciari L.

**Psychometric properties of the Italian version of the Forgotten Joint Score in patients with total hip arthroplasty.**

International Journal of Rehabilitation Research. Internationale Zeitschrift Für Rehabilitationsforschung. Revue Internationale de Recherches de Readaptation, 45(4), 343–349. doi:10.1097/MRR.0000000000000549

Frölich L, van der Flier WM, Gustavsson A, Rossini PM, Holzapfel D.

**Response to the letter titled ‘The conundrum of the AD continuum’.**

Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association, 19(1), 373–374. doi:10.1002/alz.12784

Franceschini M, Ottaviani M, Romano P, Goffredo M, Pournajaf S, Lofrumento M, Infarinato F.

**The reaching phase of feeding and self-care actions optimizes action observation effects in chronic stroke subjects.**

Neurorehabilitation and Neural Repair, 36(9), 574–586. doi:10.1177/15459683221110884

Ercoli T, Barbato F, Cuffaro L, Iodice F, Romoli M, Tedeschi G, SigN.

**The future of neurology after the COVID-19 pandemic according to neurology residents.**

Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 44(1), 9–12. doi:10.1007/s10072-022-06450-9

Pournajaf S, Goffredo M, Pellicciari L, Piscitelli D, Criscuolo S, Le Pera D, Franceschini, M.

**Effect of balance training using virtual reality-based serious games in individuals with total knee replacement: A randomized controlled trial.**

Annals of Physical and Rehabilitation Medicine, 65(6), 101609. doi:10.1016/j.rehab.2021.101609

- Xu J, Schoenfeld MA, Rossini PM, Tatlisumak T, Nürnberger A, Antal A, Sabel BA.  
**Adaptive and maladaptive brain functional network reorganization after stroke in hemianopia patients: An electroencephalogram-tracking study.**  
Brain Connectivity, 12(8), 725–739. doi:10.1089/brain.2021.0145
- Pappalettera C, Miraglia F, Cotelli M, Rossini PM, Vecchio F.  
**Analysis of complexity in the EEG activity of Parkinson’s disease patients by means of approximate entropy.**  
GeroScience, 44(3), 1599–1607. doi:10.1007/s11357-022-00552-0
- Pappalettera C, Cacciotti A, Nucci L, Miraglia F, Rossini PM, Vecchio, F.  
**Approximate entropy analysis across electroencephalographic rhythmic frequency bands during physiological aging of human brain.**  
GeroScience, 45(2), 1131–1145. doi:10.1007/s11357-022-00710-4
- Abellaneda-Pérez K, Martin-Trias P, Cassé-Perrot C, Vaqué-Alcázar L, Lanteaume L, Solana E, Bartrés-Faz, D.  
**BDNF Val66Met gene polymorphism modulates brain activity following rTMS-induced memory impairment.**  
Scientific Reports, 12(1), 176. doi:10.1038/s41598-021-04175-x
- Miraglia F, Vecchio F, Pappalettera C, Nucci L, Cotelli M, Judica E, Rossini PM.  
**Brain connectivity and graph theory analysis in Alzheimer’s and Parkinson’s disease: The contribution of electrophysiological techniques.**  
Brain Sciences, 12(3), 402. doi:10.3390/brainsci12030402
- Costa C, Vecchio F, Romoli M, Miraglia F, Nardi Cesarini E, Alù F, Rossini PM.  
**Cognitive decline risk stratification in people with late-onset epilepsy of unknown etiology: An electroencephalographic connectivity and graph theory pilot study.**  
Journal of Alzheimer’s Disease: JAD, 88(3), 893–901. doi:10.3233/JAD-210350
- Vecchio, F. (2022).  
**Cognitive training and neuromodulation for Alzheimer treatment.**  
Aging, 14(9), 3722–3723. doi:10.18632/aging.204044
- Porcaro C, Vecchio F, Miraglia F, Zito G, & Rossini PM.  
**Dynamics of the ‘cognitive’ brain wave P3b at rest for Alzheimer dementia prediction in mild cognitive impairment.**  
International Journal of Neural Systems, 32(5), 2250022. doi:10.1142/S0129065722500228
- Rossini PM, Miraglia F, Vecchio F.  
**Early dementia diagnosis, MCI-to-dementia risk prediction, and the role of machine learning methods for feature extraction from integrated biomarkers, in particular for EEG signal analysis.**  
Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association, 18(12), 2699–2706. doi:10.1002/alz.12645
- Ferreri F, Miraglia F, Vecchio F, Manzo N, Cotelli M, Judica E, Rossini PM.

**Electroencephalographic hallmarks of Alzheimer's disease.**

International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology, 181, 85–94. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.08.005

Gustavsson A, Norton N, Fast T, Frölich L, Georges J, Holzapfel D, van der Flier WM.

**Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum.**

Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 19(2), 658–670. doi:10.1002/alz.12694

Vecchio F, Miraglia F, Alù F, Judica E, Cotelli M, Pellicciari MC, Rossini PM.

**Human brain networks in physiological and pathological aging: Reproducibility of electroencephalogram graph theoretical analysis in cortical connectivity.**

Brain Connectivity, 12(1), 41–51. doi:10.1089/brain.2020.0824

Vecchio F, Quaranta D, Miraglia F, Pappalettera C, Di Iorio R, L'Abbate F, Rossini PM.

**Neuronavigated Magnetic Stimulation combined with cognitive training for Alzheimer's patients: an EEG graph study.**

GeroScience, 44(1), 159–172. doi:10.1007/s11357-021-00508-w

Di Iorio R, Rossi S, Rossini PM.

**One century of healing currents into the brain from the scalp: From electroconvulsive therapy to repetitive transcranial magnetic stimulation for neuropsychiatric disorders.**

Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology, 133, 145–151. doi:10.1016/j.clinph.2021.10.014

Vecchio F, Alù F, Orticoni A, Miraglia F, Judica E, Cotelli M, Rossini PM.

**Performance prediction in a visuo-motor task: the contribution of EEG analysis.**

Cognitive Neurodynamics, 16(2), 297–308. doi:10.1007/s11571-021-09713-x

Menardi A, Rossi S, Koch G, Hampel H, Vergallo A, Nitsche MA, Santarnecchi E.

**Toward noninvasive brain stimulation 2.0 in Alzheimer's disease.**

Ageing Research Reviews, 75(101555), 101555. doi:10.1016/j.arr.2021.101555

Longo V, Barbati SA, Re A, Paciello F, Bolla M, Rinaudo M, Grassi C.

**Transcranial direct current stimulation enhances neuroplasticity and accelerates motor recovery in a stroke mouse model.**

Stroke; a Journal of Cerebral Circulation, 53(5), 1746–1758. doi:10.1161/STROKEAHA.121.034200

Altamura C, Brunelli N, Marcosano M, Aurilia C, Egeo G, Lovati C, GARLIT Study Group.

**Conversion from chronic to episodic migraine in patients treated with galcanezumab in real life in Italy: the 12-month observational, longitudinal, cohort multicenter GARLIT experience.**

Journal of Neurology, 269(11), 5848–5857. doi:10.1007/s00415-022-11226-4

Barbanti P, Goadsby PJ, Lambru G, Ettrup A, Christoffersen CL, Josiassen MK, Sperling B.

**Effects of eptinezumab on self-reported work productivity in adults with migraine and prior preventive treatment failure in the randomized, double-blind, placebo-controlled DELIVER study.**



The Journal of Headache and Pain, 23(1), 153. doi:10.1186/s10194-022-01521-w

Goadsby PJ, Barbanti P, Lambru G, Ettrup A, Christoffersen CL, Josiassen MK, Sperling B. **Eptinezumab improved patient-reported outcomes and quality of life in patients with migraine and prior preventive treatment failures.**

European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies, 30(4), 1089–1098. doi:10.1111/ene.15670

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, d’Onofrio F, Albanese M, Cetta I, FRIEND-Study Group. **Fremanezumab in the prevention of high-frequency episodic and chronic migraine: a 12-week, multicenter, real-life, cohort study (the FRIEND study).**

The Journal of Headache and Pain, 23(1), 46. doi:10.1186/s10194-022-01396-x

Fofi L, Altamura C, Fiorentini G, Brunelli N, Marcosano M, Barbanti P, Vernieri F.

**Improving distress perception and mutuality in migraine caregivers after 6 months of galcanezumab treatment.**

Headache, 62(9), 1143–1147. doi:10.1111/head.14400

Vernieri F, Brunelli N, Marcosano M, Aurilia C, Egeo G, Lovati C. GARLIT Study Group.

**Maintenance of response and predictive factors of 1-year GalcanezumAb treatment in real-life migraine patients in Italy: The multicenter prospective cohort GARLIT study.**

European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies, 30(1), 224–234. doi:10.1111/ene.15563

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Altamura C, d’Onofrio F, Finocchi C, Italian Migraine Registry study group.

**Predictors of response to anti-CGRP monoclonal antibodies: a 24-week, multicenter, prospective study on 864 migraine patients.**

The Journal of Headache and Pain, 23(1), 138. doi:10.1186/s10194-022-01498-6

Vernieri F, Altamura C, Brunelli N, Costa CM, Aurilia C, Egeo G, GARLIT Study Group.

**Rapid response to galcanezumab and predictive factors in chronic migraine patients: A 3-month observational, longitudinal, cohort, multicenter, Italian real-life study.**

European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies, 29(4), 1198–1208. doi:10.1111/ene.15197

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Fiorentini G, Proietti S, Tomino C, Italian Migraine Registry Study Group.

**The first report of the Italian Migraine Registry (I-GRAINE).**

Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 43(9), 5725–5728. doi:10.1007/s10072-022-06214-5

Altamura C, Cevoli S, Brunelli N, Aurilia C, Fofi L, Egeo G, GARLIT Study Group collaborators.

**When should we consider chronic patients as non-responders to monoclonal antibodies targeting the CGRP pathway?**

Journal of Neurology, 269(2), 1032–1034. doi:10.1007/s00415-021-10772-7

Spina E, Tedeschi G, Russo A, Trojsi F, Iodice R, Tozza S, Digital Technologies Web and Social Media Study Group of the Italian Society of Neurology (SIN).

**Telemedicine application to headache: a critical review.**

Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology, 43(6), 3795–3801. doi:10.1007/s10072-022-05910-6

Goffredo M, Proietti S, Pournajaf S, Galafate D, Cioeta M, Le Pera D, Franceschini M.

**Baseline robot-measured kinematic metrics predict discharge rehabilitation outcomes in individuals with subacute stroke.**

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, 1012544. doi:10.3389/fbioe.2022.1012544

Aprile I, Conte C, Cruciani A, Pecchioli C, Castelli L, Insalaco S, Iacovelli C.

**Efficacy of robot-assisted gait training combined with robotic balance training in subacute stroke patients: A randomized clinical trial.**

Journal of Clinical Medicine, 11(17), 5162. doi:10.3390/jcm11175162

Goffredo M, Romano P, Infarinato F, Cioeta M, Franceschini M, Galafate D, Ottaviani M.

**Kinematic analysis of exoskeleton-assisted community ambulation: An observational study in outdoor real-life scenarios.**

Sensors (Basel, Switzerland), 22(12). doi:10.3390/s22124533

Iorio A, Lombardi CM, Specchia C, Merlo M, Nuzzi V, Ferraro I, Metra M.

**Combined role of troponin and natriuretic peptides measurements in patients with covid-19 (from the cardio-COVID-Italy multicenter study).**

The American Journal of Cardiology, 167, 125–132. doi:10.1016/j.amjcard.2021.11.054

Vezzoli M, Inciardi RM, Oriecuia C, Paris S, Murillo NH, Agostoni P, Specchia C.

**Machine learning for prediction of in-hospital mortality in coronavirus disease 2019 patients: results from an Italian multicenter study.**

Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.), 23(7), 439–446. doi:10.2459/JCM.0000000000001329

Lombardi CM, Specchia C, Conforti F, Rovere MTL, Carubelli V, Agostoni P, Metra M.

**Sex-related differences in patients with coronavirus disease 2019: results of the Cardio-COVID-Italy multicentre study.**

Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.), 23(4), 254–263. doi:10.2459/JCM.0000000000001261

## PARTECIPAZIONI A EVENTI SCIENTIFICI

Barbanti P.

### **La tossina botulinica e gli anticorpi monoclonali come strategie terapeutiche nel paziente cefalalgico.**

Convegno "Cefalea ed epilessia: due facce della stessa medaglia?"

Azienda Ospedaliera Universitaria, Policlinico Tor Vergata Roma, Roma, Febbraio 2022

Barbanti P.

### **Il registro italiano dell'emicrania**

Senato della Repubblica Italiana, Aula Caduti di Nassyria, Roma, Febbraio 2022

Barbanti P.

### **Emicrania: gold standard terapeutico ed analisi cost effective dell'innovazione**

Progetto Emicrania 2022

Motore Sanità, Roma, Hotel Capranica, Marzo 2023

Barbanti P.

### **Emicrania**

5° Workshop «La contraccizione dalla teoria alla pratica»

Centro Congressi Auditorium Aurelia; Roma, Aprile 2022

Barbanti P.

### **Functional neuroimaging in Migraine. Are we close to a biomarker?**

Convegno "How to achieve the best outcomes for your patients. Moving forward in Migraine and Multiple Sclerosis".

Athene, Maggio 2023

Barbanti P.

### **Nuovi scenari terapeutici nella gestione dell'emicrania: uso di tossina botulinica e anticorpi monoclonali**

Convegno "Nuove frontiere nella gestione del dolore".

Cagliari, Maggio 2022

Barbanti P.

### **Classificazione dell'emicrania e delle cefalee**

Convegno "Cefalea: what's new?"

Ospedale Madonna del Soccorso, San Benedetto del Tronto, Maggio 2022

Barbanti P.

### **Alimentazione e cefalee, tra scienza e mito.**

Incontri clinico-radiologici di Neuroscienze «Michela Bonamini», XII edizione.

Ponza, maggio 2022

Barbanti P.

**Symptoms of Increased Peripheral and Central Trigeminal Sensitization Predict the Response to antiCGRP Monoclonal Antibodies: A Multicenter, 24-Week, Cohort Study on 864 Migraine Patients**

64th Annual Scientific Meeting of the American Headache Society.  
Denver, Giugno 2022

Barbanti P.

**Late response to anti-CGRP monoclonal antibodies occurs in one-third of migraine patients**

*64th Annual Scientific Meeting of the American Headache Society.*

Denver, Giugno 2022

Barbanti P.

**Cefalee: le scoperte dei tanti meccanismi patogenetici e le possibili cure.**

Head Talks 2022. Presente e Futuro della Medicina.

Roma, giugno 2022

Barbanti P.

**Real-Life: quale terapia per quale paziente. Predictors e target therapy**

Il Franciacorta Headache 2022.

Iseo (BS), 16 settembre 2022

Barbanti P.

**Il registro I-GRAINE: l'efficacia di fremanezumab nella pratica clinica**

XI Congresso Nazionale ANIRCEF

Roma, Settembre 2022

Barbanti P.

**Il Registro Nazionale dell'Emicrania**

XI Congresso Nazionale ANIRCEF

Roma, Settembre 2022

Barbanti P.

**Monoclonali nell'emicrania. Cosa sapevamo e cosa abbiamo imparato**

XIV Congresso Nazionale AINAT. La neurologia del territorio ai confini della pandemia: le nuove sfide.

Bologna, Ottobre 2022

Barbanti P.

**Are there any predictors of response to migraine treatment?**

The 6<sup>th</sup> Annual International Headache Symposium in Israel

Herzlyia, Israele, October, 2022.

Barbanti P.

**L'importanza di conoscere i pazienti: il registro**

Ritorno al futuro. LXI Congresso Nazionale SNO

Riva del Garda, Novembre 2022

Barbanti P.

### **La terapia con anticorpi monoclonali anti-CGRP**

Convegno regionale ligure AINAT-ANIRCEF. Liguria cefalee: nuove terapie e territorio  
Genova, Novembre 2022

Aurilia C.

### **Late response to anti-CGRP monoclonal antibodies occurs implication for clinical practice**

8th Congress of the European Academy of Neurology, 28 June, Vienna 2022

Aurilia C.

### **Late response (>12 weeks) to anti-CGRP (calcitonine gene-related peptide) monoclonal antibodies may occur in one third migraine patients: implication for clinical practise.**

Anircef Congresso Re-immaginare le cefalee: il paziente tra neuroscienze e sanità pubblica , Roma, Settembre 2022

Egeo G.

### **Esistono predittori di risposta?**

Anircef Congresso Re-immaginare le cefalee: il paziente tra neuroscienze e sanità pubblica, Roma, Settembre 2022

Egeo G.

### **Cefalee dell'anziano**

Corso ASC, Febbraio 2022

Fiorentini G.

### **L'importanza di un Registro dell'emicrania e Primi dati del Registro Nazionale**

Itinerari SNO, Saronno, Giugno 2022

Caprio M.

### **Lettura Magistrale: Alimentazione e Cancro**

V Congresso Nazionale Club SIE – Endocrinologia oncologica , Siracusa, 30 Giugno -2 Luglio 2022

Caprio M.

### **Obesità tra inquinamento ambientale e Interferenti Endocrini**

42° Giornata Mondiale dell'alimentazione, Formia, Ottobre 2022

Caprio M.

### **Ripristinare la fertilità naturale**

37° Congresso di Medicina della Riproduzione, Abano Terme, Ottobre 2022

Caprio M.

Miglioramento dei parametri clinici prima della chirurgia bariatrica

30° Congresso Nazionale, Cagliari, Giugno 2022

Caprio M.

### **Dieta Chetogenica e Osso**

Ketolearning 2022, Roma, Ottobre 2022

Caprio M.

**Metabolismo Muscolare e Terapia chetogenica di precisione**

18° Congresso Nazionale SIO GISMO, Baveno, Ottobre 2022

Caprio M.

**La terapia chetogenica di precisione: razionale ed utilizzo**

XI congresso nazionale Brain and malnutrition, Milano, Maggio 2022

Caprio M.

**L'effetto metabolico della VLCKD nel paziente con obesità**

Ionet Italian Obesity Network, Roma, Novembre 2022

Caprio M.

**5 Terapia Chetogenica di precisione: una per tutte le patologie andrologiche?**

SIAMomicS , Roma, Dicembre 2022

Caprio M.

**Approcci dietetici che impattano sull'invecchiamento**

UPO Aging project, Novara, Settembre 2022

Caprio M.

**La dieta chetogenica**

43° congresso Società Italiana di Medicina Estetica SIME, Roma, Maggio 2022

Caprio M.

**Simposio Ketogenic Diet**

Endo 2022, Atlanta, Georgia, Giugno 2022

Caprio M.

**Terapia Chetogenica di precisione: le diverse opportunità cliniche**

Obesità Work in progress SIO, Baveno, Ottobre 2022

Caprio M.

**Incontri italiani di endocrinologia e metabolismo**

IIEM SIE, Napoli, Settembre 2022

Caprio M.

**Obesity and Sarcopenia: What's New**

SINSEB, Bologna, Giugno 2022

Caprio M.

**Moderatore Sessione Obesità e Sindrome Metabolica**

24° corso post- specialistico di Endocrinologia – Vietri sul Mare, Novembre 2022

Feraco A.

**Exploring the role of skeletal muscle Mineralocorticoid Receptor in glucose metabolism and insulin signaling**

ECE 2022, Milano, Maggio 2022

Feraco A, Camajani E, Basciani S, Caprio M

**Poster: Very Low Calorie Ketogenic Diet combined with interval training for preserving muscle mass during weight loss in sarcopenic obesity: a pilot study**

ENDO 2022, Atlanta, Georgia, Giugno 2022

Feraco A.

**Dieta chetogenica e diabete**

Ketolearning 2022, Roma, Giugno 2022

Feraco A, Armani A, Gorini G, Caprio M

**Poster: Contribution of skeletal muscle Mineralocorticoid Receptor to insulin signaling regulation**

RRSH, Parigi, Settembre 2022

Franceschini M.

**La Robotica e la Riabilitazione nelle disabilità di origine neurologica**

IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna, Bologna, Maggio 2022

Franceschini M.

**Teleriabilitazione motoria, logopedica e cognitiva in persone con patologie neurodegenerative**

Corso SIMFER, Roma, Gennaio 2022

M. Franceschini

**La Riabilitazione Robotica dell'Arto Superiore nello Stroke: Aspetti Clinici e Biomeccanici**

Congresso Inaugurazione "Villa Bellombra", Bologna, Settembre 2022

M. Franceschini

**Sintesi dell'evidenze per l'età evolutiva**

Conferenza Nazionale di Consenso CICERONE LA RIABILITAZIONE ASSISTITA DA ROBOT, Gennaio, 2022

M. Franceschini

**Telerehabilitation in people with Parkinson's disease: preliminary results of a randomized controlled trial**

International Congress of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM2022), Lisbona, Luglio 2022

M. Goffredo

**Virtual reality-based serious games rehabilitation improves gait kinematics in persons with total knee replacement**

International Congress of Physical and Rehabilitation Medicine (ISPRM2022), Lisbona, Luglio 2022

Franceschini M.

**Training Robotico nel cammino per la persona con Ictus Cerebrale: Update.**

Corso SIMFER, Roma, Gennaio 2022

Franceschini M.

**Sintesi dell'evidenze per l'età evolutiva**

Conferenza Nazionale di Consenso sulla Robotica in Riabilitazione "CICERONE", Gennaio 2022

M. Goffredo

**Upper limb rehabilitation robots: new approaches for monitoring and predicting post-stroke recovery**

IV Conferenza I-RIM 2022 "Robotics for rehabilitation: clinical and engineering perspectives», Pisa, Ottobre 2022

M. Cioeta

Poster: **Adattamento trans-culturale e proprietà psicometriche della versione italiana della Patient Specific Functional Scale (PSFS) in pazienti con spalla dolorosa**

International Congress AIFI 2022, Palermo, Luglio 2022

Guadagni F.

**Certificazione dei dispositivi medici e diagnostici: il regolamento europeo**

XXIV Congresso Nazionale AIOM (Associazione Italiana Oncologia Medica), Roma, Ottobre 2022

Guadagni F.

**Tavola Rotonda del Kick-Off Meeting KATY** in qualità di Coordinatore del Progetto REVERT per la discussione di temi comuni: a) condivisione di dati personali all'interno di progetti finanziati dall'UE; b) Il consenso informato nei progetti di ricerca sanitaria; c) Coinvolgimento dei partecipanti/pazienti nei progetti pilota per convalidare gli strumenti proposti.

Roma, Maggio 2022

Guadagni F.

**Electronic Health Record, un booster per la cartella clinica**

Convegno Nazionale CINI (Consorzio Interuniversitario Nazionale per l'informatica) sull'Intelligenza Artificiale, Online, Febbraio 2022

Sara I.

Poster: **Protective effects of natural polyphenols during acute inflammatory pain: the role nad+-dependent sirt1 deacetylase**

SIPHAR: Joint meeting on Natural Products Pharmacology - SIF , Napoli, Febbraio 2022

Sara I.

**SIRT1 modulation during acute inflammatory pain: the role of ROS**

15th World Congress on Inflammation (WCI2022), Roma, Giugno 2022

Sara I.

Poster: **Chronic Pain Biomarkers in Fibromyalgia and Osteoarthritis Patients: Which Role for Mu Opioid Receptor's expression on NK cells?**

41° Congresso Nazionale della SIF (Società Italiana di Farmacologia), Roma, Novembre 2022.

Malafoglia V.



Poster: **Mu-positive NK cells expression as putative biomarker for chronic pain diagnosis, in fibromyalgia and osteoarthritis patients**

4<sup>th</sup> European Congress on Clinical Trials in Pain, Vienna, Dicembre

Malafoglia V.

**I markers biologici nella diagnostica del Dolore cronico**

IV Seminario II Anno Corso Biennale ISAL "Innovazione nella pratica clinica e dolore complesso", Rimini, ottobre 2022

Prezioso C, Brazzini G, Passerini S, Di Fabio C, Cosio T, Bernardini S, Campione E, Moens U, Pietropaolo V, Ciotti M.

Poster: **Prevalence of MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV in Actinic Keratosis Biopsy Specimens.**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, Settembre 2022.

Salvemme A, Curtovic I, Passerini S, Prezioso C, Miteva MT, Protto V, De Chiara G, Mangoni ML., Pietropaolo V, Nencioni L, Palamara AT, Marcocci ME.

Poster: **Antiviral effect of bombinin H2/H4 against enveloped and naked viruses.**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, Settembre 2022.

Passerini S, Prezioso C, Prota A, Coppola L, Lodi A, Epifani AC, Sarmati L, Andreoni M, Moens U, Ciotti M, Pietropaolo V.

Poster: **Prevalence analysis of urinary and plasma JCPyV, BKPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 and QPyV in patients infected with HIV-1.**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, settembre 2022.

Prezioso C, Passerini S, Pernazza A, Di Maio V, Moens U, D'Amati G, Pietropaolo V.

Poster: **Clinical and prognostic significance of merkel cell polyomavirus (MCPyV) in non-small cell lung cancer (NSCLC).**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, settembre 2022.

Marinelli AM, Limongi D, Prezioso C, De Angelis M, Nencioni L, Palamara AT, Checconi P.

Poster: **Evaluation of redox state alterations in influenza A virus-infected neuronal cells: involvement in neurotropism.**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, settembre 2022

Prezioso C, Checconi P, Baldelli S, Marinelli AM, Pietropaolo V, Ciriolo MR, Palamara AT, Limongi D.

Poster: **Characterization of Human Polyomavirus JC (JCPyV) infection in Human Neuroblastoma SHSY5Y cells and evaluation of redox state during viral replication**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli 18-21 settembre 2022.

Passerini S, Prezioso C, Prota A, Bartolini D, Antonelli M, Moens U, Pietropaolo V.

Poster: **Detection of human Polyomavirus JC in pediatric gliomas.**

International Symposium on NeuroVirology Virtual • October 11-14, 2022

Lisa Peruzza, Maysan Sarshar, Francesco Strati, Carlo Zagaglia, Fabio Grassi. Mauro Nicoletti; Anna Teresa Palamara; Cecilia Ambrosi e Daniela Scribano

Poster: **The *Shigella flexneri* virulence factor apyrase is released inside eukaryotic cells to manipulate host cell fate**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, Settembre 2022.

Meysam Sarshar Cecilia Ambrosi Daniela Scribano Francesca Ferretti Anna Teresa, Palamara Andrea Masotti.

Poster: **Fecal-associated Enterobacteriaceae isolates from Celiac disease patients: could dietary sugars drive changes in bacterial composition**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, settembre 2022

Daniela Scribano, Meysam Sarshar, Carlo Zagaglia, Anna Teresa Palamara, Cecilia Ambrosi

Poster: **The protein HslJ boosts *Acinetobacter baumannii* survival against oxidative stress.**

50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, settembre 2022.

Ambrosi C.

***Acinetobacter baumannii* exploits carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules for host cellular adhesion and invasion" al simposio internazionale**

30th CEA Symposium", Essen, Germania, settembre 2022

Guadalupi L.

**Modulation of synaptic plasticity by physical exercise**

XXX AINI CONGRESS, Riccione, Maggio 2022,

Guadalupi L.

**Effects of MAGL inhibition on striatal neuroinflammation and synaptic dysfunction in experimental multiple sclerosis**

Brayn Conference, 5th Brainstorming Research Assembly For Young Neuroscientists, Roma, Ottobre 2022,

Guadalupi L.

**Beneficial effects of interleukin-9 on experimental multiple sclerosis**

II Annual Meeting Rin - Rete degli IRCCS delle Neuroscienze e della Neuroriabilitazione. Dicembre 2022

Fresegna D.

**Specialized pro-resolving lipid mediator neuroprotectin D1 attenuates motor disability by reducing synaptotoxic alterations in experimental autoimmune encephalomyelitis**

Brayn Conference, 5th Brainstorming Research Assembly For Young Neuroscientists, Roma, Ottobre 2022

Sanna K

Poster: **Effects of interleukin-9 on striatal synaptic dysfunction in a mouse model of multiple sclerosis**

Brayn Conference, 5th Brainstorming Research Assembly For Young Neuroscientists, Roma, Ottobre 2022

Gentile A.

Poster: **Preventive exercise counteracts glutamatergic transmission defects in the striatum of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis.**

Congresso Internazionale FENS (Federation of European Neuroscience Societies), Parigi, Luglio 2022 .

Condoluci C.

**Il primo approccio tra diagnosi-informazione-riabilitazione**, La rete delle Malattie Rare: Esperienze a Confronto” IRCCS San Raffaele, Febbraio 2022

Condoluci C.

**Accoglienza, assistenza e cura nel ricovero riabilitativo dei bambini con disturbo dello spettro autistico**, I disordini dello spettro autistico: le azioni per un loro efficace contrasto”, Roma, Aprile 2022

Condoluci C.

**Le disabilità dello sviluppo e l'intervento precoce multidisciplinare secondo il “modello San Raffaele”**

L'intervento precoce nelle disabilità dello sviluppo dal concepimento ai 1000 giorni di vita. Ceglie Messapica Novembre, 2022

Di Girolamo G.

**L' intervento precoce nei disturbi del controllo motorio .**

L'intervento precoce nelle disabilità dello sviluppo dal concepimento ai 1000 giorni di vita, Ceglie Messapica Novembre 2022

Condoluci C.

**La famiglia: quando nasce un bambino con Sindrome di Down**

IV National Scientific Conference: Down Syndrome From Research to Therapy, 21 – 22 ottobre 2022; virtual edition

Condoluci C.

**La famiglia: quando nasce un bambino con Sindrome di Down**

IV National Scientific Conference: Down Syndrome From Research to Therapy, 21 – 22 ottobre 2022; virtual edition

Stocchi F.

Plenary Lecture: **Disease modification in PD: what are the promising targets?**

International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases and related neurological disorders, Barcellona, Marzo 2022

Stocchi F.

**Microbiota e malattie neurologiche**

AINR- 31° Congresso Nazionale dell'Associazione Italiana di Neuroradiologia, Roma, Giugno 2022

Stocchi F.

**Disturbi motori e depressione: caratteristiche e gestione clinica del paziente parkinsoniano**

Deep Brain – La Depressione nel paziente con disturbi neurologici, Roma, luglio 2022

Stocchi F.

**Presente e futuro della terapia**

Workshop: Full Engagement in Parkinson's Disease, Parma, Ottobre 2022

Stocchi F.

**Terapie innovative**

La Neurologia al Gemelli, Malattia di Parkinson e Parkinsonismi, Roma, Ottobre 2022

Stocchi F.

**La terapia farmacologica iniziale della malattia di Parkinson: cosa sappiamo di certo e cosa possiamo aspettarci per i prossimi anni**

GONE 3rd Edition – Go On Neurology Expertise, Venezia, Ottobre 2022

Stocchi F.

**L'uso della apomorfina nella malattia di Parkinson: vantaggi ed aree di miglioramento**

8° Congresso Nazionale Accademia LIMPE-DISMOV, Novembre 2022, Napoli

Stocchi F.

**Terapie attuali e sperimentali delle forme genetiche di parkinsonismo**

8° Congresso Nazionale Accademia LIMPE-DISMOV, Napoli, Novembre 2022

Vacca L.

Moderazione Sessione Poster: **Terapia**

8° Congresso Nazionale Accademia LIMPE-DISMOV, Napoli, Novembre 2022

**Area di ricerca Cefalea e Dolore Neuropatico**

*Associazione Italiana per la lotta Contro le cefalee- onlus*

Piero Barbanti Presidente.

Cinzia Aurilia vice presidente.

**Area di Riabilitazione Cardiorespiratoria, Telemedicina, e-Health**

Giuseppe Rosano - President elect Heart Failure Association of the European Society of Cardiology

Giuseppe Rosano - Fellow of the Hellenic Society of Heart Failure

**Area di Epidemiologia Clinica e Molecolare**

*Società Italiana di Tabaccologia (SITAB)/Fondazione Veronesi*

primo premio al ricercatore dr. Mario Cristina per il lavoro

*Nicotine in combination with SARS-CoV-2 affects cells viability, inflammatory response and ultrastructural integrity.*

Sansone L, De Iure A, Cristina M, Belli M, Vitiello L, Marcolongo F, Rosellini A, Macera L, Spezia PG, Tomino C, Bonassi S, Russo MA, Maggi F, Russo P.

Int J Mol Sci. 2022 Aug 22;23(16):9488. PMID: 36012747

**Area di Ricerca Riabilitazione Neuromotoria a Robotica Riabilitativa**

Marco Franceschini - Associate Editor per European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine

Michela Goffredo - Faculty member della 3° European R2S2 Robotic Rehabilitation Summer School (2021) "Pediatric rehabilitation activities with the use of technologically advanced and robotic equipment".

Matteo Cioeta - Referente per la Regione Lazio del Gruppo di Interesse Specialistico in Fisioterapia Muscoloscheletrica e Terapia Manuale dell'Associazione Italiana Fisioterapia (GIS GTM – AIFI)

**Area di Ricerca Biobanca, biotecnologie avanzate e biomarker discovery**

Fiorella Guadagni - Consultant to Center for Immuno-Oncology, Center for Cancer Research – National Cancer Institute - National Institute of Health (NIH) - U.S. Department of Health and Human Services

Fiorella Guadagni - Membro del Comitato di Indirizzo Corso di Laurea in "Digital Health and Bioinformatic Engineering", Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione ed Elettrica e Matematica Applicata (DIEM), Università di Salerno

Fiorella Guadagni - Referente dell'IRCCS San Raffaele Roma nel Tavolo Biobanche degli IRCCS della Rete Cardiologica.

Fiorella Guadagni - Referente dell'IRCCS San Raffaele Roma nel Working Group 3 – EMR interazione tra Cartella Clinica Elettronica e programmi di gestione di dati clinici a fini di ricerca nell'ambito del progetto Health Big Data

Fiorella Guadagni - Referente dell'IRCCS San Raffaele Roma nel Tavolo Catalogo Materiale Biologico degli IRCCS (Ministero della Salute)

Fiorella Guadagni - Nomina a Commissario Sostituto ai sensi dell'Articolo 7, Comma 6, del D.P.R. n. 95 del 2016 per la Commissione per l'Abilitazione Scientifica Nazionale alla prima e seconda fascia dei professori universitari nel settore concorsuale 05/E3 - Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (art. 8, comma 1, d.d. n. 251 del 29 gennaio 2021)

### **Laboratorio Microbiologia**

Poster II classificato al 50° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Napoli, Settembre 2022.

Lisa Peruzza, Maysan Sarshar, Francesco Strati, Carlo Zagaglia, Fabio Grassi. Mauro Nicoletti; Anna Teresa Palamara; Cecilia Ambrosi e Daniela Scribano "The Shigella flexneri virulence factor apyrase is released inside eukaryotic cells to manipulate host cell".

### **Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare**

Massimiliano Caprio - membro della commissione 17 di valutazione dei progetti di ricerca traslazionale per l'Agenzia Nazionale della Ricerca del governo francese (ANR).

### **Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica**

Alessandra Musella - membro del comitato scientifico dell'associazione Brayn, Brainstorming Research Assembly for Young Neuroscientists.

Rosella Mechelli - membro del comitato scientifico dell'Associazione Italiana di Neuroimmunologia (AINI).

### **Laboratorio di Patologia Molecolare, Cellulare e Ultrastrutturale**

Mario Cristina - Primo Premio Fondazione Veronesi per Società Italiana Tabaccologia per la seguente pubblicazione

Federica Limana - Reviewer per le seguenti riviste: Agence Nationale della Recherche (ANR) France, National Science Center in Poland, Università Sapienza di Roma, European Journal of Heart Failure, Scientific Reports, Pharmacological Research, Journal of Molecular Medicine, Theranostics, Journal of Cellular Physiology, International Journal of Cardiology, Journal of Cellular and Molecular Medicine, Stem Cells, Journal of Cell Death & Disease, Frontiers in Immunology.

Federica Limana - Editor per Plos ONE, Stem Cell Therapy and Research e Pharmacology & Therapeutics.

Matteo Antonio Russo - Editor per: Immunity and Aging, Functional Neurology, Neuroscience and Medicine, J. of Carcinogenesis and Mutagenesis, J. of Cancer Science and Therapy, Prevention and Research, The Scientific World Journal, Open Journal of Pathology, Pathology Discovery, European Medical Journal. Reviewer per: ARS, Cancer Res, Oncogene, Biomedicine & Pharmacotherapy, Frontiers in Biosciences, Histopathology, J Molecular Medicine, J Biological regulators and homeostatic agents.

Luigi Sansone - Reviewer le seguenti riviste scientifiche: Journal of cellular Physiology; BioFactors; Ageing research reviews; European journal of cell biology; medical science monitor, Cancers (MDPI), Cells.

L'attività della ricerca corrente dell'IRCCS San Raffaele Pisana è organizzata secondo le seguenti tre linee di ricerca istituzionali:

### **Linea 1: Fattori preclinici determinanti l'efficacia della riabilitazione.**

#### **A. Descrizione**

- Determinanti cellulari, molecolari, genetici della risposta riabilitativa al training fisico in modelli riproducenti le malattie neurodegenerative, neuromotorie, cerebrovascolari, metaboliche, cronico-degenerative dell'apparato cardiovascolare, respiratorio e nel dolore.
- Determinanti preclinici nello studio dei percorsi riabilitativi dei pazienti multimorbidi.
- Individuazione e valutazione di biomarcatori predittivi per il trattamento riabilitativo.
- Imaging pre-clinica.

#### **B. Premessa/Background**

La medicina riabilitativa ha necessità di superare l'empirismo che in passato ha caratterizzato il suo agire per dotarsi di solide evidenze precliniche misurabili.

Lo studio dei meccanismi patogenetici preclinici permette di individuare i meccanismi del recupero funzionale consentendo di realizzare un percorso personalizzato e realmente traslazionale.

La creazione di solidi modelli che permettano di realizzare l'analisi del soggetto sano e di quello con disabilità è di supporto alla valutazione oggettiva dello stato clinico, alla comprensione dei fenomeni di recupero funzionale, alla personalizzazione dell'approccio terapeutico.

L'integrazione genotipo-fenotipo-ambiente è la base della riabilitazione del futuro.

#### **C. Razionale**

L'identificazione dei meccanismi eziopatogenetici alla base delle malattie disabilitanti permetterà lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative.

La conoscenza approfondita dei meccanismi patogenetici delle malattie cronico-degenerative, con l'identificazione di molecole endogene rilasciate da parte dei tessuti danneggiati, possono costituire un utile strumento per la scoperta di biomarkers utili per monitorare la progressione della malattia e l'efficacia della riabilitazione.

La conoscenza degli eventi precoci che determinano la progressione delle malattie disabilitanti è fondamentale per identificare marker di rischio e nuovi determinanti di out-come.

E' importante quindi poter: identificare le alterazioni reciproche del metabolismo bioenergetico e suggerire approcci nutrizionali/farmacologici e riabilitativi; analizzare i determinanti preclinici mediante indagini di imaging preclinico; individuare la presenza di danno ossidativo pre e post riabilitazione in malattie disabilitanti.

#### **D. Obiettivi globali**

Identificazione di modelli riproducenti i determinanti cellulari, molecolari, genetici, nutrizionali e microbici nella risposta riabilitativa in malattie neurodegenerative, neuromotorie, cerebrovascolari, ortopediche, cardiovascolari, respiratorie e nel dolore cronico. Identificazione di biomarkers per predire l'efficacia di tale risposta.

#### **E. Risultati attesi e misurabili nel triennio**

- Identificazione di nuovi marcatori di diagnosi e di progressione traslazionale per le malattie disabilitanti.
- Identificazione di nuovi modelli nutrizionali e farmacologici preclinici specifici per la riabilitazione nelle malattie disabilitanti.



- Identificazione di modelli integrati genotipo-fenotipo-ambiente favorenti/sfavorenti il risultato riabilitativo.

## **Linea 2: Clinica della disabilità.**

### **A. Descrizione**

- Realizzare e sperimentare nuovi percorsi terapeutici riabilitativi specifici per patologia.
- Perfezionare nuove tecniche di riabilitazione e plasticità neuronale in persone con esiti di ictus cerebrale, malattia di Parkinson, Parkinsonismo e altra disabilità neurologica.
- Studio clinico dell'efficacia dell'esercizio riabilitativo e/o dei presidi farmacologici e nutrizionali nel recupero funzionale delle malattie disabilitanti.
- Analisi qualitativa e quantitativa del cammino e dei movimenti in pazienti adulti e pediatrici.
- Analisi dei correlati neurali della riabilitazione in pazienti adulti e pediatrici.
- Analisi del ruolo della multimorbilità nel raggiungimento dell'outcome riabilitativo

### **B. Premessa/Background**

Nella visione bio-psico-sociale di una moderna riabilitazione diviene fondamentale la presa in carico globale del paziente con disabilità onde ottenere la miglior qualità di vita possibile favorendo inoltre un corretto reinserimento nella vita lavorativa e sociale.

L'attività riabilitativa non può prescindere dalla conoscenza dei meccanismi patogenetici delle malattie disabilitanti. In questa ottica diviene necessario lo studio dei meccanismi di lesione e di recupero post-lesionale. Particolare attenzione va posta allo studio dei clusters di patologia (complessità) in grado di determinare il risultato riabilitativo. Necessitano inoltre nuovi studi epidemiologici e di coorti di popolazioni verso le patologie disabilitanti onde attuare una efficace politica di prevenzione.

Va inoltre garantito un costante aggiornamento delle procedure e delle tecniche attuate in ambito riabilitativo.

### **C. Razionale**

Il trattamento riabilitativo intensivo determina l'entità e la qualità del recupero della persona affetta da patologia disabilitante, soprattutto quando il percorso riabilitativo viene attuato il più precocemente possibile dall'evento acuto. Nell'ambito delle patologie disabilitanti neurologiche ad esempio la neuroplasticità è fortemente stimolata da un efficace trattamento intensivo riabilitativo. Analogamente in ambito cardiorespiratorio l'attività riabilitativa consente di ottenere un buon recupero delle funzioni. I moderni trattamenti riabilitativi devono quindi essere realizzati attraverso lo studio e l'analisi delle reali possibilità di recupero del Paziente (piano riabilitativo individuale) che discendono da una efficace presa in carico biopsicosociale dell'individuo. Da qui la necessità di effettuare una completa analisi dello stato di salute del Paziente, individuando e correttamente gestendo le comorbilità.

### **D. Obiettivi globali**

- Identificare fattori e indici multivariabili che influenzano la risposta al trattamento riabilitativo, il recupero e la qualità di vita di pazienti con patologie disabilitanti.
- Sperimentare e valutare nuovi trattamenti, farmacologici, nutraceutici, per migliorare il recupero funzionale nelle specifiche popolazioni.

### **E. Risultati attesi e misurabili nel triennio**

- Messa a punto di nuovi e più efficaci sistemi di valutazione clinica e tecnologica.

- Individuazione di predittori di recupero che possano facilitare e rendere più mirato il progetto riabilitativo.
- Nuove procedure per valutare il guadagno funzionale, la previsione della risposta al trattamento, il miglioramento e la personalizzazione dell'approccio terapeutico.
- Realizzazione di modelli integrati di trattamento interdisciplinare e multifattoriale delle patologie disabilitanti nel Paziente complesso.
- Realizzazione di Linee guida di riabilitazione in patologia specifica.

### **Linea 3: Innovazione in medicina e riabilitazione.**

#### 1. Descrizione

- Utilizzazione di sistemi telemedicali e di nuove tecnologie ICT per garantire la continuità assistenziale nel territorio in pazienti con patologie disabilitanti e per proporre nuovi processi per la valutazione precoce del declino funzionale.
- Systems medicine e riabilitazione.
- Formazione del paziente, del caregiver, del personale medico e del medico di medicina generale per la gestione del paziente con disabilità in riabilitazione.
- Attuazione di Governo Clinico della riabilitazione attraverso il monitoraggio dell'outcome e della qualità di vita.

#### 2. Premessa/Background

L'invecchiamento della popolazione, l'aumentata incidenza di patologie croniche stanno facendo emergere nuovi bisogni di salute che richiedono percorsi assistenziali e terapeutici personalizzati. In questo scenario, la validazione di trattamenti innovativi (ad esempio la teleriabilitazione) può rappresentare una risposta efficace e efficiente.

Le malattie croniche non trasmissibili sono multifattoriali e causate da complesse interazioni gene-ambiente che agiscono lungo l'intero corso della vita. La systems medicine ha come obiettivo l'integrazione di dati preclinici, clinici, ambientali facilitando quindi la comprensione dei meccanismi delle malattie e migliorandone la diagnosi, il trattamento e la prognosi.

Le nuove tecnologie dell'informazione e della comunicazione hanno dimostrato di essere lo strumento strategico più promettente per garantire la continuità della gestione clinica e la conservazione del benessere.

#### 3. Razionale

La riabilitazione consiste in un intervento globale e multidisciplinare basato sull'evidenza dei benefici sui pazienti in base a parametri di efficacia oggettivi e quantificabili, volto a ridurre i sintomi, ottimizzare lo stato funzionale, aumentare la partecipazione e ridurre il consumo di risorse sanitarie attraverso la stabilizzazione o il miglioramento della malattie.

La letteratura ha evidenziato l'utilità dell'intervento con teleriabilitazione, dimostrandone la validità sia in termini economici che assistenziali. Attualmente, sono state sviluppate un elevato numero di piattaforme per la teleriabilitazione che richiedono nuove evidenze scientifiche.

Le tecnologie dell'informazione e della comunicazione, di concerto con le nuove possibilità date dai sistemi di sensing pervasivo, Internet of Things, Intelligenza Ambientale, Machine Learning e Computazione Ubiqua, pongono nuove sfide nell'implementazione di sistemi integrati complessi per la gestione e il trattamento di pazienti.

#### 4. Obiettivi globali

- Percorsi di teleriabilitazione.
- Tecniche innovative di neuroimaging funzionale.
- Nuove tecnologie quali network di sensori, algoritmi avanzati, robotica applicata per il ripristino della funzionalità sensoriale o motoria.
- Criteri di HTA per determinare un congruo accesso alle moderne procedure riabilitative e terapeutiche ad alto costo.

#### 5. Risultati attesi e misurabili nel triennio

- Attivazione di programmi riabilitativi a domicilio altrimenti non consentiti in altra modalità organizzativa.
- Definizione di nuovi percorsi riabilitativi scientificamente certi, socialmente utili ed economicamente sostenibili.
- Implementazione e sviluppo di sistemi avanzati di riabilitazione, nuovi algoritmi per la somministrazione di trattamenti, tecnologia assistiva per facilitare il contatto tra paziente e terapeuta.
- Validazione di nuove tecnologie riabilitative rendendole accessibili.

## **LINEA 1**

**Fattori preclinici determinanti l'efficacia della riabilitazione.**

---

## AREA DI RICERCA BIOBANCA – BIOTECNOLOGIE AVANZATE E BIOMARKER DISCOVERY

### *Biomarker discovery e implementazione di modelli di rischio per la definizione di protocolli di medicina predittiva*

Le malattie croniche complesse rappresentano uno dei problemi più visibili di salute pubblica, a causa degli elevati valori di prevalenza ed incidenza nella popolazione e per la notevole complessità della loro gestione clinica. Per tali motivi, si sente sempre più forte l'esigenza di introdurre nella pratica clinica nuovi strumenti di medicina predittiva che permettano, da una parte, la valutazione del rischio individuale, dall'altra, l'adozione di protocolli diagnostico-terapeutico-riabilitativi che migliorino la qualità e l'appropriatezza della gestione clinica della malattia e delle sue complicanze. In questo complesso ed articolato contesto, l'innovazione nei processi clinici (caratterizzata dalla personalizzazione dei processi di cura per diagnosticare precocemente eventi avversi e per ottimizzare il trattamento) e l'innovazione nei sistemi e nelle metodologie per l'integrazione, gestione ed elaborazione dei dati biomedici e clinici rappresentano le basi fondamentali per lo sviluppo e l'implementazione di programmi assistenziali innovativi. A ciò si aggiunga la rapida crescita a cui si è assistito negli ultimi anni della quantità di dati biologici, biomedici ed epidemiologici prodotti non solo mediante le tecnologie "omics", ma anche attraverso l'impiego di fascicoli sanitari elettronici e strumenti di telemedicina, che rappresentano una fonte generosa di informazioni per una medicina predittiva (big-data).

Il progetto si basa sull'ipotesi che l'applicazione di nuove tecniche di apprendimento automatico (machine learning e natural language processing) possa facilitare analisi descrittive e predittive in maniera retrospettiva e generare ipotesi future, al fine di ottenere il massimo valore (conoscenza) dai dati disponibili (strutturati o non strutturati), trasformandoli in una solida base su cui costruire approcci di medicina precisione. Il progetto si pone all'interno del programma del Laboratorio BioDAT, che prevede l'esecuzione di studi di biomarker discovery e l'implementazione di modelli di rischio per la definizione di protocolli di medicina predittiva in pazienti con patologie croniche complesse. La scoperta di nuovi biomarcatori (biomarker discovery) è, infatti, di primaria importanza nel disegno di sistemi decisionali clinici in grado di predire in maniera personalizzata il rischio di insorgenza di una specifica patologia e/o delle sue complicanze, nonché la mancata risposta ad un trattamento o la possibile insorgenza di effetti indesiderati, al fine di sviluppare nuovi approcci di medicina precisione in ambito terapeutico e/o riabilitativo.

Gli obiettivi specifici del progetto di ricerca corrente del Laboratorio BioDAT sono finalizzati:

- a) all'individuazione di biomarcatori innovativi in grado di favorire la promozione di programmi di medicina individualizzati in pazienti con malattie croniche;
- b) alla realizzazione di approcci innovativi per abilitare processi di analisi dei dati al fine di una caratterizzazione/previsione della situazione corrente, nonché della prevenzione in funzione di una certa azione correttiva;
- c) alla creazione di una rete di conoscenze utili alla diagnosi, prognosi e trattamento delle patologie di interesse e delle co-morbilità associate al fine di sviluppare soluzioni integrate per il processo decisionale medico.

Si intende poter mettere a punto e validare di nuovi strumenti decisionali di supporto ai professionisti sanitari per la pianificazione del management clinico di pazienti con malattie croniche complesse.

Il progetto, in coerenza con i programmi Nazionali e Comunitari, dedica una forte attenzione alla digitalizzazione dei settori della salute e della ricerca biomedica attraverso la conversione delle

nuove conoscenze/tecnologie in processi e servizi innovativi, che offrano opportunità ai professionisti sanitari per una migliore pianificazione del management clinico e, al tempo stesso, contribuiscano al miglioramento della vita dei cittadini.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti sono adeguatamente preservati nella BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM). Le procedure di processazione e stoccaggio dei campioni biologici sono state strutturate in base a protocolli standard di riferimento e sono diversificate a seconda dei campioni che vengono trattati. In particolare, la BioBIM prevede la conservazione di vari tipi di campioni biologici ed è organizzata in modo da assicurare: la conservazione del campione per 20 anni, la qualità del campione biologico conservato, il corretto utilizzo dei campioni biologici depositati e la tutela della privacy del soggetto donatore. Ad ogni campione biologico sono associati i dati clinico-anamnestici del donatore che, in aggiunta ai dati biomolecolari ed omici derivati dagli studi di biomarker discovery vanno a popolare un proprio Data Lake per l'integrazione e l'analisi delle informazioni di interesse mediante data mining, machine learning e natural language processing, nel rispetto della normativa cogente in tema di privacy e consenso informato.

Al fine di implementare il patrimonio informativo del Data Lake della BioBIM e, in ultima analisi, sviluppare soluzioni integrate per il processo decisionale medico, sono stati eseguiti studi finalizzati all'individuazione di biomarcatori molecolari in grado di favorire la promozione di programmi di medicina individualizzati in pazienti con malattie croniche disabilitanti. In particolare, è stata finalizzata l'analisi dell'associazione di alcune varianti geniche con le WMHs (white matter hyperintensities), un marcatore neuroradiologico recentemente associato ad aumentato rischio di ictus, demenza e morte. Utilizzando un'ampia casistica di pazienti emicranici, la presenza di tale marcatore è stata rilevata in circa il 20% dei pazienti con indicazione ad eseguire una risonanza magnetica cerebrale. L'analisi dei polimorfismi LTA e SOD in questi pazienti ha dimostrato la loro associazione con la presenza di WMH in modelli classici di trasmissione ereditaria. Inoltre, la stima delle frequenze aplotipiche ha mostrato la presenza di un aplotipo a quattro loci la cui frequenza era significativamente più alta negli emicranici con WMH. Questi risultati sono stati oggetto di pubblicazione sulla rivista open-access International Journal of Molecular Sciences (doi: 10.3390/ijms232213781).

Nell'ambito del progetto, la BioBIM ha inoltre collaborato all'analisi di nuovi biomarcatori candidati per la diagnosi e/o prognosi della malattia di Parkinson in collaborazione con l'Università di Brescia. In particolare, si è proceduto con la determinazione plasmatica di diversi biomarcatori di infiammazione [proteina C-reattiva (hCRP), cistatina C (Cys C), interleuchina 6 (IL-6)] e la loro correlazione con l'attività del fattore NF- $\kappa$ B/c-Rel nelle PBMC e con alcuni parametri clinici. Le analisi di correlazione con la gravità della malattia sono state effettuate in un gruppo di pazienti affetti da Parkinson reclutati nel reparto di neurologia dell'Università di Brescia e in un gruppo di soggetti apparentemente sani (appaiati per sesso ed età) reclutati dalla BioBIM. Le variabili cognitive e motorie (rilevate mediante valutazioni con scale UPDRS I-II-III, H-Y-Stage and Tinetti), o le sole variabili motorie (rilevate mediante UPDRS III, H-Y-Stage and Tinetti) dei soggetti con malattia di Parkinson sono state combinate linearmente per definire la "prima componente" estratta dalla Principal Component Analysis (PCA) che le sintetizza tutte. L'obiettivo di questa analisi è stato quello di individuare l'indicatore che rappresenta globalmente la gravità della malattia (prima componente) per poterlo poi correlare ai marcatori biologici analizzati. Le correlazioni tra la prima componente estratta dalla PCA delle variabili cognitive e motorie e i marcatori misurati nel corso del progetto (NF- $\kappa$ B/c-Rel, hCRP, Cys C, IL-6) sono stati visualizzati attraverso analisi di correlazione che hanno mostrato una correlazione positiva tra IL-6 e Cys C e tra IL-6 e hCRP e tra la gravità dei sintomi motori (la prima componente) e Cys C ed IL-6 in pazienti con malattia di Parkinson (doi: 10.1159/000523982).

Infine, la classificazione sistematica delle “features” di pazienti con patologie di interesse neurologico, ha facilitato, inoltre, la costruzione di un dataset dedicato alla modellazione di un sistema di supporto decisionale clinico (DSS) per la previsione del rischio di mancata risposta ai triptani (di tipo binario: 0=risposta, 1=mancata risposta), comprendente caratteristiche cliniche, biochimiche e biomolecolari oltre all'esposizione ai farmaci, alle co-morbilità, alla familiarità e allo stile di vita di pazienti emicranici. Tale dataset ha incluso 739 pazienti ed è stato suddiviso in due gruppi, un training set (516 pazienti) e un test set (223 pazienti). Per realizzare il classificatore abbiamo è stato applicato un modello basato su un multiple kernel che combina l'algoritmo di classificazione Support Vector Machine (SVM) con la tecnica della Random Optimization. Al fine di migliorare il trattamento dei dati tramite strumenti automatici, i metodi di classificazione dell'apprendimento automatico sono stati implementati con una strategia di preprocessing. La prima operazione è stata quella di correggere eventuali errori di battitura come ad esempio l'utilizzo di virgole invece che punti per la suddivisione dei numeri decimali o l'introduzione di spazi bianchi in eccesso. La seconda operazione di preprocessing dei dati è stata quella di individuare le colonne contenenti valori categorizzati per poi convertirle in colonne di valori binari una per ogni categoria presente nella colonna originale. Sono stati, quindi, implementati vari modelli di feature selection, tra cui quelli di: a) Feature Importance via Coefficients (che utilizza la regressione lineare per valutare l'importanza di ogni singola feature rispetto al modello); b) Mutual Information Classification, e c) Recursive Feature Elimination (che consente di eliminare ricorsivamente tutte le feature che risultano essere inefficaci o addirittura dannose per il modello). L'importanza di un tale approccio risiede nel fatto che la riduzione delle feature in input ad un classificatore consente di diminuire i costi di computazione migliorando le prestazioni del modello stesso. E' infatti provato che la presenza di feature non rilevanti per il modello e in alcuni casi anche potenzialmente confondenti può inficiare la performance del modello stesso. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare come l'applicazione dei metodi di Feature selection permetta di ridurre il numero delle features in ingresso al modello, diminuire i costi di computazione e migliorare le prestazioni del modello stesso, come dimostrato da un significativo miglioramento della recall del modello previsionale che dal 69% osservabile nel modello base si innalza all' 89% applicando una metodologia di tipo Recursive Feature Elimination (lavoro in corso di sottomissione), con ovvie ricadute non solo nell'ambito del progetto specifico, ma anche in progetti futuri disegnati in maniera specifica per la messa a punto di protocolli di medicina predittiva.

Grazie alla possibilità di ampliamento della casistica, offerta dalla Banca Biologica Interistituzionale Multidisciplinare (Progetto BioBIM) dell'IRCCS San Raffaele, e alle numerose collaborazioni attive nell'ambito di progetti Nazionali ed Europei, si prevede di ampliare gli studi in corso allo scopo di implementare nuovi strumenti per il management clinico, la realizzazione di percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali e/o nell'applicazione di programmi terapeutici/riabilitativi individuali in pazienti con patologie croniche complesse.

## **AREA DI RICERCA CEFALEA E DOLORE NEUROPATICO**

*Valutazione di marcatori biomolecolari dello stato pro-infiammatorio nel rischio cerebrovascolare dei pazienti affetti da emicrania*

Diversi studi scientifici evidenziano la presenza di lesioni iperintense nel tessuto cerebrale dei pazienti emicranici, definite con il termine inglese “white matter hyperintensities (WMHs)”. E' stato stimato che la presenza delle WMHs sia 4.35 più alta nei pazienti con emicrania rispetto ai



controlli sani (odds ratio 4.35,  $P \leq .001$ ), come se gli attacchi ripetuti di emicrania possano provocare delle piccole lesioni a livello cerebrale.

Un recente studio longitudinale mediante Risonanza Magnetica ad alto campo (3.0-Tesla) ha studiato i cambiamenti delle lesioni iperintense cerebrali nei pazienti emicranici, a distanza di 3 anni dall'inizio dello studio. Le lesioni erano localizzate in entrambi gli emisferi cerebrali, ma più frequentemente a livello frontale e presentavano simili dimensioni. Il numero di lesioni cerebrali, a distanza di 3 anni dal baseline, era aumentato, soprattutto in caso di un incremento della frequenza degli attacchi. Le lesioni più piccole potevano anche scomparire, mentre nei pazienti con molti attacchi quelle più piccole potevano ingrandirsi o formarsene altre, suggerendo una progressione di malattia. Ad oggi la genesi di queste lesioni non è nota, a volte vengono definite su base gliotica aspecifica, in altre occasioni sono state interpretate come lesioni di tipo vascolare. Non è noto se si tratti di un fenomeno dinamico o di un fenomeno permanente, che potrebbe alla lunga determinare una ulteriore disabilità in questi pazienti. Un recente studio con spettroscopia suggerisce che in queste aree si verifica una significativa riduzione della concentrazione di N-acetil-aspartato e di creatin-fosfochinasi rispetto al baseline, indicando una maggiore perdita assonale, una riduzione delle cellule della glia con riduzione della produzione di energia cellulare. Altri autori non hanno trovato un legame tra livelli medi di proteina C reattiva (PCR), marcatori di infiammazione e la presenza di WMHs, in 432 soggetti con emicrania, anche se i livelli medi di PCR erano significativamente più alti nei pazienti affetti da emicrania ( $1.94 \pm 2.03$  mg/L) rispetto ai controlli non emicranici ( $0.82 \pm 0.58$  mg/L;  $P \leq .0001$ ). Un recente studio danese, condotto su 172 casi (34 gemelle, and 139 controlli sani) ha escluso la presenza di un'associazione tra l'emicrania con aura e la presenza di WMHs. Sulla base dei pregressi studi dell'Area di ricerca sulla Cefalea e Dolore Neuropatico, si ipotizza che i pazienti con emicrania abbiano un maggior rischio di eventi vascolari cerebrali. In passato l'Area ha dimostrato che la presenza di polimorfismi della superossido dismutasi (SOD2) nei pazienti con emicrania con aura possa portare ad un difettoso controllo dei fenomeni ossidativi determinando una sovra stimolazione dei neuroni trigeminali e che le donne in pre-menopausa con emicrania cronica possano avere un maggior rischio trombotico. Pertanto diventa mandatario non solo effettuare una prevenzione nel caso dell'emicrania cronica, ma anche cercare di capire la genesi di queste lesioni per evitare una progressione di malattia permanente.

Lo scopo di questo progetto è quello di valutare la presenza di una correlazione tra i polimorfismi della SOD e della linfotossina A (LTA) e le lesioni cerebrali di questi pazienti, cercando di indentificare marcatori pro-infiammatori o pro-ossidanti che possano essere responsabili di malattia o di progressione di malattia.

La relazione tra aspetti clinici e radiologici è essenziale per capire l'eziologia della patologia e la progressione della patologia. Esistono solo pochi studi clinici che abbiano correlato la parte radiologica e quella ematologica con quella clinica.

Sono stati arruolati nello studio pazienti consecutivi affetti da emicrania con e senza aura afferenti al centro Cefalee dell'IRCCS San Raffaele. I pazienti che, dopo firma del consenso informato, accettavano di partecipare allo studio sono stati sottoposti, da parte dei neurologi dello staff, a dettagliata raccolta anamnestica mediante questionario semistrutturato che includeva le caratteristiche demografiche e cliniche dell'emicrania. Subito dopo è stato effettuato un prelievo ematico per analizzare possibili determinanti dell'emicrania (InterInstitutional Multidisciplinary Biobank - BioBIM) of the IRCCS San Raffaele). E' stato considerato, come gruppo controllo un campione di 100 soggetti sani, presenti già nella BioBIM che non presentavano parentela con i pazienti (40% maschi, 60% femmine, età  $38.4 \pm 12.2$  anni) ed erano provenienti dalla stessa area geografica con lo scopo di valutare e confrontare le frequenze del genotipo/aplotipo nella nostra razza. Inoltre in un sottogruppo di 183 pazienti, è stata valutata la RMN encefalo dai

neuroradiologi, in cieco rispetto alla diagnosi. Undici pazienti con disturbi cerebro-vascolari sono stati esclusi perché presentavano un quadro di vasculopatia ischemica cronica, che poteva costituire un fattore confondente.

Lo studio è concluso. Sono stati arruolati 370 pazienti (61 con emicrania senza aura, 190 emicrania con aura, 119 con emicrania cronica). La RMN encefalo è stata analizzata su 183 pazienti. 134 pazienti (79 con emicrania episodica: 64 senza aura, 15 con aura e 55 con emicrania cronica) avevano una RMN nella norma. La presenza invece di WMHs è stata riscontrata in 38 pazienti (13 con emicrania episodica: 9 senza aura, 4 con aura) e 25 con emicrania cronica. I polimorfismi *LTA*, *SOD1* e *SOD2* sono stati analizzati in 470 soggetti (370 emicranici e 100 controlli). I genotipi e le frequenze alleliche non differivano tra pazienti e controlli. Entrambi i gruppi erano in equilibrio di Hardy-Weinberg. L'analisi del linkage disequilibrium (LD), ha rilevato una forte associazione tra 2 due polimorfismi *LTA* e della *SOD* e la presenza di WMHs. L'analisi di regressione logistica multivariata conferma che il portatore dell'aplotipo TGCT (insieme alla cronicizzazione e l'età avanzata) è indipendentemente associato all'incremento del rischio di WMHs alla risonanza magnetica.

In conclusione lo studio dimostra una associazione tra alcuni aplotipi relativi a *SOD* e *LTA* e presenza di WMHs in pazienti affetti da emicrania, come a conferma che in questi pazienti ci sia più frequentemente un pattern pro-infiammatorio o pro-ossidativo nei pazienti che presentano le lesioni cerebrali rispetto a quelli che non ne hanno.

#### **AREA DI RICERCA CENTRO DI RICERCA CLINICA E SPERIMENTALE**

*Studio comparativo fra due diversi integratori alimentari di agire sul profilo lipidico e sulla qualità di vita associati alla malattia venosa cronica*

La malattia venosa cronica (CVD) e l'ipercolesterolemia nello stesso paziente sono frequenti. La malattia venosa cronica è una condizione clinica, spesso progressiva, che non solo limita la qualità di vita dei pazienti che ne sono affetti ma che può evolvere verso patologie gravi, quali la comparsa di ulcere venose. L'ipercolesterolemia è un noto fattore di rischio cardiovascolare ed è un obiettivo comune di trattamento.

Nei pazienti a basso rischio cardiovascolare, e/o in prevenzione primaria che rifiutano l'assunzione di agenti ipolipemizzanti o nei pazienti intolleranti alle statine, l'uso di integratori alimentari può essere aggiunto allo stile di vita per ottenere una riduzione dei livelli plasmatici del colesterolo. Numerosi sono gli integratori alimentari disponibili; molti di questi sono in grado di agire contemporaneamente su diversi parametri metabolici, quali il colesterolo, ed emodinamici, quali la malattia venosa, aumentando quindi la compliance al trattamento da parte del paziente.

L'obiettivo specifico di questo studio, che fa parte di un progetto più ampio di valutazione dell'efficacia e sicurezza di diversi nutraceutici su parametri metabolici ed emodinamici, è quello di paragonare l'efficacia di integratori alimentari sul metabolismo lipidico e sui sintomi e segni clinici associati alla malattia venosa ed alla qualità di vita.

Il primo di questi studi coinvolge 123 pazienti ambulatoriali affetti da malattia venosa cronica (MVC) e ipercolesterolemia che non abbiano assunto negli ultimi tre mesi farmaci e/o nutraceutici e/o integratori alimentari per il trattamento dell'ipercolesterolemia e/o della MVC.

I pazienti eleggibili vengono randomizzati secondo lo schema a blocchi permutati 1:1:1 ed assegnati ad uno dei tre bracci di trattamento: A (Armolid plus, efarma), B (Colven, PhytoActiva Srl), C (placebo).

Sono state effettuate le visite al basale e le visite di controllo a tre mesi come da protocollo. A marzo 2020 causa COVID-19 lo studio è stato interrotto ed è stata svolta una analisi ad interim i cui risultati sono descritti di seguito.

Dei 42 pazienti che hanno firmato il consenso informato, 16 non sono stati arruolati per la mancata adesione ai criteri di inclusione e/o di esclusione. Sono stati quindi arruolati 26 pazienti, di cui 3 non hanno svolto la visita V2 per problemi personali ad effettuare la visita di follow up (drop out).

Le analisi sono state pertanto svolte su n. 23 pazienti.

I dati mostrano una riduzione significativa del colesterolo totale nel gruppo randomizzato a gruppo A ( $p=0,0071$ ) rispetto al gruppo C e nel gruppo randomizzato a B ( $p=0,0133$ ) rispetto al gruppo C. I due gruppi A e B non differiscono significativamente tra di loro per colesterolo totale.

Per la variabile LDL, i dati sono speculari. Vi è una riduzione significativa dei valori di LDL nel gruppo randomizzato a gruppo A ( $p=0,0107$ ) rispetto a C e nel gruppo randomizzato a gruppo B ( $p=0,0149$ ) rispetto a C. I due gruppi A e B non differiscono significativamente tra di loro per LDL.

Nel corso dello studio, 6 pazienti hanno presentato eventi avversi: di questi 2 non relati alle molecole dello studio (interventi minori programmati).

## **AREA DI RICERCA EPIDEMIOLOGIA CLINICA E MOLECOLAR E BIOSTATISTICA**

### *Studio di prevenzione primaria delle cadute domiciliari in pazienti anziani a rischio*

Ogni anno si verificano in Italia fra i tre e i quattro milioni di incidenti domestici, che, come è noto colpiscono prevalentemente gli anziani, con conseguenze rilevanti in termini di disabilità, ricoveri e mortalità. Tra gli incidenti domestici, le cadute rappresentano la voce più importante, al punto che si calcola che un terzo degli ultrasessantenni ne rimanga vittima, con costi umani, sociali e materiali straordinari. Compito prioritario dei medici di famiglia, interlocutori di fiducia, è prevenire le cadute negli anziani a rischio e le relative conseguenze socio-economiche attraverso interventi mirati di tipo educazionali. In questo contesto, l'anziano fragile, cioè la fascia maggiormente affetta da declino fisico, psichico, sociale, che può rappresentare fino al 20% di tutti gli anziani, è sicuramente un target prioritario di ogni strategia di prevenzione. Fattori di rischio riconosciuti, secondo le Linee Guida "Prevenzione delle cadute da incidente domestico negli anziani" del Piano Nazionale Linee Guida (PNLG, Maggio 2007), sono: storie di precedenti cadute; paura di cadere; polifarmacoterapia e assunzione di farmaci particolari; alterazione della mobilità; alterazione della vista; rischi domestici; isolamento sociale; condizioni molto precarie di salute; malattie del sistema cardiovascolare; depressione; demenza; epilessia; difficoltà nell'estensione delle ginocchia; confusione; clearance della creatinina  $< 65$  ml/min; utilizzo di lenti multifocali; artrite e/o artrosi; inoltre come già sottolineato dalle Linee Guida NICE anche l'appartenenza al sesso femminile e il crescere dell'età sono fattori di rischio rilevanti.

Il Medico di Medicina Generale (MMG), per il suo ruolo sul territorio ed il rapporto di fiducia con l'assistito è l'interlocutore privilegiato per l'implementazione di programmi di prevenzione delle cadute.

Lo scopo del presente studio è quello di valutare se l'azione preventiva del Medico di Famiglia basato sui programmi proposti riduce il numero delle cadute tra gli anziani (soggetti  $> 65$  anni) ad elevato rischio di caduta.

Lo studio intende valutare la differenza, in termini di riduzione relativa, di cadute domiciliari riportate ed eventuali conseguenti fratture e/o di ammissioni al PS e/o di ricoveri ospedalieri, tra un gruppo di pazienti a cui viene offerto un programma di intervento coordinato dal MMG seguito da un supporto periodico al paziente e un gruppo di controllo.

#### **Endpoint Primario**

Comparazione fra i soggetti dei due gruppi per il numero di cadute riportate al Medico di Medicina Generale durante il periodo dello studio (1 anno).

## Endpoint Secondari

- Valutazione comparativa, a 1 anno dall'inizio dello studio, del numero di ammissioni al Pronto Soccorso inerenti all'evento "caduta" riportate dal paziente al medico nei due gruppi di studio.
- Valutazione comparativa, a 1 anno dall'inizio dello studio, del tipo e numero di accessi a visita specialistica inerenti l'evento "caduta", riportate dal paziente al medico nei due gruppi di studio.
- Valutazione comparativa, a 1 anno dall'inizio dello studio, del numero di fratture post-traumatiche riportate dal paziente al Medico nei due gruppi di studio.
- Valutazione comparativa, a 1 anno dall'inizio dello studio, del numero di ricoveri inerenti all'evento caduta, riportati dal paziente al Medico nei due gruppi di pazienti.

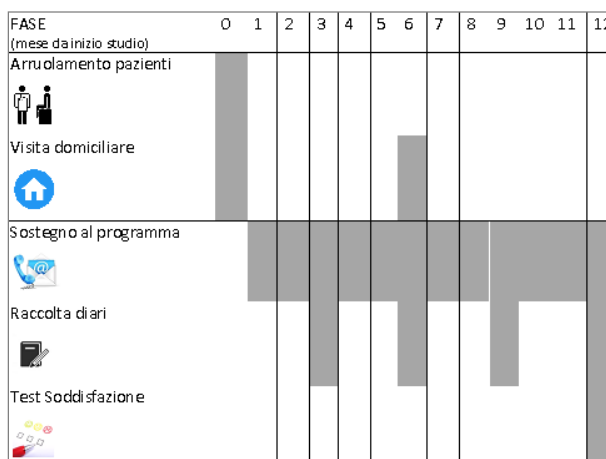
Lo studio è multicentrico interventistico educativo non farmacologico.

Sono coinvolti circa 100 MMG ai quali verrà richiesto di reclutare, previa sottoscrizione del consenso informato, 20 pazienti ad alto rischio caduta (con anamnesi positiva per 5 fattori di rischio da selezionare da una lista indicata nel protocollo).

Per ogni Medico di Medicina Generale vengono reclutati i primi 20 pazienti che arrivano ad osservazione (visita in studio, visita domiciliare, visita domiciliare programmata). Di questi 10 pazienti saranno randomizzati per ricevere una lista di istruzioni e suggerimenti per evitare le cadute in ambito domestico, unitamente a specifiche raccomandazioni in merito ad una corretta nutrizione. L'intervento è focalizzato sul counselling medico e comportamentale, sulla valutazione dei fattori di rischio domestici (con visita a domicilio del paziente) e su di un programma di attività fisica. Gli altri 10 soggetti sono seguiti secondo "normal practice" misurando e riportando gli endpoints dello studio con la stessa tempistica utilizzata per il gruppo di trattamento. Per garantire un analogo senso di coinvolgimento nello studio e per evitare discriminazioni di rilevanza etica, a questi pazienti vengono proposte le stesse raccomandazioni in merito ad corretta nutrizione offerte al gruppo di intervento.

Una volta al mese il medico contatta i soggetti al fine di reiterare i contenuti della lista di istruzioni e suggerimenti inseriti nel programma previsto. Inoltre, il medico in occasione del mese 3, 6, 9 ed alla conclusione del trattamento (mese 12) raccoglie il diario individuale su cui i pazienti riportano eventuali cadute (tutti i 20 pazienti) e per il gruppo di intervento (10 pazienti) l'adesione al programma di attività fisica. All'inizio dello studio, Fase 0 (F0) ed a metà del trattamento, Fase 6 (F6) il medico, o un operatore sanitario esperto di prevenzione cadute, deve eseguire una visita domiciliare al paziente per valutare la presenza di rischi nell'ambiente domestico e lasciare le indicazioni su come evitarli.

Il disegno dello studio è sintetizzato nel prospetto seguente:



Ci si aspetta una diminuzione delle cadute nella popolazione target: Pazienti anziani (maggiori di 65 anni) definiti 'ad alto rischio caduta' in base ai fattori di rischio più comunemente riportati dalla letteratura.

## **Laboratorio di Neurobiologia Molecolare e Cellulare**

*Neuroni chimicamente derivati da fibroblasti di pazienti affetti da demenza: nuovo modello per effettuare diagnosi differenziale*

Oggi le malattie neurodegenerative come il morbo di Alzheimer e la malattia di Parkinson vengono diagnosticate clinicamente mediante esami fisici e neurologici e test neuropsicologici e cognitivi standard, approcci basati su neuroimaging (MRI e PET) e punture lombari al fine di rilevare i biomarcatori dai campioni di liquido cerebrospinale (CSF) raccolti. Gli approcci diagnostici basati sulla neuroimaging (MRI e PET) presentano i vantaggi significativi di una bassa invasività, tuttavia il loro limite principale risulta essere la variabilità e i costi elevati. D'altra parte, la raccolta dei campioni di liquido cerebrospinale, oltre a richiedere tempistiche lunghe, risulta essere un approccio particolarmente invasivo e richiede tempo, mancano dati normativi a causa dell'elevata variabilità inter-laboratorio e quindi limitati in termini di possibilità di applicazione diffusa per la diagnosi precoce di AD. Da ciò risulta comprensibile lo sforzo nella ricerca di bio-marcatori che offrano una elevata accuratezza nella diagnosi precoce delle malattie, di facile esecuzione, di elevata disponibilità sul territorio, non invasiva e di costi sostenibili. Nel laboratorio si sfrutta la tecnologia microfluidica, combinata con metodi di riprogrammazione chimica di fibroblasti cutanei in neuroni (Neuroni chimicamente indotti, ciNs) come una nuova strategia per il rilevamento rapido su piccola scala di marcatori neuropatologici ( $\beta$ -amiloide, fosfo-TAU,  $\alpha$ -sinucleina) di diverse malattie neurodegenerative.

Infatti, è stato constatato che i ciNs su chip esprimono i tipici marcatori neuronali tra cui Tubulina  $\beta$ III, MAP2 e Duplecortina (DCX), e soprattutto, mostrano la presenza di proteine aggregate, e di mitocondri danneggiati, solo quando derivati da colture di fibroblasti di pazienti, rispetto ai soggetti sani.

L'obiettivo principale di questo progetto è quello di sviluppare un modello personalizzato in vitro di neuroni umani riprogrammati dai fibroblasti dei pazienti per studi sui meccanismi patogenetici della malattia di Alzheimer (AD) e della malattia di Parkinson (PD), diagnosi precoce e drug screening.

1. Preparazione di chip per microfluidica in polidimetilsilossano (PDMS).
2. Messa a punto di nuovi protocolli di transdifferenziamento utilizzando diverse combinazioni di composti chimici al fine di ottimizzare l'efficienza di conversione dei fibroblasti in cellule neuronali.
3. Applicazione del transdifferenziamento chimico in sistemi di microfluidica (chip), dei protocolli identificati come più efficaci nella riprogrammazione cellulare.
4. Caratterizzazione funzionale dei ciNs derivati dai nuovi protocolli mediante tecniche elettrofisiologiche e di microscopia elettronica.

Le grandi potenzialità di questa tecnologia sono rappresentate dalla messa a punto di un nuovo modello cellulare umano di patologie neurologiche sia per lo studio dei meccanismi patogenetici che per lo sviluppo di strategie diagnostiche a basso costo e poco invasive rispetto ad altre metodiche in uso (imaging, biomarcatori nel liquor). Si candida, inoltre, ad offrire la possibilità di una sperimentazione farmaceutica senza l'uso di animali.

Viene effettuata la conversione cellulare diretta su larga e su piccola scala mediante l'utilizzo di fibroblasti con fenotipo noto FAD, PD, soggetti sani di controllo, ottenuti dal Coriell Institute Biobank, Camden, NJ, USA.

I fibroblasti umani sono stati mantenuti in DMEM integrato con 10% di siero fetale bovino, GlutaMAX 1mM, amminoacidi non essenziali 0,1mM e penicillina/streptomicina a 37°C CO2 al 5%. Astrociti primari sono stati isolati da cervelli di topi neonati 1 giorno dopo la nascita. Gli esperimenti sugli animali sono stati condotti in conformità con le normative istituzionali nazionali in materia (protocollo nr.90/2016-PR). Le cellule di glia, al 3-4 passaggio, sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti contenenti vetrini copri oggetto (12mm) precedentemente rivestiti di Matrigel diluito in DMEM/F12 (1:40). In larga-scala, in genere vengono piastrate 200.000 cellule gliali per generare un monostrato uniforme da utilizzare per la semina di fibroblasti indotti chimicamente il mezzo di induzione neuronale, costituito da DMEM/F12 (1:1) integrato con 1% N-2, 2% B-27, 40ng/mL GDNF, 20ng/mL fattore di crescita 1 insulina simile, 1mM GlutaMAX e 100M cAMP. In piccola-scala, i fibroblasti umani vengono coltivati su chip rivestito con Matrigel a 80 cellule/mm<sup>2</sup>. Per 24h le cellule sono mantenute in mezzo per fibroblasti, al termine delle quali il mezzo viene completamente sostituito con il mezzo di induzione neuronale.

Sia a larga sia a piccola scala i cambiamenti nella morfologia delle cellule differenzianti nelle varie fasi di induzione sono stati osservati mediante microscopia a contrasto di fase.

#### Immunofluorescenza

Le cellule sono state fissate per 10min in paraformaldeide al 4% in PBS contenete saccarosio al 4%, permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,2% in PBS per 3 minuti, lavate 3 volte per 5 minuti con PBS. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in PBS contenete 3% di albumina di siero bovino e 0,05% di Tween-20 e incubati 1h a 37°C. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari (60 min, 37°C): TUB III (1:500, MAB1637 Rb, Millipore, Burlington, MA, USA e topo NB110-57611, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), TAU ( 1:200, coniglio MAB10417, Millipore, Burlington, MA, USA), MAP2 (1:250, coniglio AB5622, Millipore, Burlington, MA, USA) e (topo M4403, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), NeuN (1 :250, ABN78 coniglio, Millipore, Burlington, MA, USA), Synapsin I (1:250, AB1543 Rb, Millipore, Burlington, MA, USA), DCX (1:300, sc-8066 capra, Santa Cruz), - Amiloide 4G8 (1:200, SIG39220 topo, Millipore, Burlington, MA, USA), -Amiloide 1-40/42 (1:200, AB5076 coniglio, Millipore, Burlington, MA, USA), GFAP (1:500, AB5804 coniglio, Sigma-Aldrich, Milano, Italia), - Sinucleina (1:250, sc-12767 topo, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), fosfo-TAU T205 (1:200, ab4841 coniglio, Abcam, Cambridge, Regno Unito ), fosfo-TAU S396 (1:200, sc-101815 coniglio, Santa Cruz, Dallas, TX, USA), TDP43 (1:200, 6H6E12 topo, Proteintech). Dopo l'incubazione e il risciacquo degli anticorpi primari, i coprioggetti sono stati incubati con anticorpi secondari marcati con un fluoroforo: IgG anti-topo, anti-coniglio o anti-capra alexa-488, -555 o -647 (Molecular Probes, Millipore, Burlington, MA, USA) , che sono stati utilizzati in diverse combinazioni a seconda degli anticorpi primari. I nuclei con colorazione di contrasto Hoechst 33258 o con propidio ioduro dopo il trattamento con RNasi. I vetrini coprioggetto sono stati montati nel supporto antifade Prolong Glass e i campioni sono stati osservati per la prima volta con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse 80i, dotato di un sistema VideoConfocal (ViCo).

#### Microscopia Elettronica

I ciNs di controllo, AD e PD a 17 DIV piastrati su glia murina, saranno fissati in gluteraldeide 2.5% in tampone fosfato per poi essere lavati più volte in tampone fosfato e successivamente fissate in tetraossido di osmio 1%. Dopo la fissazione in osmio si procederà alla disidratazione in ordine crescente di etanolo 30,50,70,95 e assoluto, fino ad inclusione, in resina epon812 lasciate polimerizzare in stufa a 60° C per 36h. Una volta ottenuto un blocchetto i campioni cellulari, saranno tagliati con ultramicrotomo ottenendo sezioni da 70nm. Le sezioni ottenute verranno colorate ed infine osservate al microscopio elettronico a trasmissione (JEOL1400P).

#### Elettrofisiologia

Per la valutazione funzionale (elettrofisiologia) dei ciNs, ottenuti in microfluidica, i fibroblasti saranno piastrati su gelatina (10.000-15.000 cellule / pozzetto in piastre da 24 pozzetti) e coltivati

per 1 giorno in terreno DMEM contenente alto glucosio con 10 % Siero fetale bovino, 1 mM glutamax, 0.1 mM aminoacidi non essenziali e antibiotici. Quindi, le cellule saranno coltivate in un mezzo di induzione neuronale contenente: DMEM/F12: Neurobasal [1:1] con 0,5% N-2, 1% B-27, 100 microMcAMP e 20 ng/ml bFGF ed antibiotici, aggiungendo il cocktail VCRFSGY (VPA, CHIR99021, Repsox, Forskolin, SP600125, GO6983, Y-27632). Dopo 8 giorni, le cellule saranno piastrate su chip (canali di altezza 200micron x lunghezza 10mm x larghezza 1,5mm) su un monostrato di cellule gliali murine e coltivate in un terreno di iniziale maturazione neuronale contenente DMEM/F12: Neurobasal [1: 1] con 0,5% N-2, 1% B-27, 100 microMcAMP, 20 ng/ ml bFGF e il cocktail CFD (CHIR99021, Forskolin, Dorsomorphin). Infine le cellule saranno coltivate in un terreno neuronale contenente: DMEM/F12: Neurobasal [1:1] con 0,5% N-2, 1% B-27, 100 microMcAMP e 20 ng/ml bFG, 20ng / ml BDNF, 20 ng / ml GDNF e 20 ng / ml NT3. Una volta ottenuti Neuroni maturi (17Div) si procede all'apertura del chip e successiva analisi elettrofisiologica.

Il Laboratorio ha messo a punto la preparazione di colture cellulari neuronali umane indotte chimicamente (ciNs), mediante l'utilizzo di due differenti protocolli, derivanti da fibroblasti di pazienti affetti da Malattia di Alzheimer (AD) e malattia di Parkinson (PD) utilizzando dispositivi microfluidici (chip) e su vetrino coprioggetto in piastra.

Mediante l'utilizzo di questa metodica si è già constatato, in microscopia a fluorescenza, che i ciNs esprimono i tipici marcatori neuronali tra cui Tubulina  $\beta$ III, MAP2, Double-Cortin (DCX), Sinapsina. Ultimamente è stata anche rilevata la presenza di canali del sodio sulla membrana cellulare, che potrebbe essere associata alla funzionalità della membrana. Questa informazione si aggiunge a ciò che era già stato osservato riguardo alla presenza di proteine aggregate, nello specifico la forma oligomerica della Beta-Amiloide e fosfo-Tau in ciNs di pazienti con malattia di Alzheimer (AD) e Alfa-Sinucleina in ciNs di pazienti con malattia di Parkinson (PD) sia in microfluidica che in piastra. Nelle malattie neurodegenerative c'è una forte evidenza secondo la quale la disfunzione mitocondriale o la funzione anomala del mitocondrio si verificano precocemente, rappresentando quindi potenzialmente i primi biomarcatori della neurodegenerazione. Mediante l'utilizzo della microscopia elettronica a trasmissione si era già riscontrato un aumento del danno mitocondriale nei ciNs derivati da pazienti AD e PD. Nello specifico si sono osservate anomalie ultrastrutturali dei mitocondri, quali forme allungate, allungate e distorte, con matrice meno densa e grave perdita di creste o addirittura matrice vuota. Quindi è stata indagata più a fondo l'entità del danno con approcci della funzionalità e del metabolismo dei mitocondri. E' stato valutato il numero di copie del DNA mitocondriale estraendo RNA dai fibroblasti (T0) e a tempi diversi (T7 e T14 DIV) dopo il differenziamento indotto chimicamente. In seguito a differenziamento si è osservato un incremento di dieci volte delle copie di DNA mitocondriale. Si sta inoltre mettendo a punto la tecnologia Seahorse, per misurare il metabolismo cellulare mediante misurazione del tasso di consumo di ossigeno (OCR) e del tasso di acidificazione extracellulare (ECAR) nei fibroblasti (T0) e a tempi diversi (T7 e T14 DIV) dopo il differenziamento. Da alcuni esperimenti si è potuta evidenziare la presenza di una "capacità di riserva" OCR nei neuroni DIV14, assente nel fibroblasto T0, come segno di maturazione verso un metabolismo neuronale. Si è infine stimato il potenziale di membrana mitocondriale (mMP) da fibroblasti (T0) di 3 soggetti sani e 2 pazienti con FAD. Si è utilizzata una sonda denominata TMRE per la misurazione del mMP in un esperimento di video-fluorescenza e si è trovato che l'mMP da FAD era leggermente ma significativamente inferiore rispetto ai soggetti di controllo, inducendo a pensare che ci sia una sofferenza mitocondriale già nei fibroblasti FAD.

Metodi Futuri:

Il compartimento mitocondriale sarà studiato valutando l'efficienza della catena respiratoria mitocondriale e le attività glicolitiche misurando il tasso di consumo di ossigeno e il tasso di

acidificazione extracellulare utilizzando la tecnologia Seahorse (Agilent). La morfologia mitocondriale e il potenziale di membrana mitocondriale saranno valutati con la sonda fluorescente TMRE (tetrametilrodamina estere etilico) e Mito-Tracker mediante esperimenti di video imaging. Inoltre, la produzione mitocondriale di superossido sarà misurata dal colorante MitoSOX. Infine, sarà effettuata la misurazione del numero di copie del mtDNA e delle delezioni mediante digital droplet PCR, nonché l'alterazione della dinamica mitocondriale mediante l'espressione dei geni della dinamica mitocondriale e dello stato di fosforilazione di DRP1. L'analisi mitocondriale sarà effettuata anche nei fibroblasti per rilevare possibili differenze nelle condizioni di partenza.

Queste metodiche permetteranno approcci di diagnostica a costi e invasività ridotti.

Ci si attende di poter evidenziare differenze morfologiche (neuriti, spine, bottoni neurali) tra ciNS dei pazienti AD e PD e soggetti sani mediante microscopia elettronica a scansione.

Caratterizzazione funzionale e metabolica delle colture di ciNs consolidate derivate da fibroblasti FAD e PD e relativi soggetti di controllo.

La messa a punto della preparazione di colture cellulari neuronali umane indotte chimicamente (ciNs), derivanti da fibroblasti di pazienti affetti da Malattia di Alzheimer (AD) e malattia di Parkinson (PD), utilizzando dispositivi microfluidici (chip), potrebbe rappresentare uno strumento diagnostico meno invasivo ed a basso costo rispetto ad altre metodiche come quelle di imaging e la ricerca di marcatori nel liquor, utile soprattutto per valutazioni in parallelo di cellule provenienti da molteplici pazienti.

## **Laboratorio di Biochimica dell'Invecchiamento**

*Identificazione di determinanti cellulari e molecolari di malattia o di risposta alle terapie in pazienti affetti da patologie degenerative*

La possibilità di invecchiare in modo sano è garantita dal mantenimento dell'omeostasi metabolica e funzionale dei tessuti periferici e del sistema nervoso centrale. In particolare, il bilanciamento energetico/metabolico sistemico è garantito da organi come il fegato e il tessuto adiposo; quest'ultimo, insieme ai muscoli e soprattutto al sistema immunitario, è anche coinvolto in processi regolatori di segnalazione mediati da citochine e vescicole circolanti. Lo sviluppo delle patologie associate all'invecchiamento, sia di carattere metabolico che neurologico, sono il risultato di disfunzioni che non interessano necessariamente un distretto specifico ma possono dipendere da alterazioni in meccanismi biologici comuni come lo stress ossidativo, la degradazione proteica, l'epigenetica e le necessità metaboliche.

Recentemente, il ruolo dell'omeostasi metabolica degli organi periferici, in particolare fegato e tessuto adiposo, è stato fortemente associato al corretto funzionamento anche del sistema nervoso centrale, grazie alla secrezione di metaboliti e citochine anche in risposta ad alterazioni della loro proteostasi. L'identificazione e la caratterizzazione dei meccanismi cellulari alla base del metabolismo cellulare di organi metabolici periferici e della loro comunicazione con il sistema nervoso centrale sono fondamentali per disegnare nuove prospettive terapeutiche per la cura e la riabilitazione di diverse patologie di carattere metabolico (diabete, malattie cardiovascolari) e/o neurodegenerativo, sia genetiche che associate all'invecchiamento, anche attraverso l'introduzione di specifici protocolli nutrizionali.

Il progetto si prefige di:

- caratterizzare i fattori coinvolti nei processi di invecchiamento e neurodegenerazione focalizzando l'attenzione sulla regolazione dello stress ossidativo, del metabolismo e dell'epigenetica.



- analizzare le alterazioni dell'omeostasi del tessuto adiposo ed epatico con ricadute metaboliche sulla bioenergetica, stress ossidativo, proteostasi e infiammazione di tessuti periferici
- individuare nuovi meccanismi fisiopatologici per ampliare le prospettive terapeutiche/diagnostiche in ambito di molteplici patologie strettamente connesse con il metabolismo, altre inesplorate sotto questo aspetto (neurodegenerative, neuromotorie) ma fortemente associate con alterazioni del metabolismo energetico a livello sistemico durante l'invecchiamento e che possano essere a sostegno delle pratiche riabilitative dell'anziano.

Il progetto di ricerca è altamente innovativo in quanto mira ad indagare gli aspetti correlati alla perdita o al malfunzionamento degli organi periferici, del loro metabolismo e del loro secretoma, anche in caso di trasformazione neoplastica, che sono fortemente inesplorati nel contesto delle malattie neurodegenerative e dell'invecchiamento, anche se è ben nota la loro stretta associazione con disfunzioni metaboliche, perdita di massa grassa e muscolare.

Materiali e metodi:

Cellule e trattamenti: preadipociti bianchi (3T3-L1) e bruni (T37i), mioblasti murini (C2C12), linee macrofagiche murine e umane (Raw264.7; THP-1), linee microgliali (BV2) e cellule immortalizzate (HuS-E/2, Hek293) e trasformate (HepG2, Hep3B, HeLa) come modello di studio ideale vista la loro adattabilità a cambiamenti metabolici.

Per analizzare gli effetti dei cambiamenti metabolici sono utilizzati specifici protocolli di privazione di nutrienti o molecole che vanno ad impattare con le principali vie di catabolismo di lipidi e carboidrati, e con il funzionamento di organelli coinvolti nei processi metabolici, in particolare mitocondri e lisosomi.

Trasfezioni. Elettroporazione o trasfezione con agenti lipidici per la modulazione dell'espressione di proteine target in dipendenza del modello sperimentale (ad esempio, ATGL, ASPA, NAT8L, LAMP2, SOD1 wt e mutata). Topi C57BL/6 WT. Modelli murini di patologia.

Altre metodologie. Saggi biochimici: trigliceridi, glicerolo, enzimi della beta-ossidazione, ATP, consumo di ossigeno, citochine infiammatorie. Immunoistochimica; Analisi delle proteine: BN-PAGE, co-IP, Western blot. Determinazione di GSH e NAA tramite HPLC Biologia molecolare: RT-qPCR, CHIP..

Biologia cellulare: microscopia confocale, citofluorimetria. Analisi istologiche, separazione dei vari organelli cellulari, co-culture

Gli adattamenti metabolici delle cellule sono fondamentali oltre che per i processi fisiopatologici in risposta alla disponibilità di nutrienti, anche per rispondere all'esposizione a farmaci, tra cui quelli usati per la riabilitazione a livello cellulare. Sede principale di regolazione metabolica è il mitocondrio, dove convergono tutti i tipi di catabolismo delle biomolecole in condizioni aerobiche. In particolare, l'utilizzo dei lipidi è strettamente vincolato a vie metaboliche mitocondriali e per questo motivo fortemente connesso con quei meccanismi che governano il giusto equilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) mitocondriali e le difese antiossidanti. Le specie reattive dell'ossigeno, se non ben tamponate, concorrono a determinare l'insorgere di patologie metaboliche, neurodegenerative e favoriscono l'invecchiamento. Analisi del ruolo del mitocondrio e dello stato redox nella coordinazione di risposte metaboliche e cellulari anche in relazione ad altri organelli, tra cui i lisosomi, sono state effettuate in vitro e verranno validate su modelli di patologia.

## Laboratorio di Citofluorimetria

*Il sistema immunitario nella restitutio ad integrum: fenotipo e attività di linfociti, granulociti e monocito/macrofagi in corso di riabilitazione*

Cellule, tessuti ed organi del sistema immunitario sono coinvolti nel mantenimento dell'omeostasi dell'organismo. Il sistema immunitario, classicamente studiato per il suo ruolo nella difesa da patogeni o, più in generale, da qualsiasi danno tissutale, è altrettanto coinvolto nei meccanismi di risoluzione dell'infiammazione, del ritorno all'omeostasi e del recupero della funzione da parte del tessuto o dell'organo colpito dal danno. Date queste premesse, una variazione del numero o dell'attività di una data popolazione cellulare può essere utilizzata come marcatore di patologia, o come marcatore prognostico. Le cellule che compongono il sistema immunitario possono essere facilmente analizzate nel sangue periferico dei pazienti e, a seconda del tipo di molecole (immunofenotipo) che esprimono sulla membrana cellulare o all'interno del citoplasma, possono essere suddivise in sottopopolazioni con ruoli e funzioni differenti. La definizione dell'immunofenotipo viene effettuata tramite citofluorimetria e può essere correlata a diversi stati clinici dei pazienti studiati.

L'ipotesi alla base di questo progetto è che le popolazioni del sistema immunitario, essendo plastiche e versatili, cambino il loro "aspetto" (inteso come numerosità di una certa popolazione cellulare, o espressione di marcatori di attivazione) a seconda della patologia presa in esame e, soprattutto, a seconda della risposta dell'organismo alle terapie riabilitative. La dimostrazione di questo postulato permetterebbe di avere nuovi marcatori in grado di definire precocemente il grado di risposta ad una certa terapia.

L'obiettivo del progetto è quello di valutare lo stato del sistema immunitario in corso di terapie riabilitative o preventive. In particolare, vengono valutati:

1. L'espressione dei recettori per gli oppioidi endogeni sulla membrana di cellule del sistema immunitario, in corso di fibromialgia (in collaborazione con il laboratorio di Fisiologia e Farmacologia del Dolore).
2. L'immunofenotipo di linfociti T, B e NK e di monociti di pazienti con emicrania episodica ad alta frequenza, in terapia chetogenica. La dieta chetogenica, che permette di ridurre in poco tempo il tessuto adiposo, potrebbe avere effetti rilevanti anche sull'infiammazione e sul tipo di linfociti circolanti (effettori o regolatori) (in collaborazione con il laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare e con l'Area Dolore Neuropatico e Cefalee)
3. L'immunofenotipo di linfociti T, B in pazienti affetti da patologie neurodegenerative e in modelli murini di sclerosi multipla, in collaborazione con il gruppo di Immunologia Sinaptica
4. Composizione dell'infiltrato infiammatorio nelle alte vie aeree di pazienti con Broncopneumopatia cronica ostruttiva a rischio di infezione da patogeni opportunisti, in corso di riabilitazione respiratoria (in collaborazione con il laboratorio di microbiologia delle patologie degenerative e con la UO di riabilitazione respiratoria)
5. L'immunofenotipo di pazienti con patologie genetiche rare (in collaborazione con il gruppo di Genetica Funzionale Umana)

I risultati attesi riguardano:

- definizione della firma immunologica (immunofenotipo) specifica per la patologia in esame
- Identificazione di marcatori molecolari utilizzabili come fattori diagnostici o prognostici.

Il sistema immunitario raggiunge ogni distretto dell'organismo umano e, per questo motivo, può essere utilizzato come segnalatore di stati di malattia o di recupero dalla malattia. La citofluorimetria è sempre stata utilizzata per analizzare il sistema immunitario in corso di patologie che lo coinvolgessero direttamente nell'etiologia o nella patogenesi. L'innovazione dell'approccio

sta nell'utilizzare l'analisi del sistema immunitario in corso di patologie non direttamente correlate ad un'alterazione dell'omeostasi immunitaria.

I prelievi ematici o di fluidi biologici arrivano al centro ricerche identificati con un codice alfa numerico. Le procedure di marcatura del campione sono effettuate secondo metodi standard e comunque seguendo le indicazioni del produttore dei kit utilizzati. In particolare, per l'analisi del fenotipo gli anticorpi marcati con fluorocromi sono aggiunti direttamente a 100ul di sangue trattato con anticoagulanti (K2EDTA) e incubati per 15 minuti a 4°C. Successivamente si aggiunge una soluzione di lisi ipertonica che elimina gli eritrociti, lasciando integri i leucociti. Il campione così trattato è pronto per l'analisi citofluorimetrica. Per lo studio dell'infiltrato leucocitario infiammatorio nell'espettorato di pazienti con BPCO, il campione viene trattato con una soluzione di lisi per digerire la componente mucosa e lasciare le cellule intatte in sospensione.

*Risultati ottenuti:*

1. L'analisi dell'espressione dei recettori per gli oppioidi sui linfociti NK in pazienti con fibromialgia e in pazienti con osteoartrite ha dimostrato come, nei soggetti con dolore cronico (sia da fibromialgia che, in misura minore, da osteoartrite) ci sia una diminuzione di cellule NK esprimenti il recettore Mu per gli oppioidi endogeni. I risultati di questo studio sono raccolti in un manoscritto che è sottomesso per la pubblicazione. (Studio in collaborazione con il laboratorio di Fisiologia e Farmacologia del dolore.)
2. Lo studio "EMIKETO" è terminato, con 56 pazienti arruolati e analizzati per l'immunofenotipo a tre tempi diversi dall'inizio del trattamento con regime alimentare chetogenico. Sono in corso le analisi statistiche di correlazione tra i dati biologici e i dati clinici dei pazienti coinvolti.
3. Per lo studio in collaborazione con il Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica, sono stati effettuati esperimenti su modelli preclinici murini di sclerosi multipla, nei quali si è evidenziato un effetto positivo dell'esercizio fisico sulla diminuzione dell'infiammazione
4. Per lo studio dell'infiltrato infiammatorio nell'espettorato di pazienti con BPCO (studio PATO-ESCAPE, Laboratorio di Microbiologia ) sono stati arruolati 5 pazienti dei quali sono stati analizzato l'espettorato e il sangue periferico per la ricerca di eosinofili attivati, linfociti T regolatori, neutrofili e monociti attivati. Lo studio è in fase di arruolamento e continuerà per tutto il 2023.
5. Per lo studio in collaborazione con il Laboratorio di Genomica Umana Funzionale, è stato valutato l'immunofenotipo di pazienti con mutazioni di nuova descrizione associati a fenotipi clinici già conosciuti.

Lo studio del sistema immunitario in corso di patologie non direttamente correlate a difetti del sistema immunitario stesso (immunodeficienze, autoimmunità) può essere utile nell'identificazione di biomarcatori direttamente coinvolti nella patogenesi di una malattia, oppure i cui livelli siano modificati dalle terapie riabilitative, utili nella pratica clinica come strumenti diagnostici e prognostici per una terapia efficace e personalizzata.

*Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie in pazienti con ictus ischemico: immunofenotipo e correlazione con l'outcome riabilitativo*

In collaborazione con il Reparto di Riabilitazione Neuromotoria

L'ictus ischemico rappresenta una delle principali cause di morte nel mondo occidentale; inoltre è la causa della maggior parte delle disabilità acquisite. Esiste una relazione riconosciuta, e principalmente descritta in modelli murini, tra risposta immunitaria e danno al sistema nervoso centrale, in seguito ad ictus ischemico. In particolare, è stato descritto uno squilibrio tra le percentuali circolanti di linfociti Th17 proinfiammatori e linfociti T regolatori (Treg). Questo squilibrio favorirebbe l'effetto deleterio dell'infiammazione in corso di ischemia. Dopo pochi giorni dall'insorgenza dell'ictus ischemico si osserva una contrazione della risposta immunitaria, con

linfopenia e riduzione del volume della milza, funzionalità ridotta dei monociti, aumento delle citochine anti-infiammatorie e apoptosi dei linfociti.

L'ipotesi alla base di questo studio è che il sistema immunitario in pazienti colpiti da ictus possa riflettere il tipo di risposta compensatoria messa in atto dall'organismo e che differenti fenotipi osservati possano essere correlabili a diversi quadri clinici e, potenzialmente, a diversi tipi di risposta alla terapia riabilitativa. Se così fosse, un'analisi relativamente semplice da prelievo ematico potrebbe fornire al clinico informazioni utili ad instaurare una più efficace terapia riabilitativa, diversa a seconda dell'immunofenotipo riscontrato.

Obiettivo primario dello studio consiste nell'effettuare una valutazione dell'esistenza di una correlazione tra immunofenotipo ed outcome riabilitativo alla dimissione in pazienti sottoposti a trattamento riabilitativo intensivo dopo ictus ischemico.

L'obiettivo secondario nel definire in vitro l'esistenza di un meccanismo citotossico diretto dei linfociti su cellule neuronali e gliali.

I principali risultati attesi sono:

- Identificazione di sottopopolazioni linfocitarie la cui frequenza possa essere associata alla risposta riabilitativa
- Identificazione in vitro di meccanismi di danno cellulare neuronale mediati dai linfociti T dei pazienti.

L'associazione tra ischemia e infiammazione è nota, tuttavia ancora non è stato definito il ruolo che il sistema immunitario svolge in corso di terapie riabilitative, né se le popolazioni linfocitarie possano essere influenzate dalle terapie nel paziente con ictus ischemico. I risultati di questo studio potranno dare un quadro delle variazioni del sistema immunitario dopo terapia riabilitativa, e possibilmente anche una relazione tra variazioni significative nelle popolazioni linfocitarie e recupero delle funzioni.

Lo studio comprende i pazienti con stroke ischemico afferenti al reparto di Riabilitazione Neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele. I pazienti, adeguatamente informati rispetto agli scopi dello studio e solo dopo aver firmato il consenso alla partecipazione, sono sottoposti ad un prelievo di sangue venoso all'ingresso e alle dimissioni dal reparto. I pazienti sono trattati secondo le terapie standard. I campioni sono analizzati per la definizione dell'immunofenotipo secondo protocolli standard, utilizzando il citofluorimetro LSR Fortessa X-20.

Al 31/12/22 sono stati reclutati 29 pazienti ricoverati per ictus ischemico. I risultati preliminari mostrano che, in seguito ai due mesi di ricovero per riabilitazione neuromotoria, la media della percentuale di linfociti CD4 diminuisce, e aumentano i linfociti NK. E' interessante notare una diminuzione dei linfociti Th17 che passano da un valore medio di 0.08% (sui CD4+) ad un valore di 0.02%. Questo potrebbe indicare un effetto antiinfiammatorio della terapia riabilitativa in pazienti con stroke ischemico.

*Studio pilota di intervento non farmacologico per la valutazione del fenotipo e dello stato di attivazione degli eosinofili in pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)*

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) rappresenta la quarta causa di mortalità nel mondo. E' caratterizzata, oltre che da una elevata morbilità, anche ad un'importante alterazione della qualità della vita, e costi elevati per il paziente e per il Sistema Sanitario Nazionale. L'insufficienza respiratoria, che insorge nelle fasi avanzate della BPCO contribuisce a renderla una delle patologie più costose in termini di consumo di risorse. Nel 30% dei pazienti con BPCO si osserva un aumento del numero di eosinofili circolanti (più del 2% dei globuli bianchi o più di 300 eosinofili/microlitro) e nelle vie aeree; in questi pazienti, seppure mostrino una migliore risposta alla terapia antiinfiammatoria steroidea, hanno un significativo aumento del rischio di

esacerbazioni. Non esistono descrizioni del ruolo degli eosinofili nella patogenesi della BPCO né quale sia il motivo per cui un aumento del loro numero porti ad un aumentato rischio di esacerbazioni. L'analisi citofluorimetrica permette di studiare le funzioni degli eosinofili, analizzandone il fenotipo, in particolare l'espressione di molecole correlate all'attivazione degli eosinofili stessi.

L'ipotesi alla base di questo progetto di ricerca è che gli eosinofili esprimano differenti marcatori a seconda del fenotipo clinico dei pazienti con BPCO. Inoltre, ci si aspetta che un certo fenotipo degli eosinofili possa essere associato ad una migliore o peggiore risposta alla terapia riabilitativa. Se queste ipotesi dovessero rivelarsi corrette, si saranno ottenuti dei nuovi marcatori di prognosi, che possano essere per il medico uno strumento utile ad impostare una terapia personalizzata.

L'obiettivo primario dello studio consiste nel valutare la presenza di alterazioni del fenotipo degli eosinofili in corso di BPCO durante le esacerbazioni e in remissione.

L'obiettivo secondario consiste nel verificare il ruolo patogenetico degli eosinofili in corso di BPCO, valutando la produzione di citochine pro infiammatorie.

Risultato atteso: aumento delle molecole legate all'infiammazione sugli eosinofili di pazienti con BPCO frequenti esacerbazioni rispetto ai BPCO stabili.

Il protocollo di studio coinvolge un totale di 30 pazienti divisi in due gruppi (15 per gruppo) di età > 18 anni, di entrambi i sessi. I due gruppi sono così formati:

- pazienti ricoverati in seguito ad esacerbazione. Per la definizione delle esacerbazioni, si segue il sistema EXACT
- pazienti senza episodi di esacerbazione negli ultimi 3 mesi, non ricoverati ma afferenti all'ambulatorio per visita di controllo.

Il fenotipo degli eosinofili nei pazienti con esacerbazione (gruppo A) è valutato al momento dell'ammissione in reparto (prelievo P1) e confrontato con il fenotipo degli stessi pazienti (gruppo A) alla dimissione (prelievo P2), oltre che con il fenotipo degli eosinofili di pazienti non in fase di esacerbazione (gruppo B). Per il gruppo B è previsto solo il prelievo P1.

Analisi dei campioni.

Marcatura degli eosinofili e acquisizione al citofluorimetro.

Il sangue trattato con anticoagulante (NaEDTA) è conservato a temperatura ambiente ed utilizzato entro 24 ore dal prelievo. I campioni sono marcati con i seguenti anticorpi: anti-CD45, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD66, anti-CD125, anti-CD193, anti-Siglec-8, anti-CD294, anti-CD63. Dopo l'incubazione i globuli rossi sono lisati con FACS Lysing Solution 1X. I campioni sono acquisiti e analizzati al citofluorimetro LSR Fortessa X20.

Analisi della produzione di citochine

I campioni di sangue periferico sono incubati con o senza LPS, in presenza di BFA. Al termine dell'incubazione è effettuata una marcatura di superficie con i seguenti anticorpi: anti-CD45, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD66. Successivamente, i campioni sono fissati e permeabilizzati con il reagente Cytotfix/CytoPerm (BD Bioscience) e marcati con anticorpi anti-IL-2 e anti-IL-4. I campioni saranno acquisiti e analizzati al citofluorimetro Fortessa.

Al 31/12/2022 sono stati reclutati 9 pazienti con BPCO (dall'inizio dello studio).

Si prevede l'arruolamento di altri 6 pazienti con BPCO ricoverati per esacerbazione e di 10 pazienti con BPCO stabili, afferenti all'ambulatorio per visite di controllo. I prelievi di sangue ottenuti dai pazienti arruolati sono analizzati per verificare la presenza di eosinofili attivati prima e dopo il trattamento riabilitativo.

## **Laboratorio di Fisiologia e farmacologia del dolore**

*Individuazione e studio di markers biologici coinvolti nel pathway del dolore acuto e cronico*

Il dolore cronico rimane ancora una sfida importante della medicina moderna; è una condizione che affligge milioni di persone in tutto il mondo, ne limita la produttività e ne diminuisce la qualità della vita. Il dolore neuropatico, ad esempio, rappresenta una condizione dolorosa cronica derivante da una patologia o dalla lesione del sistema nervoso somato-sensoriale e costituisce una sofferenza globale che colpisce persone di ogni età, genere ed etnia con un impatto socioeconomico significativo.

Nonostante gli anti-infiammatori non steroidei (FANS) rappresentino la classe di farmaci più comunemente utilizzata per il trattamento degli stati dolorosi acuti di lieve/moderata intensità, spesso questi si rivelano poco utilizzabili nel trattamento degli stati cronici a causa degli effetti collaterali ad essi associati (Doyle et al., 2011). Anche gli analgesici oppiacei, come la morfina, sono i pilastri della gestione del dolore acuto e cronico; la loro utilità clinica è spesso ostacolata dallo sviluppo della tolleranza analgesica e dall'ipersensibilità dolorosa, nota anche come iperalgesia indotta dalla morfina (Lauro et al. 2016). Lo sviluppo della tolleranza al trattamento con morfina richiede dosi crescenti per ottenere un equivalente sollievo dal dolore (Mao et al. 1995), causando, a lungo termine, effetti collaterali debilitanti come un over-sedazione, ridotta attività fisica, depressione respiratoria, stitichezza e persino dipendenza. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della patogenesi della "malattia da stato di dolore" è cruciale per lo sviluppo di strategie terapeutiche per mantenere l'efficacia degli oppiacei durante il dosaggio cronico senza generare tolleranza o effetti collaterali inaccettabili. La problematica cruciale del dolore è quella di identificare a livello molecolare i pathway(s) che sostengono la segnalazione nocicettiva una volta che l'infiammazione ha esaurito il suo ruolo omeostatico fisiologico.

È noto che l'iperalgesia, che si manifesta in seguito a un danno tissutale o infiammazione, è il risultato di uno stato persistente iniziale di sensitizzazione delle fibre afferenti periferiche e di una successiva sensitizzazione spinale dovuta al rilascio dell'amminoacido eccitatorio glutammato (Watkins et al., 2001). Il meccanismo alla base di questo processo è molto complesso e vede il coinvolgimento di mediatori dell'infiammazione sia a livello periferico che centrale. Numerosi studi hanno dimostrato come sia il superossido (SO) che il perossinitrito (PN) siano fortemente coinvolti nello sviluppo e nel mantenimento dell'iperalgesia (Salvemini et al., 2006).

Come conseguenza della respirazione e dell'attività enzimatica, le cellule possono generare forme ridotte di O<sub>2</sub> chiamate generalmente "specie reattive dell'ossigeno" (ROS). La molecola gassosa ossido nitrico (NO) ed i suoi derivati, prodotti anch'essi all'interno della cellula, definiscono una sottoclasse di specie reattive denominate "specie reattive dell'azoto" (RNS) (Pryor et al., 2006). Quando la produzione in eccesso di ROS/RNS supera la capacità della cellula di eliminare queste specie si parla, rispettivamente, di stress "ossidativo" o "nitrosativo" (Pryor et al., 2006). L'aumento della produzione di ROS intracellulare è regolato non solo dalla fisiologica produzione da parte del metabolismo, ma anche da una molteplicità di fattori quali xenobioti, farmaci, citochine e fattori ambientali (radiazione ultravioletta solare, radiazione ionizzante e fumo di sigaretta) (Halliwell et al., 1999). I ROS, quando prodotti ad alte concentrazioni, causano una progressiva modificazione o degradazione a carico delle principali macromolecole biologiche (Halliwell et al., 1999) causando lo sviluppo di diverse patologie come malattie cardiovascolari, disordini neurodegenerativi, artrite reumatoide e malattie infiammatorie del polmone (Droge, 2002). Numerosi studi hanno dimostrato che l'inibizione farmacologica della sintesi di ossido nitrico (NO) e la rimozione farmacologica di SO e PN possono prevenire e revertire meccanismi associati con il dolore infiammatorio, dolore neuropatico e stati di tolleranza indotta dalla morfina (Muscoli C. et al, 2004, 2007; Doyle T. et al 2010). Considerando tutti questi dati, sembra che lo stress ossidativo sia in grado di avviare il processo ed è anche in grado di far rispettare lo stato del

dolore attraverso modifiche post-traduzionali come la nitrificazione, la carbonilazione, l'acetilazione, creando un circolo vizioso.

Nella pratica clinica, il dolore cronico è un importante problema di salute che colpisce circa un sesto della popolazione mondiale. La maggior parte degli studi sul dolore sono centrati sugli esseri umani. Il più grande limite di questo approccio è che questi studi mirano principalmente a caratterizzare gli stati del dolore e, solo una piccola percentuale verifica direttamente i meccanismi biochimici o patofisiologici del dolore.

Lo scopo del progetto è quello di identificare i meccanismi molecolari coinvolti nel mantenimento e nell'amplificazione del dolore cronico anche dopo che l'infiammazione ha esaurito il suo ruolo omeostatico e identificare biomarcatori prognostici o terapeutici di dolore, per lo sviluppo di una mirata terapia in grado di sviluppare un programma personalizzato di riabilitazione.

Recentemente è stato attribuito alla disfunzione mitocondriale un ruolo fondamentale nella patogenesi del dolore cronico (Schwartz et al., 2008). In seguito a una prolungata esposizione a stress biochimici, l'over-produzione di ROS supera la capacità d'azione dei sistemi antiossidanti, causando un eccesso di accumulo di superossido, perossido d'idrogeno e radicale idrossile. L'aumentata produzione di ROS altera il genoma mitocondriale e il proteoma attraverso una serie di meccanismi quali la produzione dei prodotti della perossidazione lipidica (malonildialdeide e 4-idrossinonenale), che si accumulano in quantità patologiche vicino alle membrane cellulari ricche di lipidi (Roede et al. 2010). Uno studio recente ha dimostrato che circa il 20% delle proteine mitocondriali sono acetilate, identificando la sirtuina 3 (SIRT3) come enzima chiave nella regolazione del proteoma mitocondriale.

Si è quindi ipotizzato che la modificazione post-traduzionale delle proteine cellulari chiave (come ad esempio SIRT3, MnSOD) possa costituire un importante pathway utilizzato dai radicali liberi per mediare lo sviluppo e il mantenimento del dolore di diversa eziologia. Si intende ottenere una dimostrazione del coinvolgimento di proteine target cellulari (quali le sirtuine) nel dolore acuto e cronico utilizzando agenti farmacologici consolidati e innovativi (antiossidanti) per alleviare lo stress ossidativo correlato alla produzione di ROS.

Inoltre, ad oggi, la terapia con gli oppiacei è al centro di un lungo dibattito, a causa del loro duplice ruolo nell'alleviare il dolore cronico e allo stesso tempo indurre tolleranza e dipendenza. Il trattamento con gli oppioidi per il dolore non oncologico non ha una standardizzazione a causa della mancanza di dati statistici sull'efficacia a lungo termine e sulla giusta dose di utilizzo dei farmaci.

Recentemente è stato osservato come un'eccessiva risposta infiammatoria svolga un ruolo chiave nella patofisiologia del dolore cronico e come diversi oppioidi o la diversa somministrazione di oppioidi inducano vari effetti sul sistema immunitario, quali la stimolazione immunitaria, l'immunosoppressione, o entrambi. Questa evidenza permette di studiare un approccio innovativo per controllare lo sviluppo e la progressione della malattia (Morgan et al. 2011).

Le profonde interazioni tra sistema nocicettivo-immunitario e oppioide e la presenza di un recettore oppioide periferico, estratto dal sangue, su cui i sistemi esprimono le loro interazioni, apre nuovi scenari sulla possibilità di avere un trattamento guidato da marker biologici, che definiscono uno standard terapeutico.

Pertanto, i recettori per gli oppioidi sulle cellule periferiche del sangue potrebbero essere considerati dei marcatori biologici, portando a innovative diagnosi e trattamenti del dolore cronico. L'espressione e la funzione dell'analisi dei recettori in cellule del sangue potrebbero essere rilevanti per la selezione dei farmaci e l'impostazione della dose standard personalizzata.

Pertanto, attraverso un approccio genetico ed epigenetico, che coinvolge sia animali che uomo, è possibile rilevare dei marcatori biologici utili a prevedere la risposta agli oppioidi. Questo potrebbe

essere utile per ottenere il trattamento più sicuro ed efficace, riducendo al minimo gli effetti collaterali, come l'OIH e la tolleranza.

Gli obiettivi che il progetto si prefigge di perseguire:

- Trovare nuovi target biologici per approcci terapeutici innovativi per la diagnosi e la cura del dolore di diversa eziologia.
- Coinvolgere le proteine target cellulari nel dolore cronico utilizzando agenti farmacologici consolidati e innovativi (antiossidanti) per alleviare lo stress ossidativo correlato alla produzione di ROS.
- Effettuare una analisi qualitativa e quantitativa dei recettori oppioidi sulla membrana dei linfociti di sangue periferico di animali e uomo, per valutare se possano essere identificati come marker idonei per lo sviluppo del dolore cronico.

I risultati attesi dallo studio sosterranno l'ipotesi secondo la quale la nitratura di proteine chiave, e la carbonilazione delle sirtuine, coinvolte nella regolazione dell'omeostasi della trasmissione del segnale, siano gli elementi chiave dell'azione citotossica dei radicali liberi, durante lo sviluppo ed il mantenimento del dolore sia acuto che cronico.

Risultati significativi dell'approccio tecnologico e dell'ipotesi potrebbero identificare nuovi pathways, che possono essere sfruttati, per esempio, nel trattamento con gli oppioidi o per la gestione del dolore di varia natura. L'ampia implicazione delle scoperte suggerisce che la nitratura proteica dei residui tirosinici e la carbonilazione, sono dei possibili bersagli per la manipolazione terapeutica.

Inoltre, studiare i recettori oppioidi presenti sulla membrana del tessuto periferico è utile a valutarne la loro possibile funzione di biomarcatori al fine di identificare una terapia personalizzata in pazienti che soffrono di dolore, utile anche per una migliore gestione del programma riabilitativo.

Questo progetto si focalizza sugli aspetti più innovativi della ricerca sul dolore, la cui integrazione è importante per progredire nel campo della medicina personalizzata. L'approccio epigenetico e immunologico sembra essere promettente per un approccio terapeutico innovativo e più personalizzato che implica la possibilità di prescrivere il farmaco più adatto per i pazienti dolorosi, evitando perdite di tempo e possibili effetti collaterali nel trovare il farmaco giusto.

Il progetto di ricerca è rivolto all'identificazione di nuovi farmaci e/o markers biologici al fine di trovare una nuova terapia che potrebbe essere più efficace e sicura per il paziente. La scoperta di questo tipo di farmaco è fondamentale nella terapia del dolore in cui la complessità della patofisiologia della malattia richiede un nuovo approccio terapeutico per trattare la malattia, migliorare la funzione del paziente e le sue capacità lavorative. In questo modo si intende contribuire alla individuazione di nuovi approcci terapeutici finalizzati al miglioramento della qualità della vita e non solo al trattamento di una specifica malattia.

Studio preclinico:

Gli animali sono sottoposti a somministrazione di carragenina/oxaliplatino/paclitaxel, rispettivamente per via intraplantare o intraperitoneale in presenza o assenza di diversi antiossidanti di origine naturale. Per dimostrare il coinvolgimento delle sirtuine durante lo stato di dolore, gli animali vengono sottoposti anche alla legatura del nervo sciatico (CCI) utilizzando il modello ben noto di di Bennett (Bennett G.J. & Xie Y.K. 1988) in presenza o meno di antiossidanti.

L'iperalgia termica viene valutata misurando il tempo di latenza del ritiro della zampa a uno stimolo termico attraverso l'apparato di Hargreaves (Planta test), l'allodinia e l'iperalgia meccanica vengono misurate rispettivamente attraverso i filamenti di Von Frey e il Randall-Selitto. Vengono effettuati saggi enzimatici funzionali per la valutazione della formazione dei prodotti della perossidazione lipidica, come la malondialdeide (MDA), e a questi, saranno associate analisi biochimiche per la misurazione dell'attività di enzimi target e per l'identificazione di biomarcatori



periferici. Inoltre, verrà esaminata la correlazione temporale tra la produzione dei prodotti della perossidazione lipidica, quali la malondialdeide (MDA), la nitratura e disattivazione di proteine target, come MnSOD, GLT1, GS.

#### Studio clinico

Vengono reclutati pazienti con diversa tipologia di dolore cronico con un'età superiore a 18 anni in grado di firmare il consenso informato. Sono esclusi dallo studio i pazienti che al momento dell'arruolamento sono in trattamento con oppioidi a causa degli effetti che essi potrebbero avere sui recettori oppioidi e sull'attività dei linfociti. Tutti i pazienti affetti da patologie con dolore cronico e le persone senza dolore vengono sottoposti ad una serie di esami clinici. Vengono, inoltre, effettuati questionari sulle caratteristiche socio-demografiche, sulla durata del dolore, sulla presenza di altre patologie e sui trattamenti in corso a cui pazienti sono sottoposti. Il dolore clinico viene valutato tramite una scala numerica di valutazione (NRS) 0-10, con 0 per "nessun dolore" e 10 per "il peggior dolore immaginabile".

Viene prelevato il sangue periferico dei pazienti reclutati e le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) vengono isolate mediante centrifugazione in gradiente di densità su Ficoll e incubate con diversi anticorpi coniugati con fluorocromo, specifici per cellule B e natural killer (NK), in combinazione con l'anticorpo anti- $\mu$  Opioid Receptor (MOR).

E' stato dimostrato l'effetto protettivo dell'estratto polifenolico del bergamotto (BPF) in un modello murino di tolleranza alla morfina (in press). In particolare si è osservato che dosi ripetute di morfina per 4 giorni nei topi sviluppano tolleranza antinocicettiva, associata alla produzione di superossido e che la co-somministrazione di morfina con BPF (25mg/Kg) o MnTBAP (10mg/Kg) è in grado di inibire questi effetti.

Si è osservato che queste condizioni sono associate al coinvolgimento delle proteine glutammina sintetasi (GS), GLT1 e SIRT3 mitocondriale e MnSOD durante la tolleranza alla morfina, portando anche a una condizione di nitratura e acetilazione delle proteine mitocondriali complessive. Questi dati confermano il coinvolgimento diretto di queste proteine con i radicali liberi durante la tolleranza agli oppioidi. In particolare, abbiamo osservato che SIRT3 subisce nitratura e disattivazione in questo modello di dolore e l'uso di BPF (25mg/Kg) e MnTBAP (10mg/Kg) ha impedito la nitratura di SIRT3, MnSOD, GS e GLT-1 inibendo lo sviluppo di iperalgesia durante la tolleranza agli oppioidi.

I risultati dello studio supportano l'ipotesi secondo cui le modificazioni post-traduzionali delle sirtuine sono un importante percorso utilizzato dal superossido/perossinitrito per mediare lo sviluppo e il mantenimento dell'iperalgesia indotta da oppioidi. La prevenzione delle modificazioni post-traduzionali, come la nitratura, e la risposta iperalgesica da parte degli antiossidanti indicano l'importanza dello sviluppo di un nuovo approccio terapeutico in grado di modulare la trasmissione del glutammato senza bloccare direttamente le azioni del glutammato.

Inoltre, i dati hanno mostrato che la co-somministrazione di morfina e BPF può essere un buon approccio terapeutico per la riabilitazione e il trattamento del dolore cronico grazie alla sua capacità di inibire lo sviluppo della tolleranza preservando le proprietà analgesiche della morfina.

I risultati attesi da questo studio sosterranno l'ipotesi che la nitratura di proteine selettive e la carbonilazione delle sirtuine coinvolte nella regolazione dell'omeostasi siano un elemento chiave per l'azione citotossica dei radicali liberi durante lo sviluppo e il mantenimento del fenomeno del dolore cronico. Inoltre, lo studio della modulazione del recettore  $\mu$  oppioidi sulle cellule B e NK costituisca un metodo valido per la misurazione del dolore, aiutando a stabilire un approccio innovativo per un percorso terapeutico e riabilitativo su misura programma.

## Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica

*Studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della sinaptopatia infiammatoria in modelli sperimentali di Sclerosi Multipla (SM)*

La SM è una malattia neurodegenerativa demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC) e rappresenta la principale causa di disabilità neurologica nel giovane adulto. Per molti anni è stata considerata una malattia infiammatoria della sostanza bianca, tuttavia un numero crescente di studi ha dimostrato anche un coinvolgimento della sostanza grigia. A tal proposito, grazie all'utilizzo di un valido modello animale di SM, l'Encefalomielite autoimmune sperimentale (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), è stato dimostrato che le citochine pro-infiammatorie, alterando la trasmissione sinaptica, inducono danno tissutale e deficit neurologici, indipendentemente dai processi demielinizzanti. In particolare, è stata riscontrata una sinaptopatia o danno/disfunzione a carico del sistema eccitatorio ed inibitorio in diverse aree del cervello EAE. Il prolungato aumento di glutammato nel SNC, accompagnato da un abbassamento del tono inibitorio mediato da GABA, costituisce un alto rischio di danno eccitotossico, probabile causa della patologia neuronale nella SM (Mandolesi et al., 2015; Henstridge et al., 2016).

L'obiettivo principale della ricerca è quello di studiare i meccanismi molecolari e cellulari alla base dell'interazione tra sistema immunitario e sistema nervoso nella patologia della Sclerosi Multipla.

A tale scopo sono stati condotti vari studi clinici che hanno permesso di indagare la relazione tra specifiche citochine liquorali e il decorso della malattia. Inoltre, gli studi sul modello sperimentale di SM, si sono concentrati sull'indagine dei meccanismi alla base della sinaptopatia infiammatoria, processo che, parallelamente alla demielinizzazione, si sviluppa nelle fasi precoci di malattia ed è potenzialmente reversibile. L'identificazione di biomarcatori e la caratterizzazione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base di tale meccanismo patogenetico, potrebbe permettere di individuare nuovi target molecolari per le attuali e future strategie terapeutiche (incluso l'esercizio fisico) ed eventualmente di identificare nuovi biomarcatori della malattia.

Tale ricerca viene condotta utilizzando un approccio multidisciplinare che comprende l'utilizzo di analisi biostatistiche e l'applicazione di tecniche di elettrofisiologia, biologia molecolare, biochimica, immunoistochimica, e di analisi comportamentale. Inoltre si utilizzano modelli animali di SM, quali l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) e modelli chimerici ex vivo di SM. Gli obiettivi che ci si prefigge di raggiungere sono i seguenti:

1. Identificare i fattori di rischio coinvolti nella progressione della SM andando a valutare le correlazioni tra l'andamento clinico della malattia e specifici parametri biologici (con particolare attenzione ai livelli delle molecole infiammatorie nel liquido cerebrospinale, CSF). Inoltre, grazie all'uso di modelli animali e modelli in vitro, scopo del nostro lavoro è l'identificazione dei meccanismi molecolari alla base della patogenicità di fattori solubili, quali citochine e fattori neurotrofici, rilasciati dalle cellule immunitarie (linfociti, microglia). L'ipotesi è infatti che i fattori solubili, circolanti nel liquido cerebrospinale dei pazienti SM, potrebbero avere un ruolo determinante nei meccanismi sinaptotossici e neurodegenerativi.
2. Valutare l'effetto neuroprotettivo di alcuni farmaci immunomodulanti/immunosoppressori capaci di superare la BBE. Obiettivo della nostra ricerca è di valutare se terapie farmacologiche, sia già in uso per la SM che non, possano avere un ruolo neuroprotettivo interferendo con specifici meccanismi alla base della sinaptopatia infiammatoria che caratterizza la SM e il suo modello animale.
3. Valutare come la sinaptopatia infiammatoria e gli assi regolatori coinvolti possano influenzare una diversa risposta clinica e comportamentale, valutata nei modelli murini di

SM, tramite lo studio dei deficit cognitivi o dei comportamenti simil ansiosi e –depressivi. È infatti noto che circa metà dei pazienti affetti da SM soffre di disturbi d’ansia e depressione, ma scarsa attenzione è stata rivolta a tali disturbi probabilmente a causa della limitata conoscenza dei meccanismi fisiopatologici che le determinano.

4. Valutare come lo stile di vita possa influenzare il decorso clinico della SM. L'esercizio fisico è infatti diventato una parte consolidata di molti programmi di riabilitazione SM. Studi clinici e preclinici indicano con forza l’effetto benefico delle terapie riabilitative per i pazienti con SM. Anche una corretta alimentazione può migliorare determinati aspetti della patologia e la comunità scientifica è sempre più interessata ad indagare il suo specifico ruolo sul decorso clinico della malattia. Ad oggi i meccanismi cellulari e molecolari alla base dell’effetto benefico di un corretto stile di vita nei pazienti affetti da SM sono ancora poco chiari. Attraverso l’analisi dei parametri clinici in pazienti SM che svolgo diverso tipo di attività fisica valuteremo l’effetto sulla patologia e grazie all’utilizzo dei modelli murini di SM, studieremo l’effetto benefico dell’esercizio fisico e dell’alimentazione sulla sinaptopatia e processi di demielinizzazione in varie aree cerebrali.
5. Studio dell’interazione virus-ospite nelle malattie neurodegenerative, con particolare riferimento al virus di Epstein Barr (EBV), uno dei fattori ambientali maggiormente associati con la sclerosi multipla (SM). Nello specifico l’obiettivo è di esplorare il possibile ruolo di EBV nella SM ed in altre patologie neurodegenerative - come il morbo di Parkinson – andando a i) valutare il ruolo delle varianti virali come fattori di rischio in popolazioni di pazienti e controlli; ii) prendere in considerazione l’eventuale ruolo delle varianti virali come fattori predittori di risposta ai trattamenti modificanti il decorso di malattia; iii) valutare con particolare attenzione il ruolo dei genotipi virali nell’interazione con la cellula ospite anche tramite lo studio di altre varianti genomiche del virus oltre a quelle già analizzate.

Expected Outcome: il raggiungimento degli obiettivi prefissati permetterà di identificare assi regolatori che, non solo sono alla base della sinaptopatia infiammatoria nei modelli SM e nella SM, ma che sono anche responsivi alle attuali terapie farmacologiche, riabilitative e alimentari.

I risultati delle nostre ricerche permetteranno all’identificazione di nuovi target molecolari e biomarcatori della sinaptopatia infiammatoria nella patologia SM, portando quindi alla potenziale identificazione di nuove strategie farmacologiche

Materiali e metodi

A. INDUZIONE DELL’EAE CRONICO PROGRESSIVO L’induzione dell’EAE cronico-progressivo è condotta su topi femmine C57BL/6) di 7-9 settimane. I topi vengono anestetizzati ed IMMUNIZZATI attraverso somministrazione sottocutanea della glicoproteina maggiore oligodendrocitaria (MOG)<sub>35–55</sub> (per dettagli vedi Mandolesi et al., 2017).

B. MODELLO CUPRIZONE: Topi C57BL/6 di 8 settimane vengono trattati con mangime standard arricchito con cuprizonone allo 0,2% (chelante del rame) oppure con mangime standard (gruppo placebo) ad libitum o per tre-sei settimane.

C. MODELLO CHIMERICO EX VIVO DI SM: Linfociti T isolati da pazienti SM o liquido cerebrospinale prelevato per motivi diagnostici da pazienti SM viene incubato per circa due ore su fettine di cervello di topo per studiare l’effetto elettrofisiologico dei mediatori solubili rilasciati e potenzialmente sinaptotossici (Mandolesi et al., 2017).

D. TRATTAMENTI IN VIVO Impianti di minipompe osmotiche Alzet a lento rilascio (fino a 4 settimane) o cannule per iniezioni acute vengono applicate su topi EAE e controlli per indurre il rilascio intracerebroventricolare di sostanze di interesse (Mandolesi et al., 2017). La modulazione del miRNA è eventualmente effettuata anche tramite vettori lenitivrali che verranno iniettati in vivo nella regione di interesse.

E. **ELETTROFISIOLOGIA:** RegISTRAZIONI elettrofisiologiche vengono effettuate su fettine di cervello di topo (Cervelletto, striato, ippocampo) o colture neuronali/organotipiche, tramite tecniche di patch clamp e field potential per studiare le correnti spontanee GABA-ergiche, glutamatergiche e per studiare fenomeni di plasticità sinaptica (LTP, LTD) (Mandolesi et al., 2017; Gentile et al., 2017; Nisticò et al., 2013).

F. **IMMUNOISTOCHEMICA ED IBRIDAZIONE IN SITU.** Fettine di cervello derivate da tessuto fissato o fresco vengono processate per effettuare esperimenti di immunofluorescenza (target specifici, marker infiammatori) o in situ (microRNA). Imaging confocale o tramite bright field viene eseguito per acquisizione ed analisi delle immagini (Mandolesi et al. 2013, 2017).

G. **BIOLOGIA MOLECOLARE:** L'analisi quantitativa di micro-RNA circolanti in fluidi biologici o presenti nel tessuto nervoso o immunitario viene eseguita tramite la tecnica della Real TIME PCR (RT-PCR). Analogamente, si studia l'espressione dell'mRNA di marcatori di interesse nel tessuto nervoso di topi EAE trattati e non trattati tramite la tecnica della RT-PCR (Mandolesi et al., 2017).

H. **BIOCHIMICA:** La quantificazione di molecole di interesse nel tessuto nervoso viene eseguita tramite la tecnica del WESTERN BLOT o ELISA. La quantificazione di molecole solubili nel liquido cerebrospinale di pazienti o rilasciati da cellule del sistema immunitario in coltura viene eseguita tramite LUMINEX o ELISA assay.

I. **ISOLAMENTO LINFOCITI:** Linfociti T e B vengono isolati da milze di topi EAE o dal sangue di pazienti SM per effettuare studi di elettrofisiologia su fettine di cervello di topo (Mandolesi et al., 2013; 2017)

J. **TEST COMPORTAMENTALI ED ESERCIZIO FISICO:** Open Field Test (OFT); Elevated Plus Maze (EPM); Light-Dark Test (LDT); Murble Burying; Tail Suspension Test (TST); Forced Swim Test (FST). Nest Building test; Rotarod performance test; Grip Strength Test. Per stimolare l'esercizio, i topi vengono stabulati in delle gabbie speciali arricchite con una Running Wheel a cui gli animali hanno libero accesso. Vengono valutate quotidianamente le prestazioni motorie mediante un conta giri magnetico associato alle ruote (Haji et al., 2015; Gentile et al., 2017).

#### **Obiettivo 1:**

Al fine di indagare la relazione tra citochine/fattori neurotrofici e progressione della SM, sono stati condotti diversi studi clinici in collaborazione con l'IRCCS Neuromed di Pozzilli. Nello specifico sono stati ottenuti i seguenti risultati:

- Nella sclerosi multipla (SM), l'affaticamento è un sintomo frequente che influisce negativamente sulla qualità della vita. La patogenesi della fatica è multifattoriale e l'infiammazione può svolgere un ruolo specifico. Per esplorare l'associazione tra affaticamento, infiammazione centrale e decorso della malattia nella SM in 106 pazienti con SM recidivante-remittente (RR), sono state esplorate le caratteristiche cliniche, tra cui affaticamento e umore, al momento della diagnosi. È stato calcolato lo stato NEDA (nessuna evidenza di attività della malattia) dopo un anno di follow-up. Sono stati analizzati anche i livelli liquorali di una serie di molecole proinfiammatorie e antinfiammatorie e di marcatori periferici di infiammazione. Inoltre sono state esplorate, in 35 pazienti, misure strutturali della risonanza magnetica. Alla diagnosi è stata riscontrata una significativa correlazione negativa tra la fatica misurata con la Modified Fatigue Impact Scale (MFIS) e i livelli di interleuchina (IL)-10 nel liquido cerebrospinale. Al contrario, non sono state trovate associazioni significative con marcatori periferici di infiammazione. Punteggi MFIS più alti sono stati associati a una ridotta probabilità di raggiungere lo stato NEDA-3 dopo 1 anno di follow-up. Infine, il carico lesionale T2 ha mostrato una correlazione positiva con i punteggi MFIS e una correlazione negativa con i livelli di IL-10 CSF alla diagnosi. La neuroinfiammazione, e in particolare la ridotta espressione della molecola antinfiammatoria IL-10, può esacerbare il sintomo dell'affaticamento. L'affaticamento nella

SM può riflettere un'inflammatione subclinica del liquido cerebrospinale, che predispone a una maggiore attività della malattia (Gilio et al., 2022b).

- L'interleuchina 6 (IL-6) rappresenta una delle principali molecole infiammatorie ed è stata associata ad una esacerbata attività patologica nella SM recidivante-remittente (RR-MS); tuttavia, è ancora poco chiaro il ruolo dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) del gene IL-6 nella SM. Sono stata quindi esplorata, in una coorte di 171 pazienti con SM-RR, le associazioni tra quattro SNP IL-6 (rs1818879, rs1554606, rs1800797 e rs1474347), la neuroinflammatione valutata al momento della diagnosi e l'andamento clinico: l'analisi statistica ha rilevato un'associazione tra rs1818879, attività radiologica e un insieme di citochine, tra cui IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-10 e IL-13. Non sono state trovate associazioni significative tra altri SNP e parametri clinici o infiammatori. L'associazione tra il polimorfismo rs1818879 e l'attività neuroinfiammatoria subclinica suggerisce che le differenze interindividuali nel gene IL-6 potrebbero influenzare il profilo di attivazione immunitaria nella SM (Bruno et al., 2022).
- Astrociti e microglia svolgono un ruolo importante nel processo infiammatorio della sclerosi multipla (SM). Gli studi di associazione tra i livelli del liquido cerebrospinale (CSF) della proteina GFAP e i recettori trigger solubili espressi sulle cellule mieloidi-2 (sTREM-2), le molecole infiammatorie e le caratteristiche cliniche in un gruppo di pazienti con recidiva-SM remittente (SMRR). Cinquantuno pazienti con SMRR hanno partecipato allo studio. La valutazione clinica e la raccolta del CSF sono state eseguite al momento della diagnosi. Sono stati determinati i livelli liquorali di GFAP, sTREM-2 e di un ampio insieme di molecole infiammatorie e antinfiammatorie. Sono state esaminate le misure strutturali della risonanza magnetica (spessore corticale, carico lesionale T2, volume cerebellare). I livelli CSF di GFAP e sTREM-2 hanno mostrato correlazioni significative con le citochine infiammatorie IL-8, G-CSF e IL-5. Entrambi i livelli di GFAP e sTREM-2 CSF correlavano positivamente con l'età alla diagnosi. GFAP era anche più alto nei pazienti maschi con SM ed era associato a un aumentato rischio di progressione della SM, come evidenziato da BREMS più elevati. Infine è stata trovata un'associazione negativa tra i livelli di GFAP CSF e il volume cerebellare nella SMRR alla diagnosi.  
GFAP e sTREM-2 rappresentano quindi due idonei biomarcatori dell'inflammatione centrale nella SM. I nostri risultati suggeriscono che una maggiore espressione CSF di GFAP può indicare pazienti con un rischio più elevato di progressione (Azzolini et al., 2022).
- Il polimorfismo Val66Met (rs6265) è uno dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) più studiati del fattore neurotrofico derivato dal cervello (BDNF). Esso influenza il funzionamento cerebrale e i processi neurodegenerativi in individui sani e in diverse malattie neuropsichiatriche. Tuttavia, il ruolo di questo polimorfismo nella SM è ancora controverso. In 218 pazienti con SM recidivante-remittente, abbiamo esplorato, al momento della diagnosi, le associazioni tra il polimorfismo Val66Met, le caratteristiche cliniche e i livelli del liquido cerebrospinale (CSF) di un ampio insieme di agenti pro e anti-infiammatori. Inoltre, sono state valutate le associazioni tra Val66Met e misure di risonanza magnetica strutturale. Tramite l'analisi statistica dei componenti principali (PCA) abbiamo identificato un'associazione tra la presenza di Met e diverse citochine, comprese le molecole pro-infiammatorie MCP-1, IL-8, TNF, Eotaxin e MIP-1b. Non sono invece emerse associazioni significative con le caratteristiche cliniche. L'analisi delle misure della risonanza magnetica ha evidenziato (al momento della diagnosi) uno spessore corticale ridotto nei pazienti con Val66Met.

Questo studio dimostra per la prima volta un'associazione tra il polimorfismo Val66Met e l'inflammatione centrale nei pazienti con SM, valutata al momento della diagnosi. Il ruolo di

questo polimorfismo nei processi infiammatori e neurodegenerativi può spiegare la sua complessa influenza sul decorso della SM (Dolcetti et al., 2022).

Inoltre sono in corso i seguenti studi a carattere prevalentemente preclinico:

- Esperimenti volti ad indagare il link tra TNF e -miR142-3p- nella sinaptopatia infiammatoria striatale di topi EAE, in condizioni in vitro (fettine di topo sano incubate con TNF) e nei pazienti SM a livello liquorale (De Vito et al., under revision). Registrazioni elettrofisiologiche, supportate da analisi molecolari, biochimiche e istochimiche, sono stati eseguite per esplorare la sinaptotossicità del TNF nello striato di EAE e topi sani. Ttopi eterozigoti MiR-142(miR-142 HE) e/o una strategia LNA-anti miR-142-3p sono stati utilizzati per verificare l'ipotesi dell'asse TNF-miR-142-3p. Il liquido cerebrospinale (CSF) di 151 pwMS è stato analizzato per valutare possibile correlazione tra i livelli di TNF e miR-142-3p e il loro impatto sui parametri clinici (ad es. indice di progressione (PI), gravità clinica correlata all'età (gARMSS)) e misurazioni MRI alla diagnosi (T0).

Sono stati rilevati alti livelli di TNF e miR-142-3p sia nello striato EAE che nel MS-CSF. Nello striato infiammato dei topi EAE miR-142 HE non sono state osservate e alterazioni glutamatergiche TNF-dipendenti tipiche dell'EAE WT. Di conseguenza, il TNF si è mostrato inefficace nell'indurre sinaptopatia in sezioni striatali di topi sani incubate con LNA-anti miR-142-3p. Tuttavia, sia i dati preclinici che quelli clinici non hanno convalidato l'ipotesi dell'asse TNF-miR-142-3p, suggerendo un ruolo permissivo neuronale di miR-142-3p sulla segnalazione del TNF. I dati clinici hanno mostrato un impatto negativo di ciascuna molecola sul decorso della malattia e/o lesioni cerebrali, e ha rivelato che i loro alti livelli esercitano un effetto sinergico dannoso su attività della malattia, PI e volume della lesione della sostanza bianca.

- Studi sul ruolo della citochina IL-9 e la sintomatologia della SM. IL-9 è una citochina che svolge un ruolo immunoregolatorio importante nella SM e nell'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE): Gli esperimenti in corso hanno evidenziato che nei topi EAE il trattamento sistemico con IL-9, sia pre-sintomatico che terapeutico, porta ad un effetto benefico, mitigando la disabilità clinica e contrastando i processi neuroinfiammatori e il danno alla trasmissione sinaptica nello striato. I medesimi effetti benefici sono stati ottenuti anche in seguito all'infusione intracerebroventricolare di IL-9 in topi EAE, evidenziando quindi un ruolo diretto della citochina nel SNC. Analisi biochimiche ed elettrofisiologiche hanno infine dimostrato come l'azione anti-sinaptotossica dell'IL-9 dipendesse da una interazione della citochina con le cellule microgliali, in linea con una forte espressione nello striato dei topi EAE del recettore di IL-9 in queste cellule.
- Da uno studio combinato, sia clinico che preclinico, stanno emergendo dati rilevanti sul ruolo della citochina IL-10 nella SM. L'analisi delle citochine liquorali in pazienti SM mostra una correlazione inversa tra IL-10 e il parametro clinico EDSS (Expanded Disability Status Scale) misurato 1 anno dopo la diagnosi in 206 pazienti con SM-RR. Inoltre è stato dimostrato l'effetto benefico dell'IL-10 sull'atrofia neuronale in specifiche strutture sottocorticali. Studi preclinici hanno poi dimostrato che IL-10 è in grado di mitigare l'eccitotossicità striatale, condizione tipica del modello animale di malattia EAE che porta ad uno sbilanciamento tra la trasmissione sinaptica eccitatoria e quella inibitoria. Registrazioni elettrofisiologiche eseguite tramite la tecnica del patch clamp hanno svelato che IL-10 è in grado di ridurre le frequenze spontanee glutamatergiche e di potenziare quelle GABAergiche, contrastando così il danno eccitotossico. Mediante approcci molecolari abbiamo inoltre riscontrato una correlazione lineare tra il livello di mRNA di IL-10 e IL-1 $\beta$  nello striato di topi EAE, dato che suggerisce un possibile antagonismo tra le due

citochine. Ulteriori analisi sono in corso per meglio definire il ruolo di questa citochina nella patologia SM.

- Queste osservazioni hanno dimostrato che l'IL-10 svolge un effetto pleiotropico nell'influenzare la compromissione motoria, la neurodegenerazione e l'eccitabilità sinaptica, suggerendo che l'IL-10 potrebbe essere un obiettivo inestimabile per il trattamento della neuroinfiammazione nella SM.

#### **Obiettivo 2:**

Per quanto riguarda lo studio dell'effetto neuroprotettivo dei farmaci nella SM/EAE, è stata testata in modelli chimerici omologhi (topo-topo) ed eterologhi (uomo - topo) la capacità dei farmaci modulatori dei recettori sfingosinici di interferire con le alterazioni sinaptiche indotte dai linfociti di topi EAE (modello chimerico omologo) oppure di pazienti SM (modello chimerico eterologo) su fettine di topo sano.

Nello specifico è stato indagato come specifiche terapie immunomodulanti possano interferire con la sinaptopatia mediata dai linfociti T. In collaborazione con l'IRCCS Neuromed di Pozzilli, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Mediante un modello ex-vivo omologo di sinaptotossicità mediata dalle cellule T, è stato osservato che il trattamento dei linfociti EAE con il farmaco siponimod promuove il recupero delle cinetiche glutammatergiche. Trattamenti con specifici agonisti e antagonisti, suggeriscono un coinvolgimento specifico del sottotipo recettoriale sfingosinico di tipo 5. Infine, è stato esplorato il potenziale effetto sinaptico-protettivo del siponimod in pazienti SPMS. In particolare è stato osservato che i linfociti presi dai pazienti SPMS trattati con siponimod recuperavano le alterazioni sinaptiche glutammatergiche osservate nei pazienti progressivi.

#### **Obiettivo 3:**

Per valutare lo stato ansioso-depressivo nei modelli murini di SM e capire come questo sia associato con le alterazioni del sistema immunitario e del sistema endocannabinoide (ECS), si eseguono esperimenti in vivo ed ex vivo con farmaci i) anti-depressivi con effetto anti-infiammatorio o ii) in grado di interferire con il sistema ECS. Nel caso i) si utilizzano inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI) e degli inibitori dei recettori della serotonina; nel caso ii) si utilizzano sostanze in grado di bloccare l'inibitore della lipasi monoacilglicerolo (MAGL), l'enzima idrolitico responsabile dell'inattivazione della 2-AG. L'obiettivo è quello di studiare il potenziale effetto benefico di tali trattamenti non solo a livello comportamentale ma anche a livello di disabilità motoria e sinaptopatia infiammatoria. I dati ottenuti in collaborazione con l'IRCCS Neuromed mostrano un effetto benefico del trattamento MAGLi (IP giornaliera, a partire dal giorno dell'immunizzazione) con un impatto sulla sinaptopatia infiammatoria e sull'attivazione microgliale. Sono in corso analisi immunoistochimiche volte ad indagare l'impatto del trattamento su infiltrati linfocitari e macrofagi e sulla demielinizzazione.

#### **Obiettivo 4:**

Nell'ambito dello studio sul ruolo dello stile di vita sul decorso della malattia, sono stati condotti studi sia clinici che preclinici.

I risultati clinici indicano un effetto immunomodulatore dell'esercizio nei pazienti con SM, associato a una ridotta espressione di IL-2 nel liquido cerebrospinale, che potrebbe comportare una riduzione dei disturbi dell'umore. I risultati ottenuti sul modello preclinico di malattia, EAE, confermano il legame tra IL-2 e l'esercizio fisico, ed evidenziano il ruolo sinaptotossico e ansiogeno di questa citochina (Gilio et al., 2022). Questi dati suggeriscono che l'esercizio nelle fasi iniziali può agire come terapia modificante la malattia nella SM, sebbene siano necessari ulteriori studi longitudinali per chiarire questo problema.

I risultati degli studi preclinici focalizzati sul ruolo di una alimentazione basata su una dieta ricca di acidi grassi saturi e il decorso del modello animale di SM, EAE, mostrano come la dieta grassa promuova specifiche alterazioni sinaptotossiche, favorendo i meccanismi eccitotossici alla base della SM (Caioli et al., paper in stesura).

Per valutare il ruolo dell'esercizio fisico sull'andamento della malattia, sono in corso esperimenti su animali EAE che fanno esercizio fisico e che sono sottoposti a chirurgia di vagotomia. Questi studi avranno l'obiettivo di valutare le alterazioni clinico/motorie, il danno sinaptico e la neuroinfiammazione in animali EAE trattati con diversi tipi di diete e sottoposti ad esercizio fisico. Inoltre saranno condotti degli studi sui linfociti T infiltranti per studiare l'impatto della dieta e dell'esercizio sulla tossicità sinaptica mediata dalle cellule T sui neuroni striatali.

#### **Obiettivo 5:**

Attraverso un approfondito studio della letteratura è stato valutato il ruolo dei fattori ambientali e dell'alterazione della risposta immune nella SM ed in altre patologie autoimmuni, per individuare quelli che sono gli elementi caratterizzanti la SM, al fine di migliorare la conoscenza ed indirizzare eventuali nuovi studi (Mechelli et al. 2021; Bellucci et al. 2021; Angeloni et al. 2021). Sono stati inoltre valutati gli studi scientifici recentemente pubblicati sulla relazione tra SM e SARS-CoV-2, cercando di capire se è possibile un'interazione tra l'infezione da SarsCov2 e quella con il virus di EBV, a lungo considerato il fattore virale più associato alla SM (Bellucci et al. 2021). Infine è stato eseguito uno studio esplorativo di microarray analizzando il plasma di pazienti affetti dalla malattia di Huntington e di controlli e valutando interi profili di RNA non codificanti per verificare se il miRNome plasmatico può fornire utili "biomarker" periferici per la gestione dei pazienti affetti dalla malattia di Huntington (Ferraldeschi et al 2021).

Nel prossimo futuro ci proponiamo di studiare i meccanismi che sono alla base dell'interazione tra virus e ospite e che risultano alterati nella SM. Specificatamente, anche attraverso l'uso di approcci bioinformatici, stiamo valutando il ruolo combinato dei fattori genetici e virali nella SM. Inoltre, sono in corso esperimenti di espressione genica e proteica, volti a caratterizzare il ruolo funzionale delle varianti di EBV associate alla SM.

Tra le sfide della ricerca sulla SM sta emergendo sempre più l'importanza di sviluppare strategie in grado sia di ripristinare la mielina o impedirne la perdita sia di bloccare la sinaptopatia. In questo contesto, studi derivanti dai modelli sperimentali di SM come l'EAE, hanno permesso di indagare i meccanismi cellulari e molecolari alla base di questi importanti aspetti fisiopatologici e le potenzialità di diversi approcci terapeutici. Oltre alle strategie farmacologiche è stato dimostrato che anche un corretto stile di vita può influenzare il decorso della SM. Tuttavia i meccanismi alla base di un'azione neuro protettiva esercitati dai farmaci, dai processi riabilitativi e da specifiche diete, non sono ancora totalmente compresi e meritano di essere investigati in maniera più approfondita.

### **Laboratorio di Neurofisiologia Sperimentale**

*Analisi amperometrica del danno da stress ossidativo causato dalla tossina del complesso I mitocondriale, rotenone su colture cellulari PC12 dopaminergiche*

La Malattia di Parkinson è una malattia neurodegenerativa che coinvolge il sistema nervoso centrale, caratterizzata da deficit cognitivi e motori come: bradicinesia, rigidità e tremore a riposo. Le caratteristiche neuropatologiche sono la progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella



Substantia Nigra pars compacta (SNpc) e la presenza di Corpi di Lewy (CL), inclusioni multi proteiche essenzialmente composti da aggregati di  $\alpha$ -synucleina ( $\alpha$ -syn)(Spillantini et al. 1997). La proteina  $\alpha$ -syn è implicata nella regolazione delle attività sinaptiche a livello delle spine dendritiche. Nelle fasi iniziali della malattia, la proteina  $\alpha$ -syn perde la sua funzione originaria ed inizia a formare oligomeri di dimensioni via via crescenti, sino a formare protofibrille e fibrille, costituendo così i CL (Durante et al. 2019). Durante il processo di oligomerizzazione iniziano a manifestarsi, come dimostrato in recenti studi (Tozzi et al. 2016; Tozzi et al., 2021), i primi danni neuronali, e la comparsa di deficit cognitivi e motori ad essi dovuti. Nelle aree coinvolte in questi processi di neurodegenerazione è possibile osservare l'attivazione del sistema neuroinfiammatorio conseguente o parallela allo stress ossidativo a danno dei mitocondri. Questi due fenomeni potrebbe essere la causa stessa dello sviluppo e della progressione della MP.

Con l'intento di comprendere in primis come i processi di stress ossidativo siano coinvolti nella neurodegenerazione in corso di MP e come siano correlati ai danni osservati dalla presenza di  $\alpha$ -syn oligomerica e protofibrillare (ultima fase di questo studio triennale 2021-2023), sono stati individuati alcuni modelli sperimentali che permettono di svolgere un'indagine ad ampio spettro su questi meccanismi, partendo da modelli più semplici a quelli più complessi: cellule di neuroblastoma con caratteristiche dopaminergiche PC12, neuroni dopaminergici differenziati tramite NGF a partire dalle cellule PC12 e colture primarie di neuroni piramidali ippocampali, per arrivare a studiare, in fine neuroni ottenuti dalla transdifferenziazione di fibroblasti di pazienti affetti da MP (ciNs) con metodo chimico (Hu W. et al. 2015).

Partendo dai modelli cellulari più semplici, vengono indotti processi di neuroinfiammazione/stress ossidativo e neurodegenerazione parkinson-like, con l'utilizzo di neurotossine nell'ordine di utilizzo: 1) rotenone, una neurotossina che deprime la respirazione cellulare inibendo il trasferimento degli elettroni nella catena di trasporto degli elettroni (inibitore del complesso I-NADH deidrogenasi); 2)  $\alpha$ -syn oligomerizzata e protofibrillare (PFF). Queste diverse tipologie cellulari rappresentano, nel loro insieme, un modello funzionale della MP per le loro diverse specifiche caratteristiche. In questi modelli sperimentali saranno studiati gli effetti di agenti neuroprotettivi come il glutatione (GSH-C4) un potente antiossidante, e la Timosina 1 $\alpha$  una proteina con la funzione di immunomodulazione fisiologica (Checoni et al. 2019; Renga et al. 2020) come possibili agenti terapeutici.

In questo studio ci si propone di comprendere a livello cellulare, mediante l'uso di diverse linee neuronali in coltura, i meccanismi molecolari, elettrofisiologici e morfologici alla base delle alterazioni causate dai processi di neuroinfiammazione in concomitanza con l'accumulo di  $\alpha$ -syn e di altri agenti neurotossici, tipici della MP.

Il progetto prevede una prima fase di studio in amperometria per analizzare l'effetto della tossina mitocondriale Rotenone sul rilascio di dopamina dalle cellule PC12 che presentano tutta la "machinery" molecolare per il rilascio di questo neurotrasmettitore.

Il progetto è organizzato in gruppi sperimentali con modelli a complessità neurologica crescente partendo da cellule immortalizzate caratterizzate dal solo rilascio di dopamina a colture neuronali più complesse, su questi modelli verranno studiati effetti di agenti neurotossici, che imitano i danni tipici della MP:

1) Studio delle alterazioni morfologiche e sul rilascio di dopamina, nelle pc12, indotte dall'applicazione di

Rotenone a diverse concentrazioni e diverse tempistiche (studio condotto nel corso del 2022);

2) Studi elettrofisiologici e morfologici dei processi neuroinfiammatori e degenerativi indotti dall'applicazione in vitro di  $\alpha$ -syn, in PC 12 non differenziate che differenziate in neuroni maturi con NGF (studio che verrà condotto nel corso del 2023).

Materiali e Metodi

## Colture Cellulari

Parte degli studi della MP si concentrano sulla perdita selettiva dei neuroni dopaminergici all'interno della SNpc. Per riprodurre il più fedelmente possibile l'evoluzione della malattia sono utilizzate linee cellulari che imitano al meglio la realtà. La linea cellulare di feocromocitoma PC-12 e le cellule di neuroblastoma SH-SY5Y sono spesso utilizzate per lo studio del rilascio di catecolamine e differenziamento di popolazioni neuronali (Falkenburger et al., 2016).

Per il modello studiato dal nostro gruppo è stata utilizzata la linea cellulare di feocromocitoma di topo PC-12. Le cellule sono state cresciute nel terreno di crescita completo Dulbecco's modified Eagle medium-F12 (Gibco) 89%, addizionato con Fetal Bovine Serum (Gibco) 10% e Penicillin and Streptomycin 1% (Corning). Sono state messe in incubatore umido, in flask T-25, a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> fino a confluenza. Il mezzo di coltura è stato cambiato ogni 24 ore per tre giorni, togliendo il 50% del terreno e rinnovandolo con il 50% di terreno fresco. La semina delle PC-12 è stata effettuata ad una densità di 5 x 10<sup>4</sup> cellule per pozzetto in una piastra da 24 pozzetti, su vetrini pretrattati con poli-D-lisina (500 µL/pozzetto, rimossa con due lavaggi di acqua di distillata dopo 24h).

TEM (in collaborazione con il Consorzio MeBIC)

I campioni di cellule sono stati raccolti mediante raschiamento e fissati per una notte in glutaraldeide al 2% in tampone fosfato 0.1M a pH 7,3. Dopo il risciacquo nello stesso tampone, sono stati fissati in tetrossido di osmio 1-33% nello stesso tampone, disidratati e processati seguendo uno schema standard per l'inclusione in resina Epon. Le sezioni plastiche semi-sottili (2-3 µm) sono state colorate con Azur II o Fuchsina basica. Le sezioni ultrasottili (60-65 nm) sono state ottenute con l'ultramicrotomo EMUC7 (Leica Microsystems).

Immunofluorescenza

Attraverso le analisi di immunofluorescenza sono stati analizzati i marcatori espressi dalle cellule PC-12 piastrate su vetrini copri-oggetto, con metodo indiretto.

Sotto cappa a flusso laminare, le cellule sono state inizialmente lavate 3 volte con PBS (Gibco). In seguito, sono state fissate con il 4% di PFA (paraformaldeide; Sigma Aldrich) per 20 minuti e poi lavate per 3 volte con PBS. La permeabilizzazione della membrana lipidica è stata effettuata con PB 0,1 M TX-100 0.3% per 15-20 minuti e lavate tre volte con PBS. Il blocking è stato effettuato con PB 0,1 M TX-100 0.3% contenente 5% di Bovine Serum Albumine (BSA, Merck) per 45 minuti senza lavaggi successivi.

Gli anticorpi primari rabbit anti-tirosina idrossilasi TH (1:1000, AB152 Millipore), e rat anti-serotonina 5-HT (1:100, MAB352 Millipore) sono stati diluiti nella soluzione di PB 0,1 M TX-100 0.3% e incubato Over Night a 4°C. In seguito, sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS per rimuovere eventuali tracce di anticorpo primario non legato. Gli anticorpi secondari (Cy2 anti-rabbit e Cy5 anti-rat) (The Jackson Immunoresearch) sono stati incubati per 1 h a T ambiente, in seguito a diluizione (1:100) nella soluzione di PB 0,1 M TX-100 0.3%. Successivamente, il campione è stato lavato 3 volte con PBS. In ultimo le cellule sono state marcate con DAPI (1:1000, Sigma Aldrich) diluito in PB 0,1 M TX-100 0.3% per 10 minuti a T ambiente, per la visualizzazione dei nuclei. Le immagini ad immunofluorescenza sono state acquisite e analizzate tramite il microscopio confocale (NIKON Tie2).

Amperometria

Il rilascio di dopamina è stato misurato mediante amperometria. Le colture cellulari piastrate su vetrini copri oggetto, dopo aver raggiunto ±80% di confluenza, sono state considerate pronte per le registrazioni di amperometria. Ogni vetrino è stato trasferito all'interno della cameretta di registrazione con una continua perfusione di soluzione salina (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 mM CaCl<sub>2</sub>, 11 mM glucose and 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) per 10 minuti a temperatura ambiente. L'elettrodo registrante in fibra di carbonio (World Precision Instruments) è

stato posizionato su tessuto cellulare in vitro ad una profondità tra 100-150  $\mu\text{m}$ . All'elettrodo è stato applicato una corrente costante di +600 mV (4kHz filtrati a 2kHz). Per ogni registrazione sono stati presi 3 minuti di baseline per misurare la frequenza di rilascio spontaneo. Successivamente è stata applicata in perfusione una soluzione ad alto contenuto di KCl (2.5 mM NaCl, 126 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11 mM glucose and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) per 1 minuto. Tale perfusione ha permesso di indurre la depolarizzazione delle cellule, portando a soglia le loro capacità di esocitosi. In seguito, è stata avviata la perfusione con un normale contenuto di KCl (126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 2.4 mM  $\text{CaCl}_2$ , 11 mM glucose and 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ ) così da ripristinare le condizioni di esocitosi fisiologiche. Al termine di ogni esperimento, dopo aver eliminato il vetrino dalla cameretta di registrazione, l'elettrodo registrante è stato posto in perfusione per valutare le sue capacità nel rilevare le variazioni di corrente. Per fare questo, in perfusione è stata posta una concentrazione nota di dopamina.

Gli esperimenti di amperometria sono stati effettuati l'amperometro VA-10M (NPI). Per l'acquisizione dei dati è stata utilizzata la Digidata 1500b (Molecular Devices). Le analisi statistiche sono state effettuate attraverso il software "Clampfit 11". I dati degli esperimenti sono stati calcolati come media  $\pm$  dell'errore standard medio (SEM). Per analizzare le differenze sperimentali è stata utilizzata l'ANOVA ad una via. Le medie dei gruppi sono state confrontate con il test post-hoc di Bonferroni. Le differenze sono state considerate statisticamente significative se  $p < 0.005$ .

#### Incubazione con Rotenone

Cellule di feocromocitoma di ratto (PC12) mantenute in un mezzo di coltura ricco di DMEM/F12 (Gibco) integrato con 10% di siero bovino fetale (Gibco), 100 U/mL di penicillina streptamicina (Gibco), sono state seminate su piastre da 24 pozzetti rivestiti di poly L lisina (Sigma) e mantenute in un incubatore a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$ . Le PC12 sono cellule caratterizzate dalla capacità di rilasciare dopamina (DOPA) e sono considerate un buon modello cellulare per gli studi sulla MP (Magalingam et al. 2014). Utilizzando un elettrodo a fibra di carbonio da 30  $\mu\text{m}$  collegato ad un amperometro con potenziale imposto per la rivelazione di catecolamine, siamo andati a valutare la quantità di rilascio di DOPA basale in seguito a perfusione con KCl 126 mM, con l'amperometria. La variazione di corrente osservata per ogni esperimento è stata poi convertita in concentrazione molare di DOPA rilasciata, attraverso rette di taratura ripetute ad inizio e fine sessione sperimentale. Il passaggio successivo è stato quello di osservare l'effetto dell'incubazione del Rotenone a bassa concentrazione 0,5  $\mu\text{M}$  dopo 24h e con successiva applicazione di tre differenti dosi di timosina, su queste colture di PC12, sia sul rilascio di dopamina sia nella struttura cellulare e mitocondriale tramite Microscopio Elettronico a Scansione (SEM), in collaborazione con il Consorzio MeBIC dell'IRCCS San Raffaele.

#### Significance and Innovation

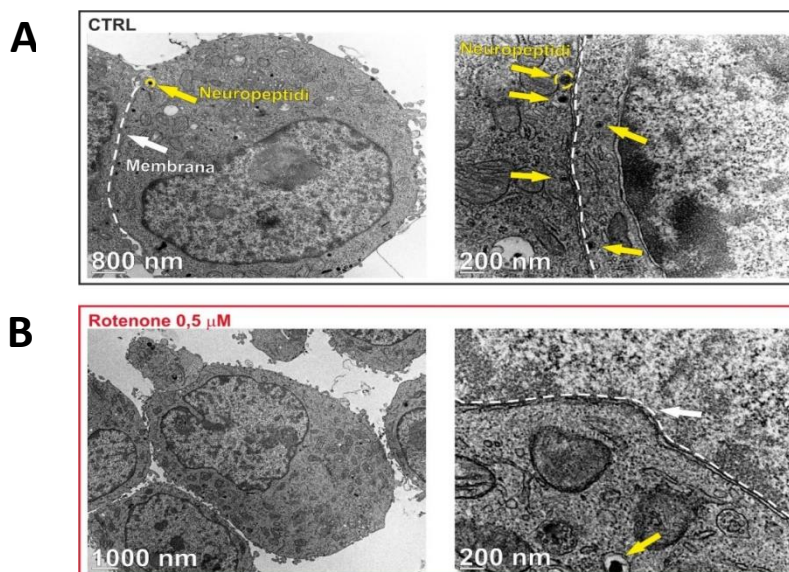
In collaborazione con l'IRCCS Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli, e il Centro per la cura e la diagnosi del Parkinson e disturbi del movimento dell'IRCCS San Raffaele Roma, il laboratorio di sta svolgendo un'estesa caratterizzazione morfologica dei cervelli di ratto iniettati con protofibrille di  $\alpha\text{-syn}$ , comparati con animali iniettati con PBS. I cervelli forniti dal gruppo del Prof. Calabresi sono stati tagliati ed incubati con anticorpi specifici per  $\alpha\text{-syn}$  per individuare la diffusione nelle diverse aree cerebrali di questa proteina, partendo dal sito di iniezione, allo scopo di comprendere meglio i processi di neurodegenerazione legati al misfolding e all'aggregazione prima e allo spreading poi dell' $\alpha\text{-syn}$ .

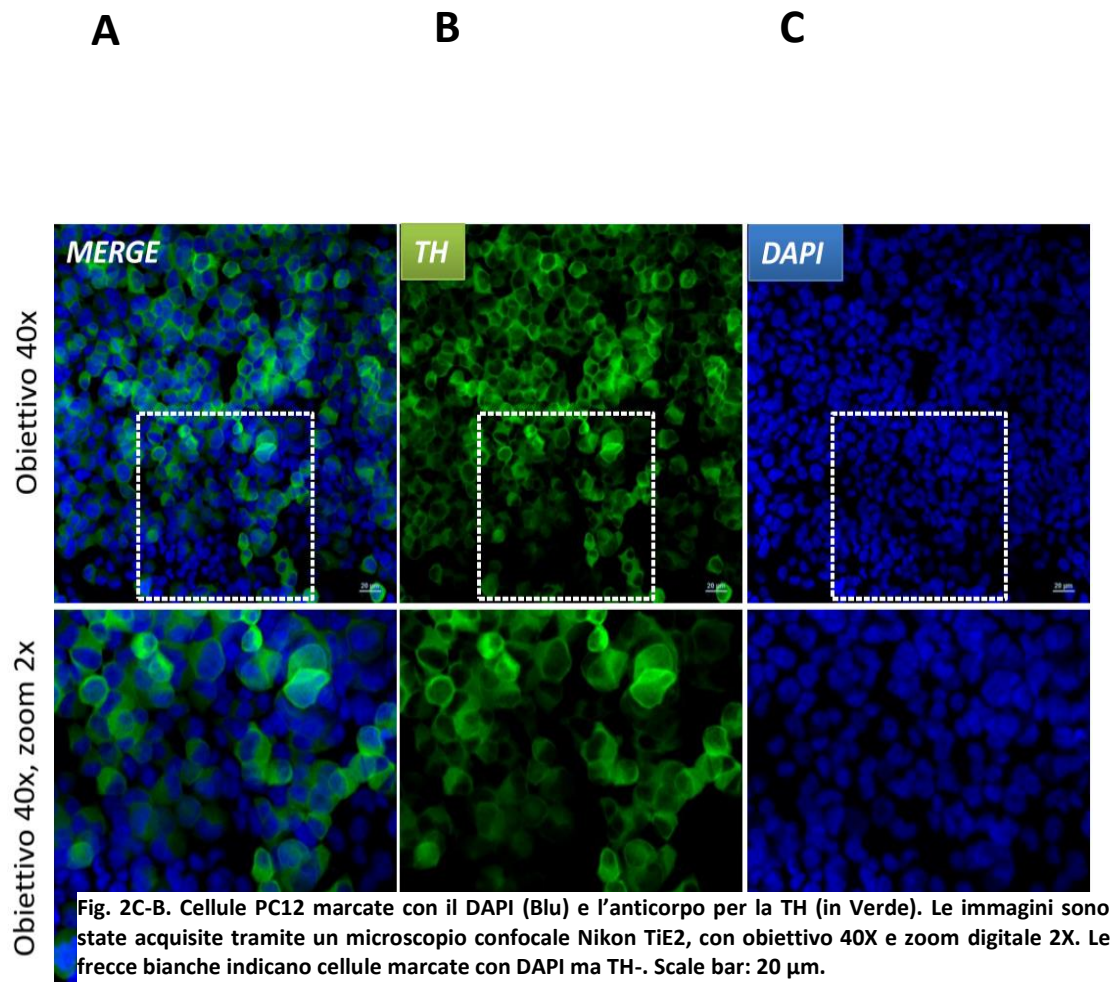
In collaborazione con i ricercatori del Centro MEBIC dell'IRCCS San Raffaele Roma, attraverso tecniche di microscopia elettronica, i ricercatori stanno approfondendo i danni citoplasmatici dovuto all'incubazione con le sostanze neurotossiche in esame per lo studio della MP, come:  $\alpha\text{-syn}$  oligomerica e fibrillare, Rotenone e 6-OHDA.

Tramite la TEM è stato valutato l'effetto degenerativo sulle cellule e i mitocondri.

Con la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stato valutato il benessere cellulare strutturale ed anche l'effetto del rotenone. Nel campione di CTRL (Fig. 1A) si vedono una discreta quantità di inclusioni vescicolari (cerchiate in giallo) che contengono probabilmente dei neuropeptidi. La membrana cellulare presenta una forma compatta e sana. Gli organelli all'interno della cellula, specialmente complesso del Golgi e mitocondri presentano una morfologia ben visibile e compatta. Contrariamente, il campione trattato con rotenone a  $[0.5\mu\text{M}]$  (Fig. 1B) mostra una ridotta quantità di inclusioni vescicolari e sono presenti meno vescicole nello spazio extracellulare, di conseguenza, è evidente una minore distribuzione di neuropeptidi intracellulare. Il complesso del Golgi e mitocondri risultano meno definiti morfologicamente e anche meno compatti, segno che la struttura si sta degradando. La membrana cellulare si mostra più frastagliata e in generale la morfologia della cellula, comparata al CTRL, è più allungata. Il nucleo cellulare del campione trattato con rotenone appare meno definito e compatto.

Per caratterizzare le PC-12 tramite immunofluorescenza è stata utilizzata una doppia marcatura sui gruppi di controllo: DAPI (Fig. 2C. in blu) per individuare i nuclei delle cellule e un marcatore per la tirosina idrossilasi (TH; Fig. 2B in verde), l'enzima che catalizza la prima reazione di sintesi delle catecolamine, per valutare quali fossero dopaminergiche. Per visualizzare meglio la distribuzione viene presentata sovrapposta l'immagine dei due risultati (Fig. 2A; merge) per identificare il nucleo delle cellule che esprimono la TH.





Analisi amperometrica del rilascio di dopamina evocata in seguito a trattamento con rotenone, timosina (1 $\mu$ g/ml e 10  $\mu$ g/ml) e loro combinazione

Per indagare l'effetto della timosina sui danni prodotti dal rotenone sono state provate due diverse concentrazioni di timosina in seguito al trattamento con il rotenone alla stessa concentrazione.

Su colture di PC-12 è stato valutato il rilascio di DA con tecniche amperometriche, su un gruppo di vetrini di controllo (CTRL; n=43) come baseline (100%) per poi andare a valutare gli effetti delle sostanze prese in esame. Il rotenone è causa di un ridotto rilascio di DA evocata del (51,51%  $\pm$  7.3) (Rotenone [0.5 $\mu$ M]; n=19) rispetto al campione di controllo. I trattamenti con la sola timosina (tymosin [1 $\mu$ g/ml]; n=11) hanno prodotto una riduzione ancora maggiore (64,53%  $\pm$  8.9) della DA evocata. Dopo l'incubazione con rotenone abbiamo verificato l'effetto della timosina (rotenone

[0.5 $\mu$ M] + tyrosin [1 $\mu$ g/ml]; n=11) sul rilascio della DA, ed abbiamo osservato, rispetto al CTRL una riduzione del (35.43%  $\pm$  8.9). (Fig. 3A; One-way ANOVA trattamento CTRL vs. Rotenone 0.5 $\mu$ M, Tyrosin 1 $\mu$ g/ml, Rotenone 0.5 $\mu$ M + Tyrosin 1 $\mu$ g/ml, F (3,80) = 27.96, Bonferroni's post-hoc test p < 0.0001).

Per valutare l'effetto della timosina a concentrazione dieci volte maggiore è stato misurato il rilascio di DA su un gruppo di vetrini di controllo (CTRL) come baseline (100%). I trattamenti effettuati con solo la timosina (tyrosin [10 $\mu$ g/ml]; n=21) mostrano una riduzione del (42.42%  $\pm$  6.8) della DA evocata rispetto al CTRL. Il trattamento con timosina in seguito all'incubazione con rotenone (rotenone [0.5 $\mu$ M] + tyrosin [10 $\mu$ g/ml]; n=8) ha mostrato una riduzione dell'esocitosi del (57.29  $\pm$  9.6) rispetto al trattamento con solo rotenone (rotenone [0.5 $\mu$ M] n=19) che mostra un abbassamento dell'esocitosi del (54.6  $\pm$  6.26) (Fig. 3B; One-way ANOVA trattamento CTRL vs. Rotenone 0.5 $\mu$ M, Tyrosin 10 $\mu$ g/ml, Rotenone 0.5 $\mu$ M + Tyrosin 10 $\mu$ g/ml, F (3,97) = 37.79, Bonferroni's post-hoc test p < 0.0001).

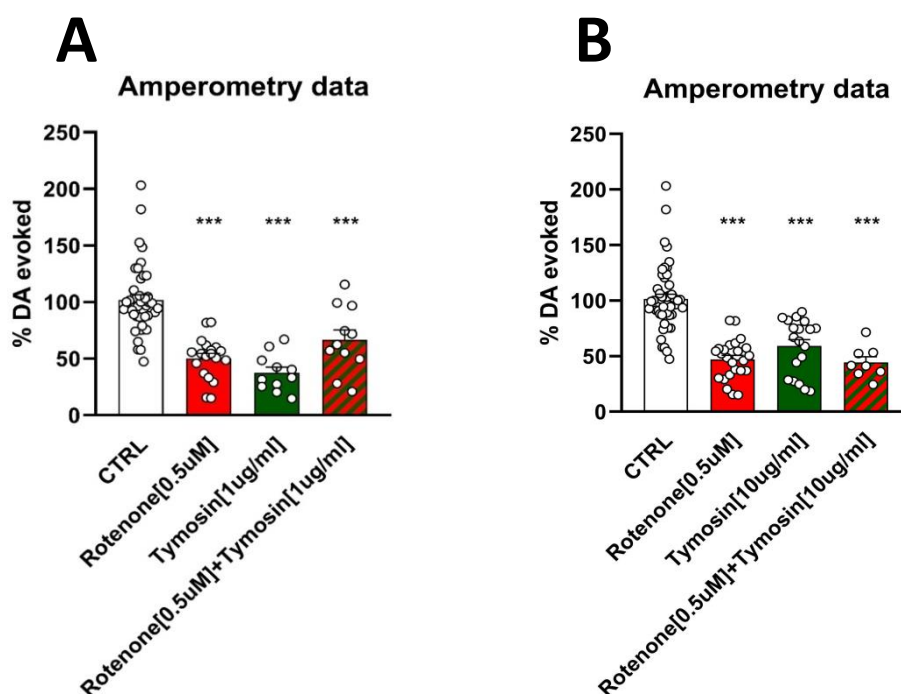


Fig. 3. A) trattamenti in vitro con rotenone a [0.5 $\mu$ M] (istogramma rosso) (51,51%  $\pm$  7.3) l'esocitosi di DA rispetto a CTRL (istogramma bianco). Trattamento con solo timosina a [1 $\mu$ g/ml] la DA evocata diminuisce ulteriormente rispetto al CTRL (istogramma verde). Applicazione di timosina a [1 $\mu$ g/ml] in seguito a trattamento con rotenone (istogramma striato). (One-way ANOVA Treatment CTRL vs. Rotenone 0.5 $\mu$ M \*\*\*p<0.0001; CTRL vs. Timosina 1 $\mu$ g/ml \*\*\*p<0.0001; B) trattamenti con timosina con a [10 $\mu$ g/ml] abbassano l'esocitosi della DA rispetto al CTRL di  $\pm$  50% (istogramma verde). Trattamenti con la timosina a [10 $\mu$ g/ml] in seguito a trattamento con rotenone a [0.5 $\mu$ M] riducono l'esocitosi di DA di oltre il 50%. (One-way ANOVA Treatment CTRL vs. Rotenone 0.5 $\mu$ M \*\*\*p<0.0001; CTRL vs. Timosina 10 $\mu$ g/ml \*\*\*p<0.0001;)

## Laboratorio di Elettrofisiologia

### *Studio delle alterazioni GABAergiche nelle sindromi del neuro sviluppo*

I processi patologici che interferiscono con il neurosviluppo normale e l'omeostasi fisiologica del sistema nervoso, come mutazioni genetiche, alterazioni istologiche o disfunzioni della neurotrasmissione e dello stato infiammatorio del sistema nervoso (Aronica et al., 2007; Abdijadid et al., 2015) hanno la peculiarità di non determinare semplicemente una compromissione acuta dello "stato di salute" del paziente, ma esercitano una forte influenza sulle potenzialità cognitive nel lungo termine (Morel et al., 2018; Nickels et al., 2016). Inoltre, la terapia farmacologica allo stato attuale delle conoscenze non costituisce sempre un metodo di intervento efficace (van Karnebeek et al., 2016).

La compromissione dello "stato cognitivo" del paziente, insieme alla frequente predisposizione a generare crisi epilettiche tipica delle patologie del neurosviluppo (Rakhade and Jensen, 2009), costituiscono grandi fattori peggiorativi per la qualità di vita dei pazienti, che riescono a trarre benefici quasi esclusivamente da trattamenti "sintomatici" che non risolvono la causa della patologia.

Un elemento che accomuna tutte queste manifestazioni patologiche è il recettore GABA di tipo A (GABA-A), il principale recettore inibitorio del sistema nervoso centrale (Farrant and Nusser, 2005). Il corretto funzionamento di questo recettore è infatti fondamentale per il normale sviluppo del sistema nervoso e questo dipende strettamente anche dall'effetto che molecole endogene (i.e. citochine e/o mediatori dell'infiammazione, fattori di crescita – Vezzani and Viviani, 2015) ed esogene (i.e. farmaci antiepilettici, fitofarmaci, nuove molecole terapeutiche) possono esercitare su di esso. Per questo, la nostra ricerca si è focalizzata su agenti GABAergici, esogeni o endogeni, che possano essere potenzialmente impiegati nel trattamento delle crisi e nella prevenzione della progressione dell'epilettogenesi.

Detti composti potrebbero quindi avere un'attività non solamente terapeutica nei confronti dell'epilessia, ma anche preventiva rispetto a tutte le comorbidità che a questa si associano nelle patologie del neurosviluppo (Braat and Kooy, 2015).

Recenti ricerche suggeriscono che intervenendo su "meccanismi chiave" del neurosviluppo prima del consolidamento della neuropatologia si possa arrivare ad un approccio terapeutico "*disease modifying*", in grado quindi di modificare la prognosi della patologia nel lungo termine al contrario degli approcci oggi maggiormente usati, di tipo "sintomatico".

L'ipotesi centrale della presente ricerca è che il sistema GABAergico possa fungere da "meccanismo chiave" bersaglio e che il suo studio permetta quindi non solo di ottenere una migliore conoscenza della fisiopatologia del neurosviluppo ma anche, allo stesso tempo, di caratterizzare un possibile target terapeutico comune a molte patologie.

Utilizzare il sistema GABAergico come *target* terapeutico ha di certo una valenza amplificata dal fatto che il recettore GABA-A risulta implicato non solo nei processi legati alla neurogenesi, e quindi al consolidamento di una corretta funzione sinaptica, ma abbia anche un ruolo preponderante nei processi che portano alla generazione e propagazione delle crisi epilettiche ed epilettogenesi, disturbi cognitivi e comorbidità psichiatriche. (Gonzalez et al., 2011).

Questa ipotesi è supportata dalla quasi costante presenza in diverse sindromi epilettiche del neurosviluppo (TSC, FCD, RS, FRAX – Steel et al., 2017; Abdijadid et al., 2015; Tang et al., 2016) di un ritardo nella maturazione della trasmissione GABAergica, che mantiene un'azione meno iperpolarizzante tipica del cervello immaturo, come riportato da studi pubblicati da questo (Palma et al., 2006; Ruffolo et al., 2016;2018) ed altri gruppi di ricerca (Talos et al., 2011; Tang et al., 2016; Stern et al., 2017).

Allo stato attuale delle conoscenze, non esistono ancora farmaci che agendo su questi meccanismi patofisiologici chiave del neurosviluppo siano in grado di modificare il decorso di queste patologie. Questa mancanza potrebbe essere in parte dovuta al fatto che rimane ancora da definire precisamente quali siano i determinanti molecolari della disfunzione GABAergica sopra descritta. Questi, se modulati farmacologicamente, potrebbero dimostrarsi utili al ripristino di una normale attività inibitoria cerebrale. A questo proposito, la neuroinfiammazione sembra giocare un ruolo fondamentale poichè è un meccanismo patofisiologico comunemente attivato durante la progressione delle patologie del neurosviluppo (van Vliet et al., 2018) ed è potenzialmente in grado di influenzare la funzione dei recettori GABA-A (Roseti et al., 2015).

Accanto sostanze endogene, come i mediatori dell'infiammazione, anche nuovi agenti farmacologici sembrano avere effetti particolarmente promettenti sulle patologie del neurosviluppo, come ad esempio i cannabinoidi (Reddy, 2023). Nonostante per questa classe di molecole siano stati descritti numerosi effetti, il loro potenziale GABAergico è ancora scarsamente noto ma potrebbe avere un ruolo chiave nel determinare il loro effetto.

Quindi, la conoscenza approfondita dell'effetto di questi nuovi agenti GABAergici costituisce un prerequisito fondamentale perché si possano mettere a punto nuove strategie terapeutiche.

Gli obiettivi specifici del progetto sono focalizzati sullo studio elettrofisiologico e molecolare delle epilessie e delle patologie del neurosviluppo. In particolare, nella ricerca corrente del 2022 è rientrato lo studio dell' effetto di citochine pro- e anti- infiammatorie e cannabinoidi sulla trasmissione GABAergica. In particolare, sono stati realizzati:

1) caratterizzazione delle proprietà elettrofisiologiche delle correnti evocate dal GABA (ampiezza, decadimento, affinità, sensibilità a modulatori recettoriali) su tessuti di patologie del neurosviluppo (ganglioglioma, FCD, TSC) microtrapiantati in oociti di *Xenopus* prima e dopo il trattamento con interleukina-10, interleukina 1-beta e cannabidiolo.

2) Studio mediante trascrittomico della modulazione di geni facenti parte delle principali vie di segnalazione cellulare legate all' attivazione dei recettori dell' interleukina-1beta e dell' interleukina-10 (in collaborazione con il gruppo di ricerca dell' Academic Medical Center, Amsterdam).

3) Studio immunoistochimico del profilo di espressione dei principali recettori attivati dalle citochine coinvolte nei processi di generazione delle crisi ed epilettogenesi (in collaborazione con il gruppo di ricerca dell' Academic Medical Center, Amsterdam).

4) Studio delle caratteristiche elettrofisiologiche e molecolari di modelli cellulari di patologie epilettiche geneticamente determinate (mutazione SCN1A) (in collaborazione con il gruppo dell'Università Magna Graecia, Catanzaro).

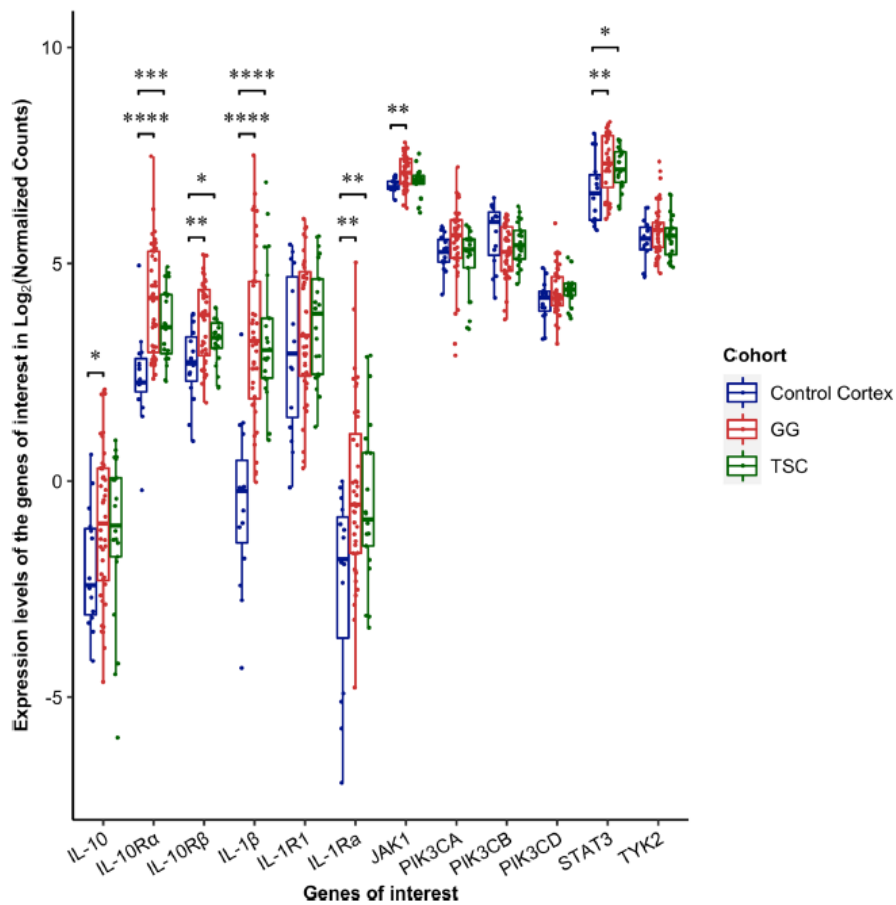
Fine ultimo di questo studio, e linea di ricerca del laboratorio, è la caratterizzazione delle risposte evocate dal GABA nella RS e altre patologie del neurosviluppo, con l'intento di trovare alterazioni GABAergiche comuni alle varie sindromi, che possano costituire un utile bersaglio terapeutico. Farmaci in grado di normalizzare la trasmissione GABAergica durante lo sviluppo potrebbero infatti prestarsi al trattamento di diverse neuropatologie in cui questa alterazione è comune.

Il principale significato della ricerca riguarda la possibilità offerta dalla tecnica del microtrapianto di membrane di studiare recettori funzionali direttamente su tessuti umani ottenuti da pazienti affetti da rare sindromi dello sviluppo contraddistinte dal contemporaneo sviluppo di epilessia. Ciò permette sia lo studio funzionale di proteine "genuine", non modificate dal modello in cui vengono espresse (Eusebi et al., 2009) approfondendo quindi la conoscenza della fisiopatologia e inoltre grazie a ciò permette di testare l' efficacia nuove molecole sul sistema GABAergico e glutammatergico.



I tessuti utilizzati sono ottenuti grazie alla collaborazione con il Dipartimento di Neuropatologia dell'Università di Amsterdam (AMC). L'uso di questi tessuti è stato autorizzato, oltre che dalle Commissioni Etiche del citato istituto, dalla Commissione Etica dell'Università Sapienza di Roma. Allo stato attuale, sono stati ottenuti i seguenti risultati:

1. Effetto di IL-1 $\beta$  e IL-10 sulla funzione GABAergica di gangliogliomi epilettogeni. Gli esperimenti svolti hanno contribuito a determinare il ruolo dell' interleuchina-10 (IL-10) e dell' interleuchina 1beta (IL-1 $\beta$ ) nella modulazione della funzione GABAergica in diverse patologie del neurosviluppo come TSC, FCD e ganglioglioma (GG). Attraverso un' analisi trascrittomica, è stata descritta una significativa attivazione delle pathways infiammatorie legate alle due citochine in TSC e GG. (Figura 1)

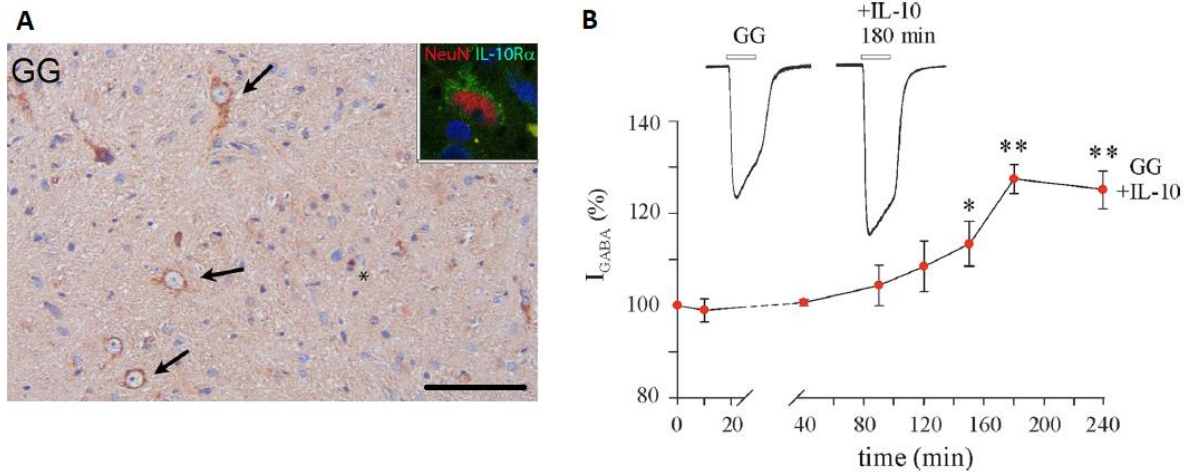


**Figura 1.** Espressione di geni di interesse in tessuti di controllo, ganglioglioma e sclerosi tuberosa. I dati di RNAseq indicano una significativa up-regolazione (adjusted p valute = 0.05) di IL-10 $\alpha$ , IL-10 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and STAT3 sia in TSC che in GG, mentre JAK1, elemento fondamentale del signaling, sembra essere up-regolato solamente nei tessuti GG.

Successivamente, è stato testato l'effetto di IL-10 e IL-1 $\beta$ , somministrate singolarmente o in associazione, su correnti evocate dal GABA in tessuti di TSC e GG microtrapiantati in oociti di *Xenopus*.

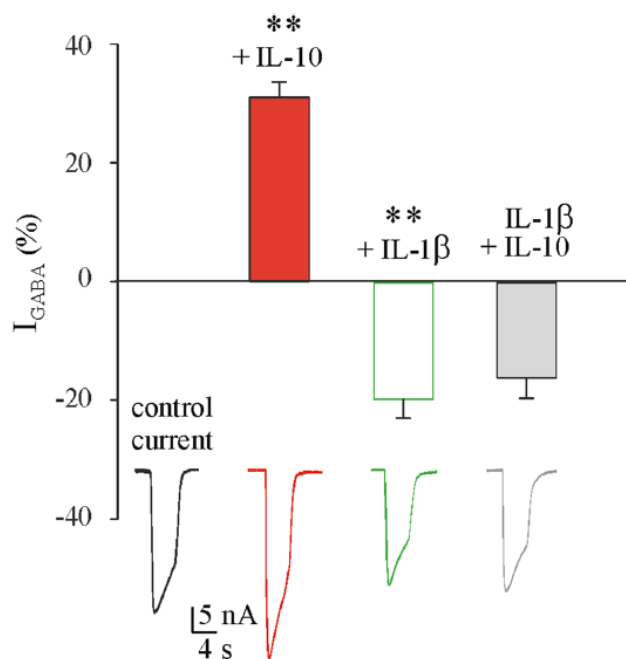
I risultati di questi esperimenti hanno confermato l'influenza fondamentale di mediatori pro-infiammatori nella modulazione negativa della funzione GABAergica, poiché l' IL-1 $\beta$  ha ridotto l' ampiezza delle correnti evocate dal GABA sia nei tessuti TSC che nei tessuti FCD. Inoltre, è stato messo in evidenza un effetto di potenziamento delle correnti GABA indotto dall' IL-10 nei tessuti di

GG, tessuti nei quali è stata descritta una maggiore attivazione del signaling (Figura 1) insieme ad una significativa espressione del recettore IL-10R (Figura 2).



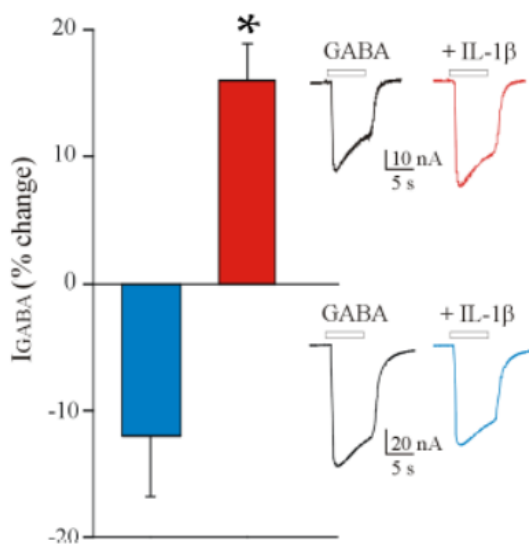
**Figura 2. A sinistra:** Espressione del recettore dell' IL-10 su neuroni displastici nel tessuto di ganglioglioma (barra nera = 100  $\mu$ M) e colocalizzazione di NeuN e subunità alfa del recettore dell' IL-10 (inset). **A destra:** effetto di potenziamento tempo-dipendente della corrente GABA indotto dall' incubazione in IL-10 degli oociti microtrapiantati con tessuti GG. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

Sorprendentemente, l'effetto dell'IL-10 è stato inibito da una pre-incubazione con IL-1 $\beta$  (Figura 3). Questi risultati suggeriscono che nel tessuto epilettogeno i meccanismi pro-infiammatori possono prevalere sulle pathways anti-infiammatorie che potenziano l'attività GABAergica. Quindi, il potenziamento di particolari molecole anti-infiammatorie potrebbe risolvere la neuroinfiammazione e attenuare le crisi farmaco-resistenti (Ruffolo et al., 2022, Scientific Reports).



**Figura 3.** Blocco dell' effetto dell' IL-10 da parte di una preincubazione con IL-1b.

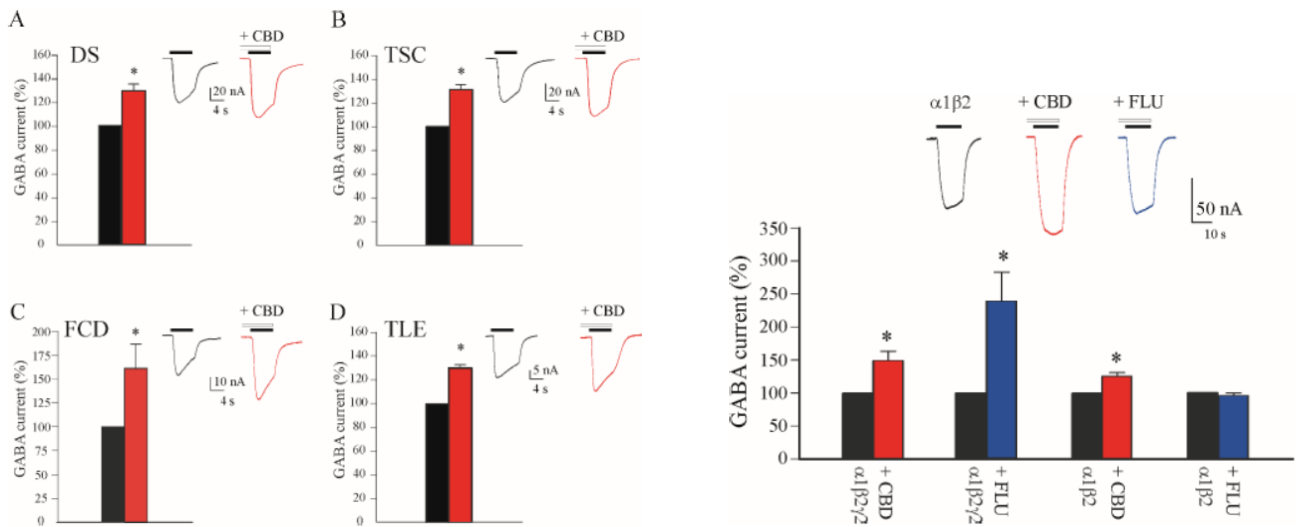
2. Effetto differenziale dell' IL-1 $\beta$  in tessuti FCD pediatrici e adulti. Mediante le tecniche del microtrapianto in oociti di *Xenopus* e dell'analisi trascrittomicca, è stato caratterizzato inoltre l'effetto dell' IL-1 $\beta$  in tessuti FCD pediatrici e adulti, correlandolo con lo stato di maturità della trasmissione GABAergica rilevato attraverso lo studio dell'espressione dei principali trasportatori del cloro, NKCC1 e KCC2, con tecniche di analisi trascrittomicca. I risultati (figura 4) indicano che nei tessuti FCD pediatrici una citochina infiammatoria come l' IL-1 $\beta$  induce il potenziamento di un' attività GABAergica aberrante, poiché meno iperpolarizzante a causa di un potenziale di inversione delle correnti GABA ( $E_{GABA}$ ) più depolarizzato. Ciò implica che i processi neuroinfiammatori e l'alterazione dell'omeostasi del cloro in questi tessuti possano contribuire a determinare l'aumentata eccitabilità che porta allo sviluppo di crisi epilettiche nei pazienti pediatrici affetti da displasia corticale focale.



**Figura 4.** Effetto differenziale dell' IL-1 $\beta$  su tessuti FCD pediatrici (barra e traccia in rosso) e adulti (barra e traccia in blu). L' aumento della corrente evocato dall' incubazione con IL-1 $\beta$  nei tessuti pediatrici era accompagnato da un aumento dell' espressione della citochina negli stessi tessuti e dalla presenza di un  $E_{GABA}$  più depolarizzato ( $-17.2 \pm 1.1$  mV,  $n = 13$ , FCD pediatrico vs  $-22.0 \pm 0.73$  mV,  $n = 10$ , FCD adulto)

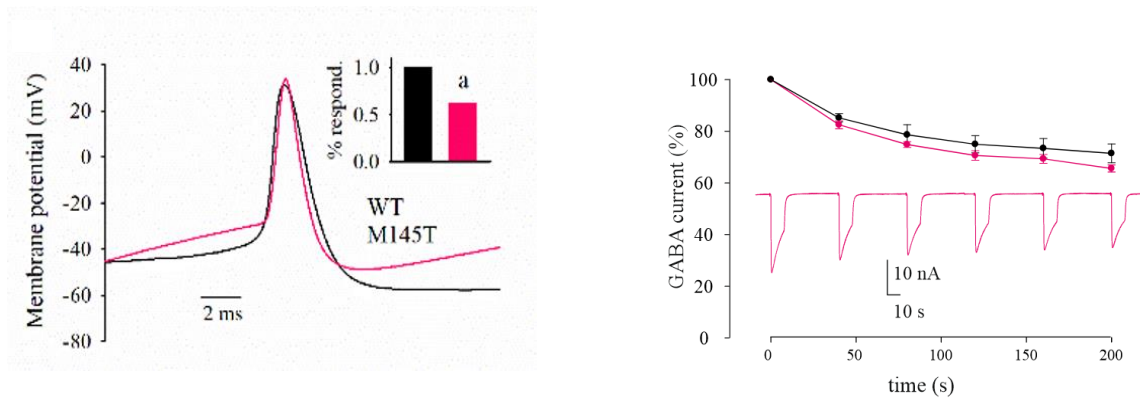
3. Esplorazione del Potenziale GABAergico del cannabidiolo nell' epilessia del lobo temporale e in sindromi epilettiche del neurosviluppo. Tra i principali problemi delle epilessie, particolarmente rilevante nei disordini epilettici del neurosviluppo, si trova senza dubbio quello della farmacoresistenza. Per questa ragione lo studio e la caratterizzazione dell' effetto di nuove molecole sulla neurotrasmissione GABAergica in tessuti umani è di fondamentale importanza per individuare nuove strategie terapeutiche, atte a ridurre la percentuale di pazienti farmacoresistenti. Per questo motivo, è stato studiato l'effetto del cannabidiolo su tessuti umani prelevati da soggetti con epilessia del lobo temporale, sindrome di Dravet, sclerosi tuberosa e displasia corticale focale. Inoltre, sono stati condotti ulteriori esperimenti su oociti iniettati con diverse combinazioni di cDNA codificanti subunità del recettore GABA $_A$ , per determinare se l'effetto del CBD fosse dipendente dall' interazione con specifiche isoforme del recettore GABA. I risultati (figura 5) permettono di concludere il CBD potrà dimostrarsi un farmaco molto promettente in diverse sindromi del neurosviluppo anche grazie alla sua capacità di potenziamento delle correnti GABAergiche (figura 5), presente anche su recettori privi della subunità  $\gamma$ . Quest' ultima caratteristica è di fondamentale importanza poiché farmaci molto comunemente utilizzati, come le benzodiazepine, perdono la loro efficacia se usati su recettori "γ-less"

mentre questo non succede al CBD, che non necessita della subunità  $\gamma$  per esercitare il suo effetto.



**Figura 5. A sinistra:** Potenziamento delle correnti evocate dal GABA in oociti iniettati con tessuti prelevati da pazienti con sindrome di Dravet (DS), sclerosi tuberosa (TSC), displasia corticale focale (FCD) ed epilessia del lobo temporale (TLE) **A destra:** L'effetto del cannabidiolo è preservato anche in un' isoforma del recettore  $GABA_A$  prive della subunità gamma.

4. Studio della trasmissione sinaptica in un modello di crisi febbrili genetiche ottenuto su neuroni derivati da iPSCs umane. La realizzazione di modelli cellulari affidabili è un obiettivo estremamente rilevante nello studio delle patologie epilettiche aventi origine genetica. In questo studio, frutto di una collaborazione con il gruppo di ricerca dell'Università Magna Graecia di Catanzaro è stata sfruttata la tecnologia delle iPSCs per differenziare neuroni da un paziente portatore di una mutazione a carico del gene *SCN1A*, codificante per la subunità alfa del canale del sodio voltaggio dipendente. Sullo stesso paziente era stato possibile in passato (Ruffolo et al., 2020, ACTN) realizzare delle misure di elettrofisiologia direttamente su *slices* di tessuto e tramite la tecnica del microtrapianto di membrane. I risultati ottenuti in questo studio hanno confermato la presenza, anche nel modello cellulare, di alterazioni del potenziale d'azione simili a quelle precedentemente registrate nel paziente (Ruffolo et al., 2020, figura 6), confermando quindi la bontà del modello. Inoltre, non è stato registrato un significativo run-down della corrente GABA (figura 6) nei neuroni derivati da iPSCs del paziente, poichè queste ultime pur possedendo la mutazione, non sono state sottoposte a nessun insulto di tipo epilettico. Di conseguenza, si può supportare l'ipotesi già scaturita da precedenti lavori (Mazzuferi et al., 2010) che il rundown della corrente GABA sia un'alterazione caratterizzante la fase cronica dell'epilessia del lobo temporale e che quindi nei casi di epilessia genetica, come quello del paziente studiato in questo lavoro, sia possibile pensare a strategie terapeutiche che ne prevenano la comparsa.



**Figura 6. A sinistra:** Alterazione della soglia del potenziale d'azione nei neuroni derivati da iPSCs ottenute da paziente portatore di mutazione a carico del gene SCN1A (magenta), rispetto a neuroni ottenuti da un soggetto di controllo (nero). **A destra:** Assenza di differenze significative nel run-down della corrente GABA tra neuroni derivati da soggetto sano (nero) e soggetto con mutazione SCN1A (magenta).

## Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare

*Ruolo del Recettore Mineralcorticoide (MR) nella malattia multiorgano: dai modelli preclinici ai determinanti di outcome cardiometabolico*

E' noto che la terapia con antagonisti del Recettore Mineralcorticoide (MR) riduce la mortalità in pazienti affetti da scompenso cardiaco. Il ruolo di MR è stato ampiamente descritto, non solo nel mantenimento dell'omeostasi elettrolitica, ma anche nella regolazione del metabolismo glucidico e del tessuto adiposo. In particolare, studi effettuati nel nostro laboratorio hanno mostrato che, in topi sottoposti a dieta obesogena, il trattamento con antagonisti di MR protegge dall'incremento ponderale, in particolare dall'espansione del tessuto adiposo, e dall'intolleranza ai carboidrati. Tali effetti sono in parte legati all'aumentata conversione del tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno, un fenomeno noto come "browning" del tessuto adiposo. Inoltre, è noto che l'antagonismo di MR riduce lo stress ossidativo a livello tissutale, la fibrosi e l'infiammazione vascolare.

Sulla base di studi effettuati anche da altri gruppi di ricerca, è stato proposto che il processo di conversione del tessuto adiposo bianco in bruno possa contrastare lo sviluppo di obesità e di ridotta tolleranza al glucosio.

Considerando che il muscolo scheletrico rappresenta un tessuto con una rilevante captazione di glucosio regolata da insulina, disfunzioni che alterano questo processo possono svolgere un ruolo chiave nello sviluppo di insulino-resistenza a diabete di tipo 2. I benefici metabolici osservati in modelli preclinici di obesità a seguito di trattamento con antagonisti di MR potrebbero essere mediati non solo da modificazioni metaboliche nel tessuto adiposo ma anche dal blocco/modulazione dell'attività di MR nel muscolo scheletrico. Inoltre nessuno studio finora pubblicato ha analizzato, in modelli preclinici di obesità, se la modulazione di MR possa modificare il grado di infiammazione e la captazione muscolare di glucosio. Inoltre, considerato che

disfunzioni metaboliche del fegato contribuiscono anch'esse allo sviluppo di insulino-resistenza, un'alterata funzione di MR nel fegato potrebbe contribuire allo sviluppo di NAFLD e NASH.

Allo scopo di colmare questo gap di conoscenza ci proponiamo di studiare l'attività di MR nel muscolo scheletrico e descrivendo gli effetti del blocco farmacologico di MR in termini di peso corporeo, abbondanza di tessuto adiposo bianco e bruno, tolleranza al glucosio in topi "wild-type" (WT) sottoposti per 3 mesi a dieta obesogena (HFD) contenente l'antagonista di MR Spironolattone.

Lo scopo dello studio nel fegato è quello di analizzare i potenziali effetti benefici del blocco farmacologico di MR con il Finerenone sullo sviluppo di NAFLD in topi diabetici (db/db). Sulla base dei dati ottenuti in vivo si procederà all'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nella fibrogenesi e nella sintesi de novo di acidi grassi in una linea cellulare di epatociti murini.

Tali analisi permetteranno di comprendere se i benefici metabolici osservati in modelli preclinici di obesità a seguito di trattamento con antagonisti di MR, possano essere mediati non solo da modificazioni metaboliche nel tessuto adiposo ma anche dal blocco/modulazione dell'attività di MR nel muscolo scheletrico e nel fegato.

Lo studio potrebbe chiarire aspetti fondamentali nel trattamento della sindrome metabolica, attraverso l'antagonismo farmacologico di MR. In particolare:

1. il trattamento con l'antagonista di MR a livello del muscolo scheletrico potrebbe diminuire il grado di infiammazione e conseguentemente migliorare l'attivazione del segnale insulinico, riducendo gli effetti deleteri della dieta obesogena (HFD) sul metabolismo del muscolo scheletrico;
2. l'antagonismo farmacologico di MR potrebbe inibire lo sviluppo di NAFLD/NASH nel diabete di tipo 2.

Lo studio ha impiegato topi maschi C57BL/6 wild type sottoposti a dieta normale o obesogena (60% di energia derivante da grassi) e trattati con un antagonista di MR per 4 mesi. Real-time PCR e tecniche di immunoistochimica sono state impiegate per valutare, nel tessuto adiposo dei topi, l'espressione dei geni coinvolti nel processo di adipogenesi, morfologia e localizzazione di specifiche proteine. Il test di tolleranza al glucosio e il test di tolleranza all'insulina sono stati effettuati nei topi tramite iniezione intraperitoneale rispettivamente di glucosio e insulina e successiva misura dei livelli di glucosio circolanti usando un glucometro. Sono stati altresì misurati i livelli plasmatici di colesterolo totale, trigliceridi e acidi grassi liberi.

Oltre alla valutazione dello stato metabolico, sono state effettuate un'analisi della dimensione delle fibre muscolari e una colorazione specifica per il contenuto lipidico a livello del muscolo scheletrico. E' stata inoltre analizzata l'espressione dei geni e proteine coinvolti nel segnale insulinico muscolare. Infine sono state realizzate colture in vitro di cellule muscolari murine trattate con palmitato per ottenere un modello di insulino-resistenza. Le cellule sono poi state trattate con spironolattone per lo studio del segnale insulinico.

Per quanto concerne lo studio nel fegato è previsto uno studio pilota per la validazione del modello con dieta formulata per indurre sviluppo di NASH. Si analizzeranno il fegato e il tessuto adiposo per lo studio della fibrogenesi, della de novo di acidi grassi e dell'infiammazione.

Per quanto concerne lo studio del muscolo, al termine del trattamento i topi obesi trattati con spironolattone mostravano un miglioramento della tolleranza al glucosio pur mantenendo un peso paragonabile a quello dei controlli obesi.

Contrariamente a quanto già osservato, dal gruppo di ricerca, in studi precedenti sull'espressione di MR nel tessuto adiposo di topi obesi, l'analisi in real-time e western blot del muscolo scheletrico (gastrocnemio) ha mostrato una riduzione dei livelli di MR, nei topi sottoposti ad HFD rispetto ai controlli magri, mentre il blocco sistemico del recettore, mediante somministrazione di spironolattone nella dieta, induceva un aumento dei livelli della proteina nel muscolo.

Al fine di investigare il ruolo di MR nel muscolo scheletrico, nel modello di obesità proposto, è stata inoltre valutata l'espressione genica di SGK-1, un noto target di MR in altri tessuti, inclusi il tessuto adiposo e di alcune miochine coinvolte nel metabolismo muscolare. In accordo con i dati sull'espressione proteica di MR, è stata osservata una regolazione negativa dei livelli di mRNA di SGK-1 nei topi obesi, con una reversione significativa dell'effetto nel gastrocnemio dei topi trattati con Spiro.

Per quanto riguarda le miochine analizzate è stata osservata un aumento significativo dell'espressione genica di IL-6 e irisina, ormone prodotto dal tessuto muscolare durante attività fisica coinvolto anche nel meccanismo del "browning", indotto da Spiro rispetto al gruppo in HFD. L'analisi del pathway di atrofia non ha mostrato variazioni significative nell'espressione genica di Atrogin e MURF-1 nei topi trattati con Spiro. La valutazione del segnale insulinico nel muscolo scheletrico è stata effettuata mediante analisi della fosforilazione di Akt e di IRS-1 nel gastrocnemio di topi in esperimento, stimolati con iniezione intraperitoneale di insulina per 15 min prima del sacrificio. L'analisi tramite western blot non ha rivelato differenze significative nell'attivazione del segnale insulinico nei topi obesi trattati con Spiro.

La deposizione ectopica di lipidi è stata valutata nel tibialis anterior mediante colorazione OilRed che ha mostrato una tendenza alla riduzione dell'accumulo di lipidi nel muscolo dei topi trattati con Spiro rispetto al gruppo HFD. Lo studio in vitro ha confermato i risultati ottenuti.

Nella seconda parte del 2022 sono state acquistate le diete commerciali per la realizzazione dell'esperimento pilota relativamente allo studio del blocco farmacologico di MR nel fegato.

L'Obesità Sarcopenica influisce negativamente sulla forza e sulla capacità aerobica e causa complicanze mediche severe. Questa complessa patologia rappresenta un urgente problema di salute pubblica in una società che invecchia rapidamente. Studi condotti in modelli animali hanno dimostrato che il blocco farmacologico di MR riduce l'espansione del tessuto adiposo e l'infiammazione, con potenziali effetti benefici su altri tessuti metabolicamente attivi, affetti dal rilascio di adipochine circolanti, come il muscolo scheletrico.

Una modulazione dell'attività di MR nel muscolo, dunque, potrebbe portare ad un miglioramento significativo del metabolismo muscolare anche nell'uomo, in presenza di obesità sarcopenica con e senza osteoporosi.

La crescente diffusione del diabete mellito di tipo 2 rappresenta un serio problema di salute pubblica. Oltre all'adozione di uno stile di vita più sano, l'impiego di terapie farmacologiche mirate a bloccare quei fattori che promuovono lo sviluppo di alterazioni metaboliche porterebbe ulteriori benefici terapeutici. La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) rappresenta oggi la forma più diffusa di epatopatia cronica nei Paesi Occidentali. Approssimativamente ha una prevalenza del 25% nella popolazione adulta e di questi circa il 30% evolve in NASH (steatosi epatica non alcolica). Queste percentuali sono destinate a crescere ancora di più nei prossimi anni, divenendo così un importante problema di salute pubblica da affrontare. La maggior parte dei pazienti con NAFLD presentano molteplici fattori di rischio cardiovascolare. Il nostro scopo principale è quello di investigare gli effetti del blocco del recettore mineralcorticoide sulla fibrosi e sulla deposizione di grasso nel fegato. L'antagonismo farmacologico di MR potrebbe rappresentare una nuova terapia farmacologica con l'obiettivo di arrestare la progressione della malattia attraverso la riduzione dell'infiammazione e/o della fibrosi epatica.

## **Laboratorio di Microbiologia**

*Batteri resistenti ai carbapenemi: profili di espressione dei geni che conferiscono resistenza agli antibiotici in isolati di Acinetobacter baumannii.*

*Acinetobacter baumannii* è un coccobacillo Gram-negativo aerobico non mobile, noto in passato come patogeno opportunisto, responsabile di infezioni in pazienti immunocompromessi (Levin et al., 2003). *A. baumannii* è responsabile di una vasta gamma di infezioni tra cui polmonite, infezioni del flusso sanguigno, infezioni del tratto urinario, ustioni e infezioni del sito chirurgico e meningite secondaria (Antunes et al., 2014; Hamidian e Nigro, 2019; Chakravarty 2020). In pazienti con malattie respiratorie, *A. baumannii* può causare infezioni gravi e persino pericolose per la vita (Grochowalska et al., 2017; Nunley et al., 2010; Kawamatawong et al., 2018). Le ragioni principali del successo patogeno di *A. baumannii* dipendono dalla plasticità del suo genoma, che consente l'acquisizione e l'espressione di geni esogeni di resistenza agli antibiotici (AR), la persistenza ambientale a lungo termine e la sopravvivenza nell'ospite umano (Hamidian e Nigro, 2019; Chakravarty 2020). Negli ultimi 60 anni, l'abuso e il cattivo utilizzo di antibiotici per applicazioni umane e non umane (ad es. zootecnia, agricoltura vegetale e medicina per applicazioni industriali) hanno indotto la rapida comparsa, aumento e diffusione di ceppi di *A. baumannii* multiresistenti agli antibiotici (MDR), estensivamente resistenti (XDR) e pandrug-resistenti (PDR) (Davies e Davies, 2010; Martínez et al., 2015; Crofts et al., 2017). A metà degli anni '80, le infezioni da *A. baumannii* erano trattate efficacemente con carbapenemi (Cb), una famiglia di antibiotici  $\beta$ -lattamici sintetici, come l'imipenem e il meropenem (Kesado et al., 1980; Kropp et al., 1980). Come altri antibiotici  $\beta$ -lattamici, li Cb entrano nei batteri Gram-negativi attraverso le proteine della membrana esterna (OMP, note anche come porine) e inattivano mediante acetilazione le proteine leganti la penicillina (PBP), gli enzimi responsabili dell'allungamento e della reticolazione del peptidoglicano della parete cellulare. L'inibizione delle PBP indebolisce il peptidoglicano, portando così generalmente a scoppio cellulare a causa della pressione osmotica. La squisita efficacia dei Cb risiede sull'elevata affinità di queste molecole non solo per PBP-2 come altri  $\beta$ -lattamici, ma per diverse PBP (Hashizume et al., 1984; Bonfiglio et al. al., 2002). Sfortunatamente, pochi anni dopo, il numero di *A. baumannii* resistenti ai Cb è notevolmente aumentato in tutto il mondo (Hamidian e Nigro, 2019; Chakravarty 2020). Di conseguenza, l'OMS ha incluso *A. baumannii* Cb-resistenti nel gruppo critico dei batteri che rappresentano la più grande minaccia per la salute umana, ([www.who.int/medicines](http://www.who.int/medicines), 2017). In Europa, molti paesi hanno sperimentato focolai di *A. baumannii* Cb-resistente soprattutto in strutture sanitarie, compresa l'Italia che ha registrato una percentuale relativamente alta di ceppi Cb-resistenti fino a 95.8% (Italy (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019>)). L'elevata velocità di acquisizione dell'antibiotico-resistenza in *A. baumannii* ed in altri patogeni emergenti, come gli *Escherichia coli* uropatogeni (UPEC) e *Pseudomonas aeruginosa*, associata alla mancanza di trattamenti efficaci per trattare queste infezioni sollecitano la necessità di ottenere maggiori informazioni sui meccanismi di antibiotico-resistenza in ceppi di interesse clinico.

Diversi meccanismi di resistenza ai Cb sono stati descritti in *A. baumannii*. Uno dei primi meccanismi descritti per *A. baumannii* era la diminuita espressione delle penicillin binding proteins (PBPs) con maggiore affinità per Cb ed un parallelo aumento di quelle a bassa affinità (Gehrlein et al., 1991). Inoltre, la produzione di carbapenemasi, l'espressione differenziale delle porine e le pompe di efflusso svolgono un ruolo importante nella resistenza ai Cb (Nowak e Paluchowska, 2016). Le carbapenemasi sono enzimi polimorfi suddivisi nelle classi A, B e D (Nowak e



Paluchowska, 2016). La classe B (metallo- $\beta$ -lattamasi, MBL) include enzimi IMP-, VIM- e NDM-like (Potron et al., 2015). Al contrario, le serin-carbapenemasi di classe A (che possiedono una serina nel sito attivo (Ambler et al., 1991) includono KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi) e  $\beta$ -lattamasi GES (Guiana a spettro esteso) (Norwak e Paluchowska, 2016). Le serin-carbapenemasi di classe D, ovvero gli enzimi OXA, costituiscono le carbapenemasi prevalenti negli isolati clinici di *A. baumannii* Cb-resistenti (Bonnin et al., 2013, Potron et al., 2015; Nowak e Paluchowska, 2016). Tra gli enzimi OXA-51-like, l'enzima OXA-23 è il più diffuso a livello globale (Nowak et al., 2017). In aggiunta, tali enzimi sono spesso sovraespressi negli isolati clinici di *A. baumannii* resistenti ai Cb, grazie all'acquisizione di elementi genetici, ISAb<sub>1</sub> o varianti, che ne deregolano l'espressione (Poirel e Nordmann, 2006; Walsh, 2010; Bonnin et al., 2013) Un altro meccanismo di resistenza è attraverso la produzione di vescicole della membrana esterna (*outer membrane vesicles*, OMVs). Queste vescicole contengono proteine biologicamente attive e DNA trasmissibile che contiene sequenze geniche associate a diverse funzioni, incluse quelle correlate o responsabili del fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Lo studio di queste vescicole potrebbe potenzialmente essere molto utile al fine di monitorare lo scambio di elementi genetici associati all'antibiotico-resistenza intra- ed inter-specie (Biomed Res Int 2021;2021:1490732). Inoltre, sta emergendo dalla letteratura scientifica un meccanismo di regolazione di espressione dei geni di resistenza e di virulenza tramite small RNA (Front. Microbiol. 2017 8, 803. doi:10.3389/fmicb.2017.00803; Trends Genet. 2021 37, 35–45. doi:10.1016/j. tig.2020.08.016). Negli ultimi anni, small RNA e di OMVs sono stati caratterizzati in diversi patogeni, inclusi *A. baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*. È stato dimostrato infatti che sono fondamentali anche nell'interazione con le cellule ospiti, promuovendone la patogenicità (Trends Genet. 2021 37, 35–45. doi:10.1016/j. tig.2020.08.016). Pertanto, lo scopo principale dell'attività di ricerca del 2022 è stato quello di indagare il ruolo degli small RNA e delle OMVs in patogeni di interesse clinico, ovvero *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ed *E. coli*, al fine di identificare nuove strategie anti-virulenza a supporto della terapia antibiotica, in un'ottica di "disarmo" della virulenza batterica. In particolare, le infezioni del tratto urinario (UTI) sono una delle principali preoccupazioni per la salute pubblica. Il batterio uropatogeno prevalente in ambito sanitario impostazioni è *E. coli* (Murray et al., 2022). Il tasso crescente di ceppi resistenti agli antibiotici richiede studi per comprendere la patogenesi di *E. coli* guidare lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. L'attività di ricerca dello scorso anno ha fornito per la prima volta il profilo dei geni metabolici e di virulenza nel ceppo CFT073 durante la fase di adesione alle cellule epiteliali vescicali, step essenziale per la patogenesi degli UPEC.

Nel 2023, l'attività di ricerca nell'ambito del progetto "Batteri resistenti ai carbapenemi: profili di espressione dei geni che conferiscono resistenza agli antibiotici in isolati di *Acinetobacter baumannii*" sarà incentrata sulla caratterizzazione di porine di membrana potenzialmente coinvolte nella resistenza ad antibiotici/disinfettanti e nell'interazione con le cellule ospiti. Infatti, è stato già caratterizzato il ruolo chiave di OmpA sulla fisiologia e patogenesi di *A. baumannii*. Infatti, oltre ai suoi ruoli fisiologici sulla stabilità della parete e membrana esterna e nella resistenza agli antibiotici, OmpA svolge un ruolo chiave anche nella persistenza ambientale (Sarshar et al., 2021; Pompilio et al., 2021). Tuttavia, nonostante gli studi approfonditi su OmpA, si sa poco sui geni annotati come simili a *ompA*, che potrebbero rappresentare bersagli clinici rilevanti. Queste proteine hanno la potenziale capacità di essere richieste per la stabilità dell'involucro cellulare, la resistenza agli antibiotici, la risposta a stress esterni, nonché l'attività di

formazione di biofilm e l'adesione alle cellule ospiti. Pertanto, un'analisi sistematica del/i ruolo/i delle proteine simili a OmpA potrebbe aumentare le nostre conoscenze su questo patogeno, che rappresenta una seria minaccia per i pazienti fragili e immunocompromessi. Pertanto, lo scopo principale del progetto nel prossimo anno sarà quello di valutare il ruolo funzionale delle proteine OmpA-like nella fisiologia e patogenesi di *A. baumannii* utilizzando il ceppo di riferimento di *A. baumannii* AB5075.

Lo studio si propone i seguenti obiettivi specifici:

- Caratterizzare il ruolo ed il contenuto delle OMVs di *A. baumannii*, patogeno di interesse da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità;
- Caratterizzare i meccanismi molecolari di interazione tra gli small RNA di *A. baumannii* e le cellule ospiti, in un'ottica di "disarmo" della virulenza batterica, a supporto della terapia antibiotica;
- Studiare come si modifica il profilo di espressione dei geni di virulenza nel uropatogeno *E. coli* durante l'interazione con le cellule ospiti durante la fase di adesione batterica mediante un approccio di Real Time-PCR semi quantitativa;
- Individuare nuove strategie per il contrasto al fenomeno dell'antibiotico-resistenza nel patogeno *P. aeruginosa* bersagli molecolari per approcci terapeutici innovativi;
- Analisi sistematica del/i ruolo/i delle proteine simili a OmpA nella stabilità dell'envelope batterico, la resistenza agli antibiotici/disinfettanti, la risposta a stress esterni, nonché l'attività di formazione di biofilm e l'adesione alle cellule ospiti (Fig. 1); in particolare, mutanti sito-specifici saranno analizzati rispetto al ceppo wild type per Tassi di crescita, profilo di suscettibilità antimicrobica, permeabilità di membrana, motilità, formazione di biofilm, capacità di adesione della cellula ospite, virulenza in vitro ed in vivo, spessore dell'involucro cellulare e tolleranza allo stress a diversi stimoli ambientali (antibiotici, disinfettanti, stress acido e alcalino, temperatura, detergenti ad alta osmolarità, alcool, forza ionica, inibitore della pompa di efflusso e siero umano).

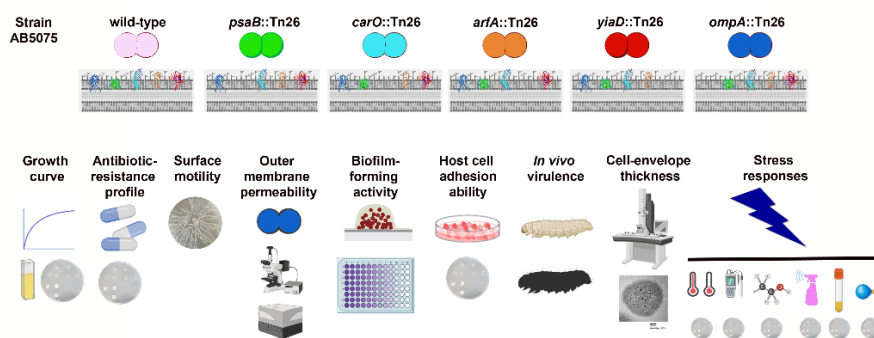


Fig. 1. Rappresentazione schematica del progetto. In alto, nell'immagine sono rappresentati schematicamente il ceppo wild-type AB5075 e i mutanti isogenici deleti per i geni codificanti le differenti porine OmpA-like. In basso, è riassunto il disegno sperimentale allo scopo di indagare la fisiologia cellulare, la resistenza agli antibiotici, la tolleranza agli stress ambientali e la virulenza.

La prosecuzione di questo progetto è incentrata sulla caratterizzazione del ruolo fisiologico e patogeno dei geni che codificano per proteine OmpA-like in *A. baumannii*. Caratterizzare la loro funzione rappresenta un promettente trampolino di lancio per lo sviluppo di nuovi agenti terapeutici contro la persistenza ambientale di *A. baumannii*, nonché contro la resistenza antibiotica e contro l'invasione delle cellule dell'ospite e l'evasione dal sistema immunitario. In effetti, queste proteine potrebbero essere utilizzate come antigeni potenzialmente protettivi contro *A. baumannii*, fungendo da candidati per preparazioni vaccinali. Inoltre, nuovi composti naturali e sintetici potrebbero essere utilizzati per attenuarne l'espressione e/o la funzione,

diminuendo così la sua attività di formazione di biofilm, la resistenza agli stress ambientali, gli antimicrobici/disinfettanti e l'invasione delle cellule ospiti.

La rapida resistenza agli antibiotici/disinfettanti e l'ampia adattabilità ambientale consentono a microrganismi come *A. baumannii* di diventare una minaccia per i pazienti nelle strutture sanitarie di tutto il mondo, comprese le strutture di Riabilitazione (Zheng et al., 2021). Molti studi hanno dimostrato che *A. baumannii* è in grado di persistere negli ambienti ospedalieri e comunitari per lunghi periodi, causando infezioni difficili da trattare (Sarshar et al., 2021; Pompilio et al., 2021). Uno dei principali fattori di virulenza in *A. baumannii* è OmpA, verso il quale sono attualmente in studio vaccini e terapie specifiche (Gedefie et al., 2021). Sebbene fino ad oggi siano stati compiuti progressi significativi nella comprensione della fisiologia e della patogenesi di *A. baumannii*, le opzioni cliniche per combattere questo microrganismo sono ancora molto scarse. È particolarmente importante identificare i fattori che influenzano l'adattamento del batterio nell'ambiente e nell'interazione con le cellule ospiti. Identificare i fattori che ne determinano la persistenza nell'ambiente, la replicazione all'interno dell'ospite e i meccanismi di difesa contro la risposta immunitaria dell'ospite sono critici per poter sviluppare nuove strategie anti-virulenza a supporto della terapia antibiotica, in un'ottica di "disarmare" il patogeno dai fattori di virulenza.

#### CEPPI BATTERICI

*A. baumannii* AB5075 è un recente isolato clinico *extensively drug resistant* (XDR), che ha mostrato un'elevata virulenza in modelli animali. È diventato un ceppo modello per lo studio della patogenicità e dei trattamenti antimicrobici di *A. baumannii* (Jacobs et al., 2014). Il genoma di questo ceppo modello e dei suoi tre plasmidi è stato sequenziato (Gallagher et al., 2015). L'analisi del genoma del ceppo AB5075 (wild type) per geni simili a *ompA* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP008706.1>) ha identificato sei loci: ABUW\_0505 (*psaB*), ABUW\_0649 (*ompA*), ABUW\_1015 (*carO*), ABUW\_2571 (*yiaD1*), ABUW\_2730 (*arfA*) e ABUW\_3045 (*yiaD2*). Pertanto verranno acquisiti i mutanti in questi loci dalla BEI Resources e controllati mediante PCR e sequenziamento del DNA.

#### TASSO DI CRESCITA E SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA

La cinetica di crescita di ciascun mutante sarà valutata mediante misure di torbidità e unità formanti colonie/ml (CFU/ml) rispetto al ceppo wild-type AB5075 in LB a 37°C. Il test di sensibilità antimicrobica è eseguito da MICROSCAN WalkAway System 96 Plus (Beckman Coulter S.r.l.) e, i valori di concentrazione minima inibente (MIC) risultanti, saranno classificati in categorie cliniche di suscettibile, intermedio o resistente, seguendo EUCAST 2022 ([https://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)).

#### MICROSCOPIO ELETTRONICO

Per valutare lo spessore dell'envelope batterico, i ceppi (AB5075 e mutanti sito-specifici) saranno lavati e fissati in soluzione salina tamponata con glutaraldeide/fosfato (PBS) al 2.5%. Dopo il fissaggio in tetrossido di osmio, i campioni saranno processati seguendo un protocollo standard per l'inclusione nella resina Epon. Saranno selezionate almeno 6 immagini; verranno registrate da 20 a 30 misure di valori massimo e minimo dello spessore dell'involucro cellulare e verrà assegnato un valore medio.

#### PERMEABILITÀ DELLA MEMBRANA

L'integrità di membrana dei ceppi wild type e mutanti è valutata utilizzando la sostanza chimica fluorescente DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindolo) (blu). Le cellule in fase stazionaria saranno colorate per 30 minuti e lavate due volte con PBS. La permeabilità delle cellule batteriche sarà valutata qualitativamente acquisendo immagini di batteri su vetrini coprioggetto trattati con polilisina con un microscopio Leica DM5000B (fotocamera DFX340/DFX300) e quantitativamente registrando la quantità di fluorescenza trattenuta dai batteri con un lettore di micropiastre FLUOstar Omega (BMG Labtech).

## SAGGIO DEL BIOFILM

Le colture overnight saranno diluite 1:50 in 200 µl di LB e dispensate in micropiastre di polistirene a 96 pozzetti (Costar, Corning Inc.) e incubate a 37°C per 24 ore in condizioni statiche. Dopo le misurazioni di OD600, le piastre saranno lavate tre volte con PBS, fissate con metanolo per 20 minuti a temperatura ambiente e colorate con una soluzione di cristalvioletto allo 0.1% per 15 minuti. Dopo quattro ulteriori lavaggi con acqua, il colorante associato alla superficie verrà solubilizzato con 200 µl di etanolo al 95% e verrà registrata la OD570. I risultati saranno riportati come descritto in precedenza (Stepanovic et al., 2007).

## SAGGIO DI MOTILITÀ

La motilità (*surface motility*) è studiata su piastre a basso contenuto di agar (0,25%). I batteri saranno inoculati al centro e le piastre saranno incubate a 37°C per 24 h (Clemmer et al., 2011).

## SAGGIO DI ADERENZA

La linea di cellule epiteliali polmonari umane A549 di tipo II (ATCC CCL185) è coltivata in mezzo di Eagle modificato di Dulbecco (DMEM) integrato con il 10% di siero bovino fetale e coltivata in presenza di CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. I monostrati cellulari confluenti saranno infettati ad una molteplicità di infezione (MOI) di 10, centrifugati, incubati per 180 min a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> e, dopo 8 lavaggi con PBS, lisati con 0.1% Triton X-100. I lisati serialmente diluiti saranno seminati su piastre di LB agar per determinare il numero di batteri aderenti (CFU/ml).

## VIRULENZA

Per l'esame in vivo della virulenza dei mutanti *ompA*-like verrà eseguito il saggio di sopravvivenza della *Galleria mellonella*, iniettando 10 µl di sospensioni batterica in PBS contenenti 10<sup>5</sup> unità formanti colonia (CFU/ml).

## RISPOSTA ALLO STRESS AGLI STIMOLI AMBIENTALI

Per valutare la tolleranza allo stress di ogni mutante *ompA*-like rispetto al wild-type, le CFU/ml saranno enumerate dopo aver coltivato ogni ceppo in LB in diverse condizioni di crescita. Gli stress includeranno alta e bassa temperatura (cioè 25 e 42°C), alta osmolarità (30-20 g/l Na Cl), alcol (8-4% di etanolo); detergenti (1-0,1 % Triton X-100), condizioni di stress acido e alcalino (pH 6 e 8), antibiotici (meropenem 8-2 µg/ml; zeocina 50-12,5 µg/ml; novobiocina 8-2 µg/ml); disinfettante (clorexidina 64-16 µg/ml); inibitore della pompa di efflusso (clopromazina 32-8 µg/ml); siero umano normale (100-80%).

Invece, lo studio di *E. coli* uropatogeni (UPEC) ha confrontato il profilo di espressione genica di selezionati geni bersaglio coinvolti nel processo di adesione alle cellule epiteliali della vescica dell'ospite nel ceppo CFT073 prototipo di *E. coli* uropatogeno (UPEC). Il ceppo CFT073 è stato coltivato in Luria Bertani (LB), urina artificiale (AU), e durante l'adesione alle cellule della vescica ospite; a tempi stabiliti è stato estratto l'RNA totale, retro-trascritto ed i livelli di espressione dei geni selezionati nello studio sono stati quantificati mediante analisi Real Time-PCR semi-quantitativa. e in tempo reale (RT-PCR). L'AU supportato ha efficacemente la crescita del ceppo CFT073 così come di altri ceppi UPEC, confermando così l'appropriatezza di questo terreno per i modelli in vitro. Inaspettatamente, l'espressione genica del ceppo CFT073 in LB e AU era abbastanza simile; al contrario, durante il saggio di adesione, le adesine e le porine erano sovraregolate, mentre i principali regolatori globali erano sottoregolati solo in terreno LB. È interessante notare che i geni *fimH* e *papGII* erano significativamente espressi in tutte le condizioni testate. I risultati di questo studio hanno fornito per la prima volta il profilo dei geni metabolici e di virulenza nel ceppo CFT073 durante la fase di adesione alle cellule epiteliali vescicali, step essenziale per la patogenesi degli UPEC.

*Infezioni da patogeni multi resistenti in pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) ospedalizzati: ruolo delle molecole di adesione epiteliali e della risposta immunitaria e infiammatoria (PATO-ESCAPE)*

*Acinetobacter baumannii* è un coccobacillo aerobio Gram-negativo non mobile, noto in passato come patogeno opportunisto, responsabile di infezioni gravi nei pazienti immunocompromessi (Levin et al., 2003). *A. baumannii* è responsabile di una vasta gamma di infezioni, inclusa la polmonite, principalmente in pazienti affetti da malattie polmonari come la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) (Grochowalska et al., 2017; Kang et al., 2020; Ayoub Moubareck e Hammoudi Halat, 2020; Chakravarty 2020). In effetti, i pazienti con BPCO che sperimentano un'esacerbazione acuta della BPCO potrebbero sviluppare una perdita accelerata della funzione polmonare, un aumento della mortalità, una diminuzione della qualità della vita correlata alla salute e costi economici significativi (Grochowalska et al. 2017). I pazienti con BPCO acuta esacerbata guariscono più velocemente se ricoverati precocemente presso le riabilitazioni respiratorie; tuttavia, gli attuali interventi farmacologici sono spesso inefficaci nella prevenzione delle malattie infettive a causa dell'aumento dei tassi di resistenza agli antibiotici dei patogeni respiratori batterici (Grochowalska et al. 2017). Le ragioni principali del successo patogeno di *A. baumannii* si basano sulla plasticità del suo genoma, che consente l'acquisizione e l'espressione di geni esogeni di resistenza agli antibiotici (AR), la persistenza ambientale a lungo termine e la sopravvivenza in e sull'ospite umano (Hamidian e Nigro, 2019; Chakravarty, 2020). Inoltre, possiede la membrana esterna superficiale e/o adesine fimbriali che ne consentono l'interiorizzazione all'interno delle cellule ospiti come strategia di evasione immunitaria. Sebbene il meccanismo di interazione tra *A. baumannii* e le cellule ospiti rimanga poco chiaro, sta diventando evidente che l'adesione e l'invasione sono migliorate dal legame a specifici recettori dell'ospite (Smani et al., 2012; Harding 2018; Ambrosi et al., 2020). Pertanto, sono urgentemente necessarie terapie preventive alternative. L'adesione del patogeno all'epitelio polmonare attraverso i recettori dell'ospite è il prerequisito per l'invasione e la successiva infezione delle strutture circostanti (Smani et al., 2012; Shukla et al., 2014; Ambrosi et al., 2020). Inoltre, la progressione della colonizzazione batterica è facilitata se i pazienti hanno difetti nelle difese immunitarie innate dell'ospite (Grochowalska et al. 2017; Pires e Parker, 2019). L'efficacia della risposta immunitaria dei pazienti è fondamentale per garantire un'efficace protezione contro gli agenti patogeni; tuttavia, nella BPCO il sistema immunitario può mostrare profonde alterazioni dovute all'infiammazione cronica. Nei pazienti con BPCO il sistema immunitario innato di questi pazienti è disregolato, con alterazioni nel numero dei macrofagi (Costabel, 1992), degli eosinofili (Greulich, 2020) e dei linfociti natural killer (NK) (Osterburg, 2020). Paradossalmente, invece di aumentare la qualità della risposta immunitaria dei pazienti, il sistema immunitario cronicamente attivato nei tessuti polmonari, aumenta la vulnerabilità alle infezioni virali e batteriche che causano esacerbazioni acute (Wedzicha, 2015). Pertanto, nuove strategie terapeutiche che interrompono le interazioni batterico-cellula ospite o che mediano la risposta infiammatoria dell'ospite rappresentano un approccio interessante per ridurre le esacerbazioni infettive nei pazienti con BPCO.

*A. baumannii* è emerso negli ultimi decenni come uno dei più preoccupanti patogeni opportunisti responsabili di infezioni in ambito sanitario, a causa della scarsità di antibiotici ancora efficaci contro questo microrganismo. Inoltre, queste infezioni possono diventare pericolose per la vita dei pazienti che si sottopongono alla riabilitazione respiratoria, in particolare per i pazienti con esacerbazioni acute della broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). La BPCO è un problema sanitario globale importante e in aumento, rappresentando la terza causa di morte nel mondo e una delle principali cause di morbidità (Global Burden of Disease Study, 2015). La BPCO è

caratterizzata da infiammazione cronica, fibrosi delle piccole vie aeree e distruzione del parenchima polmonare (enfisema) (Labaki e Rosenberg, 2020). L'esacerbazione acuta della BPCO è un evento acuto caratterizzato da un peggioramento dei sintomi respiratori del paziente, un segnale di progressione della malattia e una delle principali cause di ricovero del paziente (Celli e Barnes, 2007; Burge e Wedzicha, 2003). Sia le esacerbazioni acute della BPCO che il ricovero in ospedale aumentano i rischi di infezioni batteriche, in particolare per i ceppi multiresistenti (MDR) come *A. baumannii*, i patogeni più problematici per i centri sanitari (Grochowalska et al. 2017). I dati in letteratura mostrano che i tassi di mortalità sono più elevati nei pazienti con batteri MDR, rispetto ai pazienti con altre infezioni batteriche (Nseir e Ader, 2008; Grochowalska et al. 2017). Diverse evidenze hanno suggerito che la colonizzazione/infezione dei pazienti con BPCO da parte di *A. baumannii* potrebbe essere favorita da vari fattori, inclusa la presenza di recettori specifici sulle cellule epiteliali bronchiali e risposte infiammatorie e immunitarie inefficaci. La sovraregolazione dei recettori sull'epitelio delle vie aeree, come la cellula correlata all'antigene carcinoembrionale (CEACAM) e i recettori del fattore di attivazione delle piastrine (PAFR) potrebbe aumentare l'adesione batterica e l'invasione dei tessuti. Inoltre, le risposte infiammatorie e immunitarie inefficienti potrebbero peggiorare l'esito clinico. L'alterazione della sottopopolazione di cellule del sistema immunitario (cioè, proporzione alterata della popolazione, con predominanza di cellule attivate o regolatorie/soppressori) potrebbe aumentare la suscettibilità dei pazienti alle infezioni batteriche. Pertanto, lo scopo di questo progetto è valutare la colonizzazione/infezione da *A. baumannii* e l'infiammazione bronchiale/sistemica e le risposte immunitarie in pazienti con BPCO esacerbata, rispetto a pazienti con BPCO stabile, dell'Unità di Riabilitazione Respiratoria dell'IRCCS San Raffaele, Pisana. Questi studi potrebbero migliorare le nostre conoscenze sull'infiammazione delle vie aeree, sulla risposta immunitaria e sui modelli microbici bronchiali nei pazienti con esacerbazione acuta della BPCO. I risultati potrebbero migliorare le strategie per combattere le infezioni associate alla comunità e identificare potenziali fattori di rischio nei pazienti suscettibili, contribuendo così al miglioramento dei trattamenti clinici. Gli obiettivi principali del progetto sono:

Obiettivi primari:

1. Valutare la presenza di patogeni MDR nell'espettorato di pazienti con esacerbazione acuta di BPCO ricoverati presso l'Unità di Riabilitazione Respiratoria dell'IRCCS San Raffaele Pisana, nonché la loro identificazione e rilevazione di geni di resistenza agli antibiotici.
2. Analizzare i profili di espressione del recettore CEACAM e PAFR sulla superficie delle cellule epiteliali bronchiali ottenute dall'espettorato per valutare il rischio di colonizzazione/infezione batterica.

Obiettivi secondari:

1. Caratterizzazione del fenotipo leucocitario nell'espettorato, con particolare attenzione a neutrofili, eosinofili, monociti/macrofagi e linfociti T regolatori.
2. Valutazione della presenza di popolazioni di leucociti presenti nell'espettorato nel sangue periferico.

Questo progetto offre l'opportunità di raccogliere dati epidemiologici sulla colonizzazione/infezione da *A. baumannii* in pazienti con esacerbazione acuta di BPCO ricoverati nelle Unità di Riabilitazione Respiratoria, che sono pochissime in Italia e verificare se questi pazienti sono più inclini alle infezioni batteriche, in particolare a *A. baumannii*. Infatti, è stato riportato che *A. baumannii* sfrutta i recettori eucariotici per la sua adesione stabile al tessuto respiratorio e per la sua interiorizzazione all'interno di pneumociti come CEACAM1, CEACAM5, CEACAM6 e PAFR (Smani et al., 2012, Ambrosi et al., 2020). Pertanto, il presente progetto intende consentire di esaminare campioni di pazienti con esacerbazione acuta di BPCO risultati positivi per la presenza di *A. baumannii* per i livelli di espressione di questi recettori che potrebbero

rappresentare un aumentato rischio di infezioni da *A. baumannii* associate alla comunità. Questo screening è effettuato mediante citometria a flusso e analisi Western blot su campioni provenienti da pazienti con esacerbazione acuta di BPCO positivi per infezioni da *A. baumannii* mentre i pazienti con BPCO stabile saranno utilizzati come controlli.

Nel loro insieme, i risultati del presente progetto possono fornire dati epidemiologici sulle infezioni batteriche nei pazienti con esacerbazione acuta della BPCO ed evidenziare la potenziale valutazione del rischio per le infezioni da *A. baumannii* associate alla comunità analizzando i livelli di espressione dei recettori dell'ospite sfruttati anche dai patogeni respiratori come le risposte infiammatorie e immunitarie dell'ospite. Questi risultati miglioreranno sostanzialmente la cura dei pazienti con BPCO durante il processo di riabilitazione, contribuendo così a promuovere lo stato clinico e l'esito dei pazienti.

Sono inclusi nello studio i pazienti con BPCO stabile ed esacerbata afferenti all'ambulatorio ed al reparto di Riabilitazione Respiratoria dell'IRCCS San Raffaele. I pazienti, dopo firma del consenso informato, sono sottoposti a prelievo di sangue venoso e ad un campione di espettorato all'ammissione in ambulatorio e in Riabilitazione. Solo per i pazienti ricoverati con BPCO esacerbata viene raccolto un campione alle dimissioni dal reparto. I campioni ematici e di espettorato sono incubati con anticorpi diretti contro marcatori di lineage cellulare, coniugati con fluorocromi, secondo protocolli standard, e poi sono acquisiti ed analizzati al citofluorimetro LSR Fortessa X-20. G. Parallelamente, i campioni di espettorato vengono diluiti 1:10 e seminati su piastre di MacConkey e di terreno cromogeno. Il giorno seguente, le colonie vengono sottoposte ad identificazione molecolare ed antibiogramma.

Per questo progetto è stato ottenuto il consenso da parte del Comitato Etico del San Raffaele (Numero Registro Pareri 21/17). Al 31/01/2022, sono stati arruolati 5 pazienti. Nel corso del 2023 l'arruolamento dovrebbe essere completato.

Secondo i dati del Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), i ceppi MDR di *A. baumannii* sono in progressivo aumento; infatti, gli isolati di *A. baumannii* resistenti a carbapenemi, fluorochinoloni e aminoglicosidi sono aumentati fino a 95,8 nei paesi baltici e nell'Europa meridionale e sud-orientale nel 2019 (<https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-dati/sorveglianza-resistenza-antimicrobica-europa-2019>). Questi dati sottolineano la mancanza di trattamenti antimicrobici efficaci contro le infezioni causate da batteri MDR, soprattutto nei pazienti con esacerbazione acuta della BPCO, con aumento dei tassi di mortalità e pesante onere economico per il Sistema Sanitario Nazionale, a causa dell'estensione delle degenze ospedaliere e dei costi indiretti. Pertanto, la sorveglianza microbiologica è essenziale per promuovere la qualità delle cure e ridurre il rischio di infezioni per i pazienti ospedalizzati. Pertanto, gli impatti di questi progetti per il Sistema Sanitario Nazionale sono i) essere consapevoli dei potenziali rischi per le infezioni da *A. baumannii* associate alla comunità in pazienti con esacerbazione acuta di BPCO e ii) applicare misure e trattamenti clinici specifici per prevenire e combattere queste infezioni.

### *Ruolo dei virus nell'insorgenza, nella progressione e nelle complicanze di patologie cronico-degenerative*

È ormai ampiamente dimostrato che i microrganismi, in particolare i virus, sono coinvolti nell'innescamento, nella progressione e nelle complicanze di patologie croniche non trasmissibili. Per la loro capacità di infettare, persistere e riattivarsi nell'ospite, alcuni virus sono stati riconosciuti come fattori implicati in varie patologie cronico-degenerative del sistema nervoso centrale (SNC). I virus neurotropi infatti, pur iniziando il processo infettivo in un sito distante (come mucose, pelle, intestino) sono in grado di raggiungere il SNC superando la barriera ematoencefalica attraverso i nervi periferici, oppure attraverso le cellule del sistema immunitario, come è stato dimostrato ad

esempio per alcuni virus respiratori. Recentemente, anche il SARS-CoV-2, responsabile della pandemia ancora in corso, è stato ritrovato nei neuroni e nelle cellule endoteliali del lobo frontale di un paziente post-mortem. Per alcune patologie, è stato dimostrato un ruolo causale, come per la panencefalite sclerosante subacuta, una forma rara e progressiva di malattia infiammatoria del cervello causata dal virus del morbillo [4]; recentemente, un importante fattore di rischio per l'Alzheimer è stato riscontrato nelle riattivazioni ricorrenti di HSV1. Per altre patologie neurodegenerative, quali Parkinson e sindrome di Guillain-Barré, il ruolo delle infezioni virali è meno chiaro. Un'ipotesi è che i virus mantengano uno stato neuroinfiammatorio, sia direttamente, che indirettamente, attraverso l'attivazione della risposta immunitaria antivirale; è noto che i virus inoltre inducono un forte sbilanciamento dello stato redox intracellulare verso condizioni pro-ossidanti, con rilascio di allarmine redox-sensibili che potrebbero contribuire al danno. Tuttavia, i meccanismi eziopatogenetici, probabilmente condivisi da più microrganismi, e risultanti da una complessa interazione microrganismo-ospite, non sono ancora chiari.

Nel caso della Sclerosi Multipla, un'altra patologia neurodegenerativa che colpisce il SNC, è ormai risaputo che l'uso di farmaci modificanti il decorso della malattia (DMTs), è spesso correlato ad un aumento di infezioni opportunistiche, come quella sostenuta dal polyomavirus umano JC (JCPyV), agente eziologico di una malattia demielinizante e spesso fatale, la Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML). I primi casi di PML si sono verificati nel 2005, in seguito al trattamento di pazienti affetti da SM con il Natalizumab (NTZ), un anticorpo monoclonale che esplica il suo meccanismo d'azione legandosi alla subunità alfa4 espressa sulla superficie dei leucociti. Tale legame previene l'adesione dell'integrina al suo recettore il che impedisce la migrazione dei leucociti attraverso la BEE e sopprime la risposta immunitaria mediata dai linfociti T. Se da una parte il meccanismo d'azione del NTZ mitiga la cascata infiammatoria nei pazienti affetti da SM, la diminuzione dell'immunosorveglianza può favorire la riattivazione di JCPyV dalla latenza/persistenza. Ad oggi, sono stati confermati più di 800 casi in pazienti trattati con questo farmaco, con un tasso di mortalità superiore al 20% e sostanziale morbilità nei sopravvissuti [10]. L'armamentario terapeutico per il trattamento della SM si è recentemente arricchito di due nuovi farmaci, la Cladribina (Clad) e l'Ocrelizumab (Ocre), i quali, pur esercitando una profonda azione soppressiva più o meno prolungata sul sistema immunitario, sembrano essere correlati con un rischio minore alla PML. Tuttavia, non è chiaro, se il rischio minore sia dovuto al meccanismo d'azione con cui questi farmaci agiscono sul sistema immunitario, o se si tratti, invece, di una sottostima del fenomeno dovuta al basso potere diagnostico dei biomarcatori in uso. Il rischio di PML nei pazienti trattati con NTZ è determinato mediante l'utilizzo di una scala specifica, STRATIFY INDEX, che tiene conto del livello plasmatico di anticorpi anti-JCV, del numero totale di infusioni di NTZ e della precedente esposizione a terapie immunosoppressive [12]. Al contrario, nessun parametro simile è disponibile per i pazienti trattati con farmaci di seconda linea. Il meccanismo d'azione di questi nuovi farmaci comporta, tra l'altro, la deplezione dei linfociti B, e quindi una potenziale diminuzione della produzione di immunoglobuline G, tra cui quelle JCPyV specifiche. Pertanto, la sensibilità degli anti-JCV nel predire la PML, in pazienti trattati ad esempio con Clad o Ocre potrebbe essere ridotta. L'accuratezza della previsione del rischio di PML potrebbe migliorare se l'identificazione e la quantificazione diretta della replicazione virale di JC, la variante genetica del virus e lo stato immunitario dell'ospite fossero presi in considerazione simultaneamente.

Altra sede anatomica che può andare incontro ad importanti patologie non trasmissibili ma correlabili a microrganismi è il polmone. Anche in questo caso, molti studi hanno ipotizzato il coinvolgimento di virus e batteri nell'innescare infezioni respiratorie come polmoniti ma anche riacutizzazioni di asma e bronco pneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO). L'insufficienza respiratoria derivante da infezioni e infiammazioni croniche delle vie aeree, inoltre, rappresenta ancora la principale causa di morte negli individui affetti da fibrosi cistica (FC), una malattia



genetica multiorgano caratterizzata, tra le altre cose, da esacerbazione polmonare ricorrente. L'impatto delle infezioni nella FC, oltre a causare direttamente gravi sintomi respiratori può promuovere, indirettamente, la persistenza batterica e le infezioni batteri-virus, peggiorando così le esacerbazioni. Mentre i patogeni virali più comuni nella FC sono stati identificati, il coinvolgimento dei poliomavirus umani (HPyVs) rimane poco chiaro. In particolare, il ruolo del polyomavirus a cellule di Merkel (MCPyV) come patogeno respiratorio è controverso e il suo coinvolgimento nella FC è stato scarsamente studiato. Comprendere i meccanismi molecolari e cellulari alla base dei processi di esacerbazione che contribuiscono al declino della funzionalità respiratoria e dello stato di salute generale del paziente, potrebbe contribuire non solo a predire riacutizzazioni, andamento clinico e prognosi delle patologie respiratorie ma potrebbe anche ridurre i costi sanitari principali associati a queste malattie.

Il progetto si fonda sull'ipotesi che diversi virus sono in grado di modulare l'insorgenza, l'evoluzione e le complicanze di patologie cronic-degenerative non trasmissibili a carico di diversi sistemi ed organi, come il SNC e il polmone. Lo studio può contribuire a mettere in luce nuovi meccanismi eziopatogenetici, la cui conoscenza potrà portare ad individuare nuovi bersagli molecolari per approcci terapeutici innovativi, utili a mettere a punto nuove strategie antivirali che, oltre ad intervenire su possibili complicanze infettive, potranno prevenire l'insorgenza o la progressione di patologie cronic-degenerative. Inoltre, lo studio potrà portare ad individuare nuovi biomarcatori utili a monitorare la progressione delle patologie, nonché la risposta a trattamenti terapeutici e riabilitativi. Nel caso specifico dei pazienti SM trattati con farmaci come Clad e Ocre, per cui nessun parametro per predire il rischio di PML è ad oggi disponibile, i risultati di questo studio potranno contribuire all'identificazione di biomarcatori di riattivazione di JCPyV e quindi di rischio di insorgenza di PML. Tali biomarcatori potrebbero essere introdotti nella pratica clinica al fine di migliorare la stratificazione del rischio di PML, ottenere una diagnosi tempestiva, un'ottimizzazione dell'uso delle risorse sanitarie e una riduzione dei costi diretti e indiretti della malattia.

Nell'ambito delle infezioni del tratto respiratorio, dal momento che le infezioni sostenute da virus sono state associate ad una più severa progressione clinica nei pazienti affetti da patologie croniche respiratorie come la BPCO e la FC, risulta prioritario, definire il ruolo di patogeni virali come gli HPyVs.

Lo studio si propone i seguenti obiettivi specifici:

1. identificazione e caratterizzazione di meccanismi indotti dai virus che contribuiscono alla patogenesi di malattie cronic-degenerative del SNC e del polmone, con particolare riguardo alle variazioni dello stato redox intra ed extracellulare come fattore di regolazione della replicazione virale e della risposta immunitaria e infiammatoria dell'ospite;
2. valutazione dell'efficacia di diverse molecole naturali e di sintesi nell'inibire l'attivazione di vie di segnalazione coinvolte nei processi infettivi e infiammatori;
3. ricerca di potenziali biomarcatori che possano avere un ruolo predittivo e prognostico nelle patologie cronic-degenerative;
4. allestire modelli in vitro al fine di studiare in modo approfondito il ciclo biologico di MCPyV ed il ruolo di tale virus nelle infezioni respiratorie.

Sulla base della letteratura e di alcuni dati preliminari ottenuti nel laboratorio di Microbiologia delle patologie cronic-degenerative, ci si aspetta che questo studio possa contribuire alla identificazione di meccanismi redox-regolati indotti da diversi microrganismi che possono contribuire all'insorgenza e alla progressione di malattie cronic-degenerative. La conoscenza di tali meccanismi potrà portare alla individuazione di nuovi bersagli per la prevenzione e la terapia così come di nuove molecole antimicrobiche.

Inoltre, i risultati ottenuti potranno contribuire all'individuazione di biomarcatori utili per una diagnosi precoce e per il monitoraggio della progressione delle patologie o della risposta a trattamenti terapeutici e riabilitativi.

L'allestimento di modelli cellulari potrà contribuire a colmare il deficit di conoscenze rispetto al coinvolgimento di MCPyV nelle infezioni respiratorie.

Per l'identificazione di agenti virali o loro derivati nella patogenesi di malattie cronicodegenerative del SNC e del polmone, per l'analisi di marcatori di neurodegenerazione, così come per la valutazione dell'efficacia antivirale/antiossidante o antiinfiammatoria di nuove molecole naturali e di sintesi, vengono utilizzati:

- un modello sperimentale di infezione da virus influenzali/parainfluenzali in cellule epiteliali, macrofagiche e neuronali, in linea e primarie;
- un modello sperimentale di infezioni da coronavirus in cellule endoteliali;
- un modello sperimentale di infezione da HSV-1, basato su colture primarie di ratto singole o miste (neuronali e gliali, inclusi astrociti e microglia);
- un modello infiammatorio rappresentato da cellule macrofagiche stimulate con Lipopolisaccaride (LPS);
- un modello sperimentale di infezione da MCPyV in cellule respiratorie continue e primarie. La coltivazione delle cellule, la preparazione di virioni di MCPyV, l'infezione, le colorazioni immunofluorescenti (IF) e il metodo FISH saranno messi a punto al fine di rilevare l'infezione da MCPyV seguendo e adattando un protocollo messo a punto da Liu e collaboratori.

In questo studio, inoltre, sono arruolati circa 100 pazienti affetti da SM e trattati con NTZ, Ocre e Clad e circa 100 pazienti affetti da FC. Campioni di urina e di sangue sono raccolti dai pazienti affetti da SM sia prima della somministrazione dei farmaci (t0) che durante il follow-up, ogni 4 mesi, per un totale di 36 mesi dall'inizio della terapia. PBMC e plasma sono isolati dal sangue venoso di tali pazienti. Dai pazienti affetti da FC, un'aliquota di aspirato orofaringeo, di espettorato e di lavaggio bronco alveolare (BAL) sono testati per la rilevazione degli HPyVs e per analisi microbiologiche di routine. L'estrazione del DNA, la quantificazione dei genomi virali mediante qPCR, l'amplificazione della regione non codificante (NCCR) degli HPyVs ed il sequenziamento della stessa regione, vengono eseguiti seguendo protocolli specifici. La quantificazione di citochine/chemochine è eseguita su campioni di plasma di pazienti affetti da SM e trattati con NTZ, Ocre e Clad utilizzando pannelli di analisi di citochine Bio-Plex seguendo le istruzioni della casa produttrice.

Infine, sono arruolati circa 100 pazienti dal reparto di Riabilitazione Polmonare dell'IRCCS San Raffaele, dai quali verranno prelevati campioni di sangue al momento del ricovero, dopo 10 giorni di degenza e alla fine della terapia riabilitativa di tre settimane. Entro due ore dalla raccolta, i campioni di sangue saranno centrifugati per ottenere il plasma e saranno utilizzati per le successive analisi. I pazienti saranno monitorati anche per la presenza dei virus respiratori più comuni (virus dell'influenza A e B, virus parainfluenzale, virus respiratorio sinciziale umano, coronavirus umani, rhinovirus, adenovirus). Oltre al plasma, saranno utilizzati espettorati e tamponi nasali per l'estrazione di DNA/RNA per la ricerca di virus respiratori. Il DNA e l'RNA totale saranno estratti da plasma e tampone nasale con il "DNA QIAamp / RNA mini kit", o da espettorato con "Ultrasenses Kit". Amplificazione PCR verrà eseguita utilizzando primer per regioni specifiche per ogni virus. Inoltre, per analizzare la composizione del microbiota, il DNA/RNA saranno estratti da campioni di espettorato tramite appositi Kit e identificati tramite tecniche di sequenziamento di nuova generazione. Per la valutazione della farmaco-resistenza, le specie batteriche verranno isolate dall'espettorato piastrando i campioni su specifici terreni e la crescita microbica quantificata tramite conta del numero di colonie.

L'arruolamento di tutti i pazienti ed il prelievo dei rispettivi campioni clinici, sarà consequenziale in ogni caso all' approvazione del comitato etico e consenso informato firmato.

Virus neurotropi: meccanismi patogenetici legati a malattie cronic-degenerative.

I risultati sono stati ottenuti utilizzando un modello neuronale *in vitro* rappresentato dalle cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, infettate con due diversi virus a DNA e RNA. I risultati riguardanti l'infezione da parte di diversi ceppi di virus influenzale di tipo A hanno mostrato uno sbilanciamento in senso pro-ossidante, valutato come diminuzione del glutatione ridotto e aumento di proteine glutationilate. In particolare, è stato dimostrato che il ceppo A/NWS/33 H1N1 (NWS), che, tra i ceppi utilizzati, più efficientemente infetta e replica nelle cellule SH-SY5Y, porta ad una elevata secrezione di metalloproteinasi di matrice MMP2 e 9, valutata sia come espressione che come attività di tali enzimi nei sovrantanti delle cellule infettate rispetto a quelle di controllo; tale secrezione è notevolmente ridotta dalla molecola antiossidante GSH-C4. È stato inoltre dimostrato che l'inibitore delle MMPs Batimastat porta ad una diminuzione della produzione virale, suggerendo che la secrezione redox dipendente di questi enzimi possa contribuire alla replicazione e/o diffusione virale.

Tra i virus a DNA è stato utilizzato il virus JCPyV che è noto diffondere a livello neuronale nei soggetti immunocompromessi. I dati hanno evidenziato la capacità del virus di infettare e replicare all'interno del nostro modello *in vitro*. A tale replicazione era associata una diminuzione dei livelli di GSH e un significativo aumento dei ROS con una conseguente attivazione delle chinasi p38 e ERK, effetti revertiti dall'utilizzo dell'antiossidante GSH-C4. Questi dati suggeriscono che pathways redox dipendenti possano rappresentare nuovi target cell based per terapie volte a bloccare sia la replicazione che l'infiammazione indotta dai virus.

#### **Virus JC: infezioni neurotrope in relazione a trattamenti con farmaci biologici**

Al fine di valutare il valore diagnostico della viruria, della viremia, dell'indice anti-JCV e dell'espressione di microRNA di JCPyV (miR-J1-5p), sono stati arruolati 42 soggetti affetti da SM prima del trattamento (T0), 6 mesi (T6) e 12 mesi (T12) dopo la somministrazione di natalizumab, ocrelizumab, fingolimod o dimetilfumarato e in 25 controlli sani (HC).

Il numero di pazienti affetti da SM con viruria è aumentato dal 43% a T0 al 100% a T12, mentre è rimasto simile per il gruppo HC (35-40%). La viremia si è manifestata per la prima volta 6 mesi dopo il trattamento nei pazienti con SM ed è aumentata dopo 12 mesi, mentre era assente nell'HC. La carica virale nelle urine e nel plasma della coorte con SM è aumentata nel tempo, ed era per lo più pronunciata nei pazienti trattati con natalizumab.

NCCR di tipo archetipo è stata rilevata in tutte le urine positive, mentre mutazioni sono state osservate in ceppi isolati dal plasma

Il monitoraggio combinato dell'anti-JCPyV antibodies versus JCPyV DNA ha mostrato che, sebbene la seconda generazione del test STRATIFY JCV dimostri una sensibilità aumentata, un test degli anticorpi anti-JCPyV da solo non è sufficiente per la diagnosi di JCPyV perché, alcuni pazienti a basso rischio ( $\leq 0,9$ ), mostravano viruria. Tuttavia, la carica virale era ben correlata con l'indice anti-JCV in quanto, pazienti con un indice anti-JCV più alto mostravano una carica virale più alta rispetto ai pazienti con un indice anti-JCV più basso. Quindi, i risultati indicano che il numero di copie del DNA di JCPyV è un parametro utile per stratificare il rischio di PML poiché il rilevamento della viruria identifica i soggetti con infezione da JCPyV quando gli anticorpi non sono ancora rilevabili.

La prevalenza di miR-J1-5p nelle urine e nel plasma di HC è rimasta, rispettivamente, ~ 30% e ~ 60% durante i periodi di osservazione T0, T6 e T12, mentre il numero di copie variava tra 550 e 800 per i campioni di urina e 600 e 1000 per i campioni di plasma nei pazienti SM. I numeri più bassi sono stati osservati a T6. Per i pazienti con SM, la prevalenza di miR-J1-5p nelle urine e nel siero è diminuita nel tempo. A T0, i pazienti con HC e MS avevano una prevalenza simile di miR-J1-5p

(64%), ma la prevalenza è diminuita al 43% nel plasma dei pazienti con SM. Il miRNA urinario è stato osservato nel 62% dei pazienti con SM a T0, ma è sceso al 43% a T12. Il numero di copie di miR-J1-5p si è ridotto di quasi il 50% sia nelle urine che nel siero a T12. Pertanto, il trattamento con DMTs può stimolare la replicazione virale la quale sembrerebbe ridurre l'espressione di miR-J1-5p, che risulta sottoregolata dall'espressione dell'antigene T, una proteina assolutamente necessaria per la replicazione virale. L'analisi concomitante tra shedders e non shedders e miR-J1-5p ha evidenziato che l'espressione di miR-J1-5p era inversamente correlata con il rilevamento di JCPyV. Una correlazione inversa è stata confermata anche analizzando il valore medio di copie/mL di DNA di JCPyV e il numero medio di copie di miR-J1-5p in urine e il plasma. Questo modello in cui un aumento del livello di miRNA virali è associato a una carica virale inferiore e viceversa, potrebbe confermare un ruolo importante del miRNA JCPyV nel controllo della replicazione virale attraverso la downregolazione dell'espressione dell'antigene T.

L'analisi del livello di miRNA JCPyV 5p in relazione allo stato sierologico ha evidenziato che il miRNA potrebbe essere rilevati anche in campioni di urina o plasma di soggetti JCPyV con un indice anti-JCV ( $<0,9$ ), indicando che un risultato negativo di JCPyV Ab non scorre necessariamente con l'assenza dell'infezione da JCPyV ma potrebbe supportare una condizione virale persistente/latente.

I dati sottolineano che i farmaci somministrati per il trattamento della SM influenzano l'espressione del miRNA di JCPyV e confermano che natalizumab, più di altri farmaci, dopo la riattivazione virale, induce un aumento della replicazione di JCPyV accompagnata da modifiche nell'organizzazione strutturale della NCCR di JCPyV.

Dal momento che le infezioni sostenute da virus sono state associate ad una più severa progressione clinica nei pazienti affetti da patologie croniche respiratorie come la FC, risulta prioritario definire il ruolo di patogeni virali come il MCPyV nell'ambito del distretto polmonare. Per perseguire tale scopo stati arruolati 539 pazienti, già diagnosticati presso il Centro di Riferimento FC del Policlinico Umberto I di Roma della Regione Lazio, da cui sono stati raccolti 539 campioni del tratto respiratorio superiore (aspirato orofaringeo ed espettorato) ed inferiore (lavaggio bronco-alveolare, BAL). I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni analizzati evidenziavano la presenza del DNA di MCPyV in 137 campioni (25%). Mentre differenze statisticamente significative non sono state rilevate tra la prevalenza di MCPyV ed il sesso dei soggetti inclusi nello studio, una correlazione statisticamente significativa è stata rilevata tra MCPyV DNA e l'età dei soggetti arruolati ( $p = 0.037$ ). Nell'ambito delle co-infezioni virus/batteri, è stata identificata un'associazione tra la presenza di MCPyV e *Staphylococcus aureus* ( $p = 0.001$ ). Nonostante la presenza di mutazioni puntiformi, l'analisi delle sequenze NCCR e della proteina del capsido (VP1) di MCPyV ha rivelato un alto grado di omologia con le sequenze del ceppo prototipo di MCPyV depositate in GenBank. Nello studio è stata inclusa anche una coorte di controllo, costituita da soggetti non-FC e ricoverati al Policlinico Umberto I con sospetta diagnosi di malattia respiratoria acuta. Da questa coorte di pazienti sono stati raccolti 124 campioni respiratori in cui il DNA MCPyV è stato rilevato nel 9% dei campioni analizzati, una percentuale inferiore a quella registrata nei pazienti CF (26%). Questo dato ha evidenziato un'associazione significativa ( $p = 0.001$ ) tra infezione sostenuta da MCPyV e pazienti suscettibili, come i pazienti affetti malattia cronica come la FC.

La capacità di MCPyV di infettare e replicare in cellule respiratorie è stata testata in vitro utilizzando due diverse linee cellulari, le cellule epiteliali alveolari umane di adenocarcinoma, le A549 e le cellule di carcinoma polmonare a piccole cellule, le H1299. Entrambe le linee cellulari sono state trasfettate con il DNA di MCPyV, ottenuto in seguito ad estrazione del plasmide pMCCV-R17, contenente l'intero genoma del ceppo prototipo di MCPyV (ceppo MCC350). I risultati della qPCR hanno rivelato che il DNA MCPyV si replicava in modo efficiente nelle cellule A549 e nelle cellule

H1299 mostrando, durante gli esperimenti di trasfezione, un incremento progressivo della quantità di DNA virale. Al fine di confermare che virioni completi venivano generati durante gli esperimenti di trasfezione, i SPNT raccolti 7 giorni post trasfezione, sono stati utilizzati per infettare le cellule A549 e H1299 de novo. I risultati hanno confermato una replicazione di MCPyV tendenzialmente simile a quella osservata durante il primo ciclo di trasfezione. L'analisi del WB ha mostrato che LT veniva rilevato da 3 giorni post infezione (gpi) e raggiungeva l'espressione massima 7 gpi. Con il saggio di IF, 3 gpi, la proteina VP1 di MCPyV non veniva rilevata. Quando il saggio di IF è stato condotto 7 gpi, l'espressione della VP1 è stata rivelata con una localizzazione sia citoplasmatica che nucleare.

## **Laboratorio di Patologia Molecolare, Cellulare e Ultrastrutturale**

### *Nuovi approcci terapeutici per lo scompenso cardiaco*

HMGB1 è una proteina costitutivamente espressa in molti tipi cellulari. Nelle cellule, HMGB1 è un fattore di trascrizione coinvolto nel riparo del DNA, nell'omeostasi dei telomeri e nell'autofagia. HMGB1 può essere anche secreta o rilasciata dalle cellule sotto stress e in questo caso agisce come allarmina, citochina o fattore di crescita in grado di attivare la risposta immunitaria. Studi recenti hanno dimostrato che HMGB1 può avere funzioni opposte ovvero indurre danno cardiaco in quanto mediatore dell'infiammazione, ma allo stesso tempo promuovere rigenerazione cardiaca e rimodellamento del ventricolo sinistro in seguito a danno. Quale sia il ruolo di HMGB1 nella senescenza dei cardiomiociti non è ancora noto.

Inoltre, siccome HMGB1 è stata identificata come un importante mediatore dell'infiammazione nella fase precoce dell'infarto in seguito a rilascio passivo da parte di cellule necrotiche e, in una fase successiva del rimodellamento ventricolare, in seguito a rilascio attivo da parte delle cellule mononucleate, diversi studi clinici hanno dimostrato che questa proteina può rappresentare un interessante biomarcatore in pazienti con sindromi coronariche.

Obiettivi:

Aim 1: Studio in vitro dell'effetto di HMGB1 sulla senescenza dei cardiomiociti.

Lo scopo di questo obiettivo consisteva nel determinare l'effetto della somministrazione di HMGB1 WT sulla senescenza di cardiomiociti di ratto dopo trattamento con doxorubicina.

Aim 2: Studio dei livelli circolanti di HMGB1 in pazienti MINOCA

In questa parte del progetto, sono stati misurati i livelli di HMGB1 WT circolante in campioni provenienti da pazienti sani, pazienti STEMI ovvero con infarto acuto del miocardio in presenza di placche aterosclerotiche e pazienti MINOCA ovvero pazienti con infarto acuto del miocardio in assenza di placche aterosclerotiche.

Per questo studio, per il primo obiettivo, è stato messo a punto innanzitutto il modello di senescenza delle cellule H9C2 (cellule atriali di ratto) al fine di determinare gli intervalli di tempo e la concentrazione ottimale di doxorubicina da utilizzare per il trattamento.

Per il secondo obiettivo, sono stati utilizzati campioni di siero da 15 pazienti sani, 30 pazienti STEMI e 30 pazienti MINOCA. Su tutti i campioni è stato effettuato un saggio ELISA per la determinazione dei livelli circolanti di HMGB1 espressi in ng/ml.

I risultati hanno dimostrato che la dose ottimale di doxorubicina risulta essere quella di 0.1  $\mu$ M per 24 ore. In queste condizioni sperimentali, infatti, abbiamo ottenuto mediante WB una marcata modulazione dei marcatori della senescenza quali p53, p21, p16, TRF2 e dell'apoptosi quali bax, bcl2 e cleaved PARP1.

Mediante test ELISA per HMGB1, si è riusciti a determinare i livelli circolanti di HMGB1 espressi come ng/ml in 15 pazienti sani, 30 pazienti STEMI e 30 pazienti MINOCA ottenendo valori

significativamente superiori negli STEMI rispetto ai MINOCA e valori comparabili tra i MONOCA e i pazienti sani considerati come pazienti di controllo.

Utilizzando un sistema *in vitro*, si è riusciti a determinare dose e tempi di trattamento con doxorubicina tali da ottenere la senescenza delle cellule H9C2 su cui poi effettuare diversi tipi di trattamento.

I risultati ottenuti mediante ELISA hanno permesso di distinguere i pazienti MINOCA dai pazienti STEMI, fino ad oggi indistinguibili nelle fasi iniziali del ricovero dei pazienti con sintomatologia da infarto acuto del miocardio. In pratica si è avuta conferma dell'ipotesi formulata, in quanto siccome i pazienti MINOCA presentano un'inflammatione localizzata mentre i pazienti STEMI sono caratterizzati da un'inflammatione estesa, HMGB1 (noto marcatore dell'inflammatione) poteva rappresentare un marcatore in grado di distinguere le due classi di pazienti.

### *Sirtuine mitocondriali mantenimento e recupero dell'integrità mitocondriale e sopravvivenza cellulare in presenza di stress*

Le sirtuine mitocondriali SIRT3, SIRT4 e SIRT5 deacilano diverse proteine mitocondriali controllando la fosforilazione ossidativa, il metabolismo della glutammina, il ciclo di Krebs, ecc. A loro volta i mitocondri hanno un ruolo fondamentale nel regolare lo stato energetico cellulare mantenendo la vitalità cellulare. Questo è particolarmente importante in cellule post-mitotiche come neuroni, cardiomiociti e adipociti in cui è richiesto il prolungato mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale della cellula.

L'ipotesi del progetto è che le sirtuine ed in particolare quelle mitocondriali svolgano un ruolo fondamentale per il differenziamento cellulare e per il mantenimento e recupero delle funzioni cellulari nei tessuti post-mitotici.

Considerando il ruolo fondamentale per l'omeostasi cellulare che le sirtuine dimostrano, questo progetto propone di perseguire lo studio dei seguenti obiettivi:

- 1) Ruolo delle sirtuine mitocondriali nella regolazione del metabolismo cellulare.
- 2) Ruolo delle sirtuine mitocondriali nel mantenere l'integrità, funzionalità e vitalità cellulare.

Si propone di studiare:

Il ruolo delle sirtuine mitocondriali nella regolazione di altri pathways metabolici.

Il ruolo della sirtuina 5 nel differenziamento del tessuto adiposo.

Gli esperimenti dimostrano che le sirtuine hanno un ruolo fondamentale nel controllare e mantenere la funzionalità dei mitocondri attivando il processo chiamato mitofagia con il fine di eliminare i mitocondri non funzionali. Inoltre la funzione delle sirtuine può essere modulate attraverso diverse strategie come l'uso di attivatori/inibitori e nanomateriali.

Un altro aspetto che abbiamo studiato è il controllo da parte delle sirtuine del metabolismo della glutammina. In questo caso è stato dimostrato che SIRT5 desuccinila e inibisce l'enzima chiave e cioè la glutamminasi con conseguente diminuzione del metabolismo. Abbiamo anche utilizzato inibitori di SIRT5 che si sono rivelati importanti nel regolare il differenziamento delle cellule adipose da grasso bianco a grasso bruno.

I risultati finali del progetto consentiranno di individuare indicatori del recupero di funzione.

Metodi: studio delle sirtuine mitocondriali e nucleari in diverse linee cellulari. Misurazioni di carattere molecolare, proteico e biochimico. Utilizzo anche di tessuti animali per verificare l'espressione e la funzione delle sirtuine.

Sono state utilizzate linee cellulari C2C12, 3T3 e H9C2. Queste sono state trasfettate o silenziate per le varie sirtuine mitocondriali tramite vettori plasmidici. Le linee parentali o trasfettate sono state trattate con apoptogeni.

Misurazione dei livelli delle sirtuine mitocondriali e della loro attività.

I livelli delle sirtuine mitocondriali (SIRT3 e SIRT5) sono state misurate tramite western blot nelle frazioni mitocondriali. Sempre nelle frazioni mitocondriali è stata misurata l'attività deacetilasi delle sirtuine tramite l'utilizzo di un substrato fluorescente e misurazione della fluorescenza emessa in un fluorimetro.

Misurazione dei parametri cellulari e metabolici.

La vitalità cellulare è stata misurata usando un saggio MTT e la conta al trypan blue. Il metabolismo cellulare è stato misurato attraverso saggi biochimici. In particolare il metabolismo della glutammina è stato misurato utilizzando la produzione di ammoniaca, glutammato e alfa-ketoglutarato. Sono stati usati anche inibitori dei vari enzimi coinvolti nel metabolismo come glutaminasi e glutammato deidrogenasi. Infine il metabolismo della glutammina è stato bloccato utilizzando una forma solubile di alfa-ketoglutarato.

### *Recupero di funzione nelle miocarditi e nelle cardiomiopatie: ruolo delle sirtuine*

Lo scompenso cardiaco rappresenta nei paesi occidentali una importante causa di morbidità e mortalità (20% all'anno e fino al 50% a 4 anni). Le cause di scompenso cardiaco non ischemico sono rappresentate principalmente dalla cardiomiopatia dilatativa idiopatica e dalle miocarditi. A tutt'oggi il trattamento di tali entità è supportivo e tranne rari casi non esiste una terapia specifica in grado di interferire con la storia naturale della malattia interrompendo i meccanismi di danno dei cardiomiociti e stimolando la proliferazione e la riparazione cellulare. Il raggiungimento di tali obiettivi è ottenibile solo studiando il tessuto cardiaco di pazienti affetti da scompenso cardiaco, dove è possibile valutare i livelli di morte e proliferazione cellulare, il grado di miofibrillolisi, il livello di alterazione del metabolismo energetico cellulare, ed i pathways intracellulari che mediano l'instaurarsi ed il perpetuarsi del danno, come ad esempio l'espressione di geni e di proteine implicate nella necrosi, e nella apoptosi (Bcl2, caspasi 3) e nello stress ossidativo. Sul tessuto miocardico è inoltre possibile valutare i meccanismi di risposta al danno, in termini di attivazione di geni implicati nella riparazione cellulare e nella attivazione delle cellule staminali cardiache. Infine è possibile valutare le alterazioni della struttura e della funzione mitocondriale e il ruolo delle sirtuine, una famiglia di deacetilasi coinvolte in molteplici processi cellulari incluso il metabolismo energetico, la riparazione cellulare e la proliferazione attraverso l'attivazione delle cellule staminali.

L'ipotesi del progetto è che studiando biopsie endomiocardiche di pazienti affetti da scompenso cardiaco è possibile individuare sia gli aspetti molecolari che possono portare al recupero sia le strategie necessarie da attuare.

- 1) Studiare i meccanismi di danno irreversibile e reversibile e l'attivazione dei processi di riparazione e rigenerazione cellulare dei cardiomiociti di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa e miocardite
- 2) Studiare la struttura e la funzione mitocondriale e il grado di stress ossidativo miocardico in tali pazienti
- 3) Studiare il ruolo delle sirtuine nel processo di danno e di recupero cellulare dopo opportuna terapia

L'attività di ricerca consiste nel valutare pazienti con miocardite, con cardiomiopatia dilatativa idiopatica e secondaria (i.e tossica, da deficit nutrizionali), e con cardiopatie a fenotipo ipertrofico (i.e. cardiomiopatia ipertrofica, malattia di Fabry, cardiopatia ipertensiva).

E' stato osservato a seguito di biopsie endomiocardiche del ventricolo sinistro, che la miocardite, spesso virale, è una causa dominante dello scompenso. E' stata inoltre descritta una cardiomiopatia reversibile da deficit di Selenio e Zinco indotta da malassorbimento intestinale cronico. Sono stati riconosciuti i meccanismi operativi caratterizzati da un declino della riserva

anti-ossidante cardiaca facente capo alla glutazione perossidasi ed alla superossido-dismutasi rispettivamente selenio e zinco-dipendenti, un danno ossidativo della membrana dei miociti con aumentata autofagia cellulare. E' stata identificata e quantificata in termini di incidenza la associazione malformativa fra cardiomiopatia ipertrofica e teleangiectasia coronarica ed i risvolti che questa può assumere in termini di ischemia miocardica ed instabilità elettrica, richiedente impianto di defibrillatore al fine di prevenirne la complicità più temibile, la morte cardiaca improvvisa. E' stato riportato attraverso un'ampia casistica biptica, che in pazienti con fenotipo clinico di cardiomiopatia ipertrofica, la biopsia endomiocardica del ventricolo sinistro è in grado di identificare patologie infiltrative o da accumulo nel 18% dei 155 pazienti studiati. Tale studio ha sottolineato il limite degli strumenti non-invasivi nella diagnostica dei pazienti con ipertrofia idiopatica del ventricolo sinistro e come il riconoscimento tramite indagine biptica della malattia di base possa cambiare il trattamento e la prognosi. Per la prima volta è stato descritto un diretto coinvolgimento muscolare in pazienti con malattia di Fabry. In rapporto all'interessamento cardiaco, il danno muscolare è più lieve e più tardivo. La causa più verosimile di tale divergenza è la differenza nella attività dei due organi con diverso consumo del  $\alpha$ -galattosidase A residua. Infine è stata documentata una cardiomiopatia ipertrofica-ipcinetica clinicamente sovrapponibile alla malattia di Fabry dovuta a tossicità da Idrossiclorochina. Attraverso una analisi istologica, ultrastrutturale e della attività degli enzimi lisosomiali su biopsie endomiocardiche eseguite prima e dopo risoluzione della malattia, è stato evidenziato un deficit farmaco-mediato dell'alfa-galattosidasi A che porta ad un accumulo intracellulare di Gb3 simile a quello che occorre per difetto genetico nella malattia di Fabry. L'osservazione implica che in casi di tossicità cardiaca da idrossiclorochina può essere adottata l'infusione di agalsidasi, per ottenere un completo recupero del danno.

Il progetto si prefigge di individuare marcatori dello scompenso cardiaco e di suggerire le strategie riabilitative necessarie per un corretto recupero.

Sono stati reclutati pazienti con le seguenti caratteristiche:

1. Dilatazione e disfunzione del ventricolo sinistro (EF<40%) di età compresa tra i 18 e gli 80 anni.
2. Assenza di malattia coronaria o valvolare che possa giustificare la severità della disfunzione cardiaca.
3. Scompenso cardiaco cronico (da più di 6 mesi) refrattario alla terapia antiscompenso standard.

I criteri di esclusione includeranno: scompenso cardiaco recente (meno di 6 mesi), cause note di insufficienza cardiaca (come ipertensione arteriosa, malattia coronaria significativa, malattia valvolare significativa, malattie endocrine, malattie renali significative, abuso di alcool o di farmaci).

I pazienti sono stati sottoposti ad esami cardiologici invasivi (ECG, ecocardiogramma color Doppler con TDI) e, previo consenso informato, ad esami cardiologici invasivi, incluso il cateterismo cardiaco, la coronarografia, la ventricolografia bi ventricolare e la biopsia endomiocardica bi ventricolare.

Alcuni frammenti biptici sono stati utilizzati per l'esame istologico con colorazioni di routine per identificare il processo patologico alla base della disfunzione cardiaca. Alcuni frammenti congelati sono stati utilizzati per valutare la presenza di virus cardiotropi miocardici, in grado di causare una cardiomiopatia dilatativa virale. In pazienti affetti da miocardite virus-negativa è stato intrapreso un trattamento specifico immunosoppressore e verranno eseguite biopsie di controllo dopo sei mesi di trattamento per valutare il grado di recupero cellulare.

Le biopsie endomiocardiche di base e di controllo sono state analizzate per: a) istologia, con valutazione morfometrica; b) immunoistochimica per caratterizzare e quantizzare gli infiltrati infiammatori e per analizzare l'attivazione del sistema immunitario (HLA-ABC, HLA-DR); c) valutazione della morte e della proliferazione cellulare e delle cellule staminali cardiache, d)



microscopia elettronica con morfometria per valutare il contenuto miofibrillare e il numero e la struttura dei mitocondri e) profili di espressione genica di actina; alpha-MHC, beta-MHC, miR-133 per analizzare i meccanismi di riparazione miocardica e livelli di sirtuine) f) Attività degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale e dei fosfati ad alta energia (ATP, ADP, fosfocreatina)

Dai pazienti è stato anche prelevato del sangue periferico per ottenere un anello linfomonocitario da cui ricavare proteine e mRNA per analisi di real time-PCR, di western blotting e di saggi enzimatici. In particolare l'espressione e l'attività delle sirtuine è stata messa in relazione alla patologia e al recupero funzionale dopo terapia nel paziente.

L'individuazione dei diversi stimoli che portano all'insorgenza dello scompenso cardiaco permette di avere dei dati personalizzati per il paziente al fine di formulare una terapia personalizzata in funzione del tipo di danno subito e della sua insorgenza. Questo consente di risparmiare al paziente e al SSN delle cure inutili e costose.

### *Studio dei meccanismi di riparazione cellulare in cellule postmitotiche: ruolo delle proteine CRP e delle sirtuine*

Le sirtuine sono una classe di deacilasi coinvolte nella risposta a diversi tipi di stress e associate all'allungamento della vita. E' necessario approfondire lo studio dei meccanismi che regolano la funzione delle sirtuine nella risposta allo stress nel tessuto neuronale e muscolare.

Le Cysteine-rich proteins (CRP1, CRP2, CRP3/MLP and TLP) hanno un ruolo importante nell'organizzazione del citoscheletro, nella miogenesi e nella trasduzione del segnale generato da meccanicocettori. CRP1 e 2 sono espresse per lo più nella muscolatura liscia e scheletrica, MLP è espresso per lo più nel muscolo cardiaco e scheletrico.

L'ipotesi di questo progetto è che le cellule post-mitotiche possono recuperare la loro funzione dopo uno stress di danno e che in tale recupero le sirtuine hanno un ruolo fondamentale.

Lo studio si prefigge di studiare:

- Il ruolo dell'interazione tra sirtuine e delle CRP nei meccanismi di morte e di riparo cellulare.
- L'impatto sulla morte cellulare e sul riparo molecolare nei miociti e nei cardiomiociti delle CRP valutando la risposta al danno della cellula indotto da stimolo meccanico.
- Il ruolo di attivatori farmacologici delle sirtuine in tessuti neuronali, muscolari e cardiaco.

Ci si aspetta di poter misurare l'associazione tra sirtuine e CSRP nei tessuti post-mitotici al fine di individuare un meccanismo da sfruttare per incrementare la sopravvivenza di tali tessuti a stimoli meccanici e di stress.

Le linee cellulari di mioblasti murini C2C12 sono state differenziate in vitro mediante semina in terreno contenente il 2% di siero di cavallo. Cloni di tali cellule overespressanti e silenziati per CRP3/MLP sono stati ottenuti. Il danno cellulare è stato indotto tramite trattamento con etoposide o in assenza di gravità. Lo studio dei meccanismi indotti dai trattamenti sopra indicati e del ruolo delle sirtuine e delle CRP è stato effettuato mediante RT-PCR, WB e immunoprecipitazione su cellule proliferanti e differenziate. Mediante immunoprecipitazione è stata studiata l'interazione tra queste proteine, fattori trascrizionali coinvolti nella sopravvivenza e markers di apoptosi. Per il recupero funzionale è stata analizzata la morfologia tramite microscopia elettronica e delle proteine sarcomeriche per le cellule muscolari. L'espressione proteica, l'interazione proteica e la localizzazione cellulare è stata valutata mediante western blotting, immunoprecipitazione e immunofluorescenza.

L'ambiente ipossico è responsabile dell'espressione di recettori delle allarmine, attivando una risposta genica coordinata detta risposta riparativa infiammatoria (IRR). L'ipossia a sua volta induce due fenomeni: a) Necrosi delle cellule che sono più distanti dai vasi del tessuto ospite. Il danno necrotico porta alla frammentazione della membrana plasmatica e al rilascio di allarmine o DAMPS (Damage-Associated Molecular Patterns). b) Attivazione di HIF-1 $\alpha$  con nuova espressione genica, che permette alle cellule tumorali di sopravvivere e crescere. I nostri risultati sperimentali dimostrano anche che l'attivazione di HIF-1 $\alpha$  incrementa l'espressione dei recettori delle allarmine come RAGE (per HMGB1), P2X7 (per ATP/ADP), alcuni toll-like. Tutti questi recettori, quando stimolati dalle allarmine, attivano NF $\kappa$ B che a sua volta aumenta l'espressione di geni dell'IRR, inducendo così cambiamenti nelle proprietà biologiche delle cellule tumorali.

L'ipotesi di lavoro è che l'attivazione di una coordinata risposta genica infiammatoria in cellule ipossiche e precedentemente trasformate, permette l'acquisizione delle proprietà cellulari tipiche del fenotipo maligno.

Lo studio si prefigge di:

- Studiare il ruolo di HIF1 $\alpha$  NF $\kappa$ B e IRR nelle cellule tumorali.
- Identificare quali allarmine/DAMPs sono più efficaci nell'indurre la IRR.
- Identificare quale sottopopolazione di cellule tumorali si adatta più facilmente all'ipossia e attiva più facilmente la IRR. Gli effetti dell'ipossia e delle allarmine saranno studiati su queste popolazioni cellulari effettuando esperimenti descritti già nel secondo obiettivo.
- Esplorare in modelli sperimentali in vitro e in vivo il meccanismo di homing specifico delle cellule di cancro attivate dall'ipossia.
- Studiare la possibilità di bloccare o rallentare la progressione tumorale inibendo NF $\kappa$ B e/o HIF1 $\alpha$  in vitro e in vivo.

In vitro i ricercatori si aspettano di osservare diversi gradi di invasione a seconda del trattamento delle cellule tumorali o delle cellule bersaglio come descritto nei metodi. Inoltre, il silenziamento di alcuni recettori permetterà di capirne il ruolo primario o secondario per la progressione tumorale.

In vivo i ricercatori si aspettano che le cellule tumorali attivate da ipossia o da allarmine siano in grado di invadere meglio delle cellule tumorali non trattate. Tale capacità invasiva sarà massima nelle cellule tumorali staminali. Le metastasi formate dalle cellule tumorali potranno essere influenzate tramite creazione di un sito di necrosi con gradiente citochinico. In questo modo si aspettano di poter predire il sito in cui le metastasi si formeranno. Da quanto sopra detto risulta chiaro che l'inibizione di HIF-1 $\alpha$  e NF $\kappa$ B dovrebbe essere maggiormente efficace nel bloccare o ridurre la formazione di metastasi con conseguente aumento della sopravvivenza.

I risultati hanno contribuito e stanno contribuendo a determinare il reale apporto dell'ipossia e dell'infiammazione nella progressione tumorale al fine di dimostrare l'importanza di cambiamenti molecolari indipendenti da nuove mutazioni. Infine, i risultati permetteranno di chiarire il ruolo del microambiente tumorale nel determinare la meta staticità. In questo modo sarà possibile agire su specifici fattori comuni a tutti i tumori quali ipossia e infiammazione, per esempio, per limitare la progressione del tumore.

Campioni di biopsie umane di cancro di vescica sono state sezionate (5 $\mu$ m) e sottoposte a laser capture microdissection (LCMD) per separare le cellule tumorali, da quelle peritumorali e da quelle del tessuto ospite normali. L'espressione di mRNA di 48 geni proinfiammatori (inflammocard) è stata studiata mediante Real-time PCR; l'espressione proteica di diversi fattori pro infiammatori quali P2X7, RAGE, COX2, NOS2, SOCS1, TLR2-3-4, e MMP2 è stata studiata mediante WB;

l'attivazione di HIF1a and NF-kB è stata analizzata mediante WB o ELISA su frazioni cellulari citosoliche e nucleari. L'ipossia è stata ottenuta incubando le cellule in 1%O<sub>2</sub> in una camera ipossica. Le CS/P sono state preparate da: campioni chirurgici di tumori solidi umani: le popolazioni CS/P sono state purificate e caratterizzate mediante analisi di citofluorimetria usando diversi markers. Per studiare gli effetti dell'ipossia sul guadagno di funzione delle MMPs, le linee cellulari MCF7, PC3 e BCPAP sono state trattate con estratti totali di membrane o con frazioni di essi. L'invasione cellulare è stata misurata mediante uno specifico kit della chemicon in grado di discriminare tra cellule che invadono e cellule che non invadono.

E' stata valutata l'aumentata abilità di migrare associata al trattamento ipossico e la conseguente overespressione di CXCR4 sulle linee cellulari sopra descritte. La migrazione cellulare è stata studiata mediante il "wound healing assay". L'homing delle cellule tumorali è stato studiato mediante: co-cultura di cellule di cancro attivate da ipossia o di controllo e cellule HUVEC preattivate da LPS o un mix di citochine di tipo Th1 e Th2. Real-time PCR mediante inflammocard di RNA estratto da tessuto granuloso ottenuto da microdissezione. Per gli esperimenti in vivo: a) le cellule CS/P o tumorali isolate da biopsie o da linee cellulari attivate mediante ipossia saranno iniettate in topi nudi. Successivamente sarà valutato il numero e il tipo di metastasi formatesi. b) sarà creato un sito usando rispettivamente batteri Gram+ o LPS o una ferita. Di nuovo, sarà valutato il numero e il tipo di metastasi formatesi. Gli studi in vivo saranno condotti in topi nudi (4-6 settimane) (Charles River Laboratories) le cellule saranno precedentemente trasfettate con GFP. La formazione del tumore è studiata dopo iniezione sottocutanea. La formazione del tumore è seguita in vivo per 3-4 settimane mediante microscopio a fluorescenza. Iniezioni nella vena caudale permetteranno di osservare il pattern metastatico nei polmoni, nel cervello e i altri siti mediante immunistochemica, RT-PCR e WB negli animali sacrificati.

### **Laboratorio di Genomica Umana Funzionale**

*Basi genetico molecolari di fenotipi mendeliani e complessi per la medicina riabilitativa personalizzata. Identificazione di marcatori genetici per la stratificazione del rischio clinico e la predisposizione alle malattie ad elevata componente ereditaria per lo sviluppo di percorsi riabilitativi personalizzati.*

Nell'ambito della medicina riabilitativa si avverte il crescente bisogno di nuovi strumenti che permettano la messa in atto della cosiddetta medicina 4P: Predittiva, Preventiva, Personalizzata e Partecipativa. La conoscenza delle basi genetiche e genomiche delle malattie, in aggiunta a quelle biologiche, permette l'impostazione di programmi di riabilitazione personalizzati per lo specifico paziente/malattia e limita gli effetti negativi di interventi non appropriati. Questo principio, come la disciplina di genetica medica, si applica alla medicina nel suo complesso ed è trasversale a tutte le specialità in quanto ogni malattia ha di fatto una componente genetica. Grazie allo sviluppo di strategie di sequenziamento di nuova generazione (Next Generation Sequencing, NGS) e di conoscenze nella capacità di analisi ed interpretazione di dati genomici, la ricerca genetica ha fatto grandi progressi e presenta ricadute rilevanti non solo per le malattie rare (monogeniche), dove la diagnosi di patologia, fondamentale per iniziare una riabilitazione mirata al paziente (e alla famiglia), rappresenta spesso un percorso ad ostacoli che può durare anni (odissea diagnostica), ma anche per le malattie cronico-degenerative più comuni (multifattoriali), che rappresentano un crescente problema di salute pubblica.

L'identificazione di nuovi marcatori genetici alla base delle patologie umane e della risposta individuale a trattamenti farmacologici, terapeutici, e nutrizionali permetterà di sviluppare nuovi strumenti di medicina predittiva per la messa a punto di protocolli diagnostico-terapeutici e riabilitativi individualizzati.

Studi di correlazione tra dati genetici, clinici e ambientali permetteranno di intervenire sui fattori acquisiti che migliorano l'intervento riabilitativo.

Lo studio di casistiche omogenee e raccolte nell'ambito di protocolli di ricerca delle varie unità dell'IRCCS consentiranno di contribuire a livello mondiale a studi di GWAS per le basi genetiche delle malattie complesse.

I dati del sequenziamento genetico saranno utilizzati per costituire un repository data interno necessario all'interpretazione dei dati genetici NGS e contribuiranno alla definizione del genoma di riferimento Italiano attraverso collaborazioni ad hoc.

Lo studio intende: identificazione i marcatori genetici di malattie umane ad elevata componente genetica per lo sviluppo di percorsi di medicina riabilitativa personalizzata; identificare i marcatori genetici predittivi di malattia e di risposta al trattamento in specifiche patologie di interesse e definire i fattori ambientali su cui intervenire per migliorare l'intervento riabilitativo.

I marcatori genetici individuati saranno utilizzati per protocolli innovativi di riabilitazione personalizzata.

I modelli integrati genotipo-fenotipo-ambiente sono applicati per migliorare l'intervento riabilitativo. Specifici algoritmi di predizione o suscettibilità alle malattie ad elevata componente genetica consentono una presa in carico personalizzata nell'ambito della medicina preventiva e di precisione.

L'identificazione e caratterizzazione di marcatori genetici diagnostici/prognostici e la definizione di algoritmi di predizione di rischio per malattie ad elevata componente genetica permetteranno la messa a punto di nuovi percorsi diagnostico-terapeutici e riabilitativi individualizzati con importanti ricadute sul SSN.

In seguito ad approvazione di un comitato etico locale e somministrazione del consenso informato, i pazienti sono stati arruolati presso le strutture coinvolte nei diversi studi collaborativi. DNA genomico è stato estratto da sangue periferico e l'analisi genomica per l'identificazione di varianti genetiche è stata condotta mediante strumentazione NGS. Nuove varianti identificate in geni-malattia nuovi o già noti sono state confermate mediante sequenziamento diretto Sanger. Saggi di diagnostica molecolare avanzata basati sulla tecnologia NGS con pannelli genici specificamente disegnati per l'identificazione di varianti con rilevanza per malattie neurodegenerative sono stati sviluppati e utilizzati per l'analisi di pazienti. Colture primarie di fibroblasti da pazienti selezionati sono state allestite a partire da biopsie cutanee. La patogenicità di eventuali varianti identificate è stata analizzata sia mediante l'utilizzo di molteplici strumenti *in silico* (e.g. SIFT, PolyPhen, Provean, analisi predittiva di strutture proteiche), analisi *ex vivo* di microscopia elettronica ed immunofluorescenza su biopsie cutanee dei pazienti, e mediante saggi *in vitro* di biologia molecolare e cellulare (e.g. analisi di espressione genica mediante qPCR; analisi di espressione proteica mediante immunoblot e chemiluminescenza, oppure immunofluorescenza e microscopia a epifluorescenza o confocale; purificazione di proteine e analisi di interazione proteina-proteina mediante immunoprecipitazione o saggi di pull-down; espressione ectopica/silenziamento di geni specifici in linee cellulari; saggi funzionali, quali saggi di proliferazione, migrazione e adesione, su cellule primarie e/o su linee cellulari).

Il gruppo di Genetica umana funzionale ha condotto numerosi studi, suddivisi in tre raggruppamenti principali, mirati al miglioramento del percorso diagnostico di malattie monogeniche e ad aumentare le conoscenze delle basi patogenetiche di queste malattie, elementi essenziali per una tempestiva presa in carico del paziente e l'inizio di opportune terapie preventive e riabilitative.

Nell'ambito di una collaborazione multicentrica e internazionale, è stato condotto uno studio che ha permesso di espandere lo spettro clinico e molecolare di una sinaptopatia monogenica legata all'X causata da varianti patogenetiche in SYN1. Sono stati descritti 31 nuovi individui e 22 diverse

varianti nel gene SYN1 su cui è stato condotto per la prima volta uno studio di correlazione genotipo/fenotipo basato su un'accurata descrizione clinica dei pazienti e studi funzionali in silico sulle mutazioni identificate. Le evidenze riportate dimostrano che una diagnosi molecolare tempestiva e una consulenza genetica sono fondamentali per un'adeguata gestione e trattamento del paziente (Parenti et al, 2022).

In collaborazione con il laboratorio di Brain Connectivity, nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzata del Ministero della Salute, è stata messa a punto una piattaforma di diagnostica molecolare avanzata per la stratificazione del rischio genetico e l'identificazione di marcatori per le malattie neurodegenerative.

È in corso l'analisi molecolare mediante NGS di un'ampia famiglia italiana affetta da una forma di demenza familiare. Sono state escluse le cause genetiche note si procederà con l'analisi di varianti in nuovi geni e in regioni non codificanti.

Nell'ambito di uno studio collaborativo su una forma familiare di mioclono epilessia (FAME2, OMIM 607876), a seguito della caratterizzazione genetica molecolare di pazienti e familiari affetti, sono state allestite colture cellulari da biopsie cutanee di individui selezionati. Allo scopo di contribuire alla definizione delle basi eziopatogenetiche della patologia è stata avviata una collaborazione all'interno dell'Istituto per la generazione di neuroni ottenuti da fibroblasti chimicamente transdifferenziati per descrivere il fenotipo cellulare correlato alle mutazioni identificate. Lo studio è ancora in corso.

Nell'ambito di collaborazioni internazionali abbiamo raccolto una coorte di pazienti per la fine caratterizzazione dello spettro di malattia associata a mutazioni in DST, che va da fenotipi puramente dermatologici da fragilità cutanea, quadri neurodegenerativi, fino a fenotipi neurologici gravi, con letalità infantile. È in corso uno studio di correlazione genotipo/fenotipo e analisi funzionale di mutazioni nuove e già note allo scopo di caratterizzare i meccanismi molecolari e cellulari alla base dei diversi fenotipi clinici per mettere in atto strategie di medicina personalizzata per la presa in carico del paziente a scopo preventivo e riabilitativo.

#### Malattie cardiovascolari:

In collaborazione con la Società Italiana di Cardiologia dello Sport, il gruppo ha contribuito alla stesura di una consensus per l'utilizzo di test genetici nell'atleta basati su pannelli NGS per le cardiomiopatie e sindromi aritmiche allo scopo di identificare precocemente malattie cardiovascolari ereditarie a rischio di morte improvvisa durante l'attività sportiva e prevenire gli effetti negativi dell'esercizio sull'espressione fenotipica, sulla progressione della malattia e sul peggioramento del substrato aritmogeno (Castelletti et al, 2022).

In collaborazione con l'Università di Brescia, l'Università di Padova, l'European Hospital di Roma, e l'IDI-IRCCS è in corso uno studio sull'identificazione e caratterizzazione funzionale di una nuova classe di mutazioni nel gene TGFBR1 causative della sindrome di Loeys-Dietz (LDS), una patologia aortica e arteriosa potenzialmente letale. Attraverso analisi NGS sono state identificate, in tre pazienti da due famiglie non relate, due nuove mutazioni troncanti nel penultimo esone. Queste mutazioni sono state classificate come di significato incerto (VUS) in quanto, in base alle conoscenze attuali, non correlate al fenotipo osservato. Infatti, mutazioni dominanti missenso in TGFBR1 sono state precedentemente associate a LDS, mentre mutazioni troncanti causano epiteloma squamoso multiplo a risoluzione spontanea (MSSE) senza fenotipo cardiovascolare. Studi funzionali su colture primarie di fibroblasti di pazienti hanno permesso di dimostrare che mutazioni troncanti nella porzione terminale della proteina non vanno incontro a mRNA-decay e portano ad un fenotipo cellulare tipico dei fibroblasti LDS, con le vie di segnalazione TGFβ paradossalmente attivate a livello costitutivo e differenziamento miogenico. Questo studio evidenzia l'importanza di integrare i database genetici/clinici con dati funzionali per una corretta interpretazione delle varianti genomiche.

### Malattie rare non diagnosticate e sindromi del neurosviluppo:

Nell'ambito delle malattie rare non diagnosticate sono stati condotti 4 diversi studi che hanno permesso di identificare nuove mutazioni ed ampliare lo spettro clinico-molecolare di diverse patologie rare. In particolare, in collaborazione con gruppi internazionali, mediante sequenziamento dell'esoma clinico, è stata identificata una variante de novo ricorrente nel gene *ARPC4* come causa di disturbi dello sviluppo neurologico e microcefalia, con lievi ritardi motori e significativi disturbi del linguaggio. Analisi funzionali effettuate sui fibroblasti dei pazienti hanno dimostrato una ridotta quantità di F-actina, suggerendo che un'alterazione dell'organizzazione del citoscheletro sia alla base del meccanismo patogenetico implicato (Cintron et al, 2022).

In uno studio collaborativo internazionale sono state identificate mediante analisi NGS e caratterizzate a livello funzionale 4 nuove mutazioni nel gene *CSNK2B* in 5 soggetti con diverse sindromi craniodigitali, di cui due con caratteristiche cliniche sovrapponibili con la sindrome *POBINDS* precedentemente associata a difetti in *CSNK2B*, e tre con una nuova sindrome craniodigitale con disabilità intellettiva. Studi in silico e in vitro dell'effetto delle varianti identificate sulla struttura, espressione e attività della proteina codificata (*CK2b*) e del suo diretto target regolativo, la casein chinasi 2 (*CK2*), hanno suggerito un differente meccanismo patogenetico alla base dei due diversi fenotipi: a ploidinsufficienza o effetto dominante negativo (Asif et al., 2022).

Un altro studio collaborativo internazionale ha permesso di decifrare il meccanismo patogenetico di varianti strutturali (*VS*, varianti che coinvolgono segmenti di almeno 50bp) nel locus *HDAC9/TWIST1* alla base di craniosinostosi e malformazioni cranio-facciali. 10 pazienti con malformazioni craniofacciali e mutazioni in *HDAC9* (sia *VS* che mutazioni di singolo nucleotide) sono stati reclutati per lo studio tramite la piattaforma internazionale Matchmaker Exchange. L'analisi strutturale e funzionale delle mutazioni ha permesso di identificare una sequenza nella regione 3' di *HDAC9* critica per la regolazione del gene vicino, *TWIST1*. Questo codifica un fattore di trascrizione cruciale per lo sviluppo mesodermico a livello craniofacciale e degli arti. Combinando l'analisi della conformazione 3D della cromatina, saggi di espressione genica e modelli animali è stato dimostrato che le varianti strutturali nella sequenza *HDAC9* interrompono l'organizzazione tridimensionale della cromatina ed alterano gli elementi regolatori del gene *TWIST1*, determinando così un fenotipo che non è associato direttamente alla proteina *HDAC9*, ma a *TWIST1*. Questo studio evidenzia l'importanza di un'attenta interpretazione delle mutazioni per risolvere casi di malattie genetiche non diagnosticate, tenendo presente anche meccanismi patogenetici legati ad effetti strutturali sulla conformazione del DNA (Hirsh et al., 2022).

Infine, in collaborazione con l'IDI-IRCCS, l'Humanitas IRCCS, l'Università di Tor Vergata e l'ISS, sono state identificate mediante analisi NGS e caratterizzate a livello funzionale due nuove mutazioni missenso della proteina chinasi *RIPK4* in due fratelli con displasia ectodermica (*DE*) autosomica recessiva caratterizzata da sindattilia cutanea, ipercheratosi palmoplantare e sinechie orofacciali, ampliando così lo spettro fenotipico delle patologie causate da mutazioni in questo gene. Inoltre, gli studi condotti su colture primarie di cheratinociti (saggi di adesione, analisi di espressione genica, immunofluorescenza e western blot) e biopsie cutanee (analisi di immunofluorescenza e microscopia elettronica) dei pazienti hanno permesso di definire meglio il ruolo della chinasi e la sua interazione funzionale con diversi fattori implicati in altre *DE* con una forte sovrapposizione clinica (i.e. i fattori di trascrizione *IRF6* e *p63* e le molecole di adesione cellulare nectina-4 e *PKP1*) (Fortugno et al., 2022).

La maggior parte degli interventi riabilitativi ad oggi sono basati su protocolli standard frutto dell'esperienza empirica piuttosto che sull'effettiva diagnosi molecolare di patologia. Di conseguenza la risposta al trattamento è molto variabile in termini clinico-riabilitativi con pazienti

che possono ricevere un beneficio molto limitato. Lo scopo principale della ricerca è definire specifiche basi molecolari di malattia per migliorare il successo della riabilitazione. Particolare enfasi è data nel tradurre nella pratica clinica i risultati della ricerca, con un approccio che, partendo dal paziente e lo studio del DNA, restituisce marcatori genetici per lo sviluppo di protocolli di presa in carico personalizzati limitando l'intervento non utile e poco efficace, migliorando i risultati riabilitativi e mirando ad anticipare la malattia ed intervenire sui fattori di suscettibilità anche ambientali noti.

## PUBBLICAZIONI

Opattova A, Langie S. A. S., Milic, M., Collins, A., Brevik, A., Coskun, E., ... Working Group 5 of hCOMET (Cost action CA15132).

**A pooled analysis of molecular epidemiological studies on modulation of DNA repair by host factors.**

*Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 876–877(503447), 503447. doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503447

Levels of DNA damage represent the dynamics between damage formation and removal. Therefore, to better interpret human biomonitoring studies with DNA damage endpoints, an individual's ability to recognize and properly remove DNA damage should be characterized. Relatively few studies have included DNA repair as a biomarker and therefore, assembling and analyzing a pooled database of studies with data on base excision repair (BER) was one of the goals of hCOMET (EU-COST CA15132). A group of approximately 1911 individuals, was gathered from 8 laboratories which run population studies with the comet-based in vitro DNA repair assay. BER incision activity data were normalized and subsequently correlated with various host factors. BER was found to be significantly higher in women. Although it is generally accepted that age is inversely related to DNA repair, no overall effect of age was found, but sex differences were most pronounced in the oldest quartile (>61 years). No effect of smoking or occupational exposures was found. A body mass index (BMI) above 25 kg/m<sup>2</sup> was related to higher levels of BER. However, when BMI exceeded 35 kg/m<sup>2</sup>, repair incision activity was significantly lower. Finally, higher BER incision activity was related to lower levels of DNA damage detected by the comet assay in combination with formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg), which is in line with the fact that oxidatively damaged DNA is repaired by BER. These data indicate that BER plays a role in modulating the steady-state level of DNA damage that is detected in molecular epidemiological studies and should therefore be considered as a parallel endpoint in future studies.

Mariani F, Valentini P, Yamba M, Turay AS, Bulubisi H, Moscato U, Buonsenso D.

**Changes in childhood immunizations and intermittent preventive malaria treatment in a peripheral, referral immunization center during the first 12 months of COVID-19 pandemic in Sierra Leone, western Africa.**

*Frontiers in Pediatrics*, 10, 774281. doi:10.3389/fped.2022.774281

**Background:** There is increasing evidence that the COVID-19 pandemic disrupted childhood immunization services. However, detailed reports on immunizations and preventive antimalarial prophylactic treatments delivered and how the trends changed in referral centers in low-income countries are still missing.

**Methods:** We performed a retrospective cross-sectional study. Data for vaccinations administered to children <5 years of age, according to the local vaccination schedule, were extracted from the official records of the Kent Community Health Post, Sierra Leone, in the period between April 2019 and March 2021. We compared the vaccinations performed in the first year, considered as a pre-Covid period, with the second year, post-Covid period. Both the period was then divided in four trimester each and the same analysis was operated for each trimester. A Chi-square goodness of fit test was performed to compare the number of vaccinations performed both in the 2 years and in the 8 trimesters.

**Findings:** Seven thousand two hundred and eighty-three vaccinations were administered: 4,641 in the period between April 2019 and March 2020 and 2,642 between April 2020 and March 2021. The drop in immunizations performed began as soon as the first cases were described in China. The drops were statistically significant when the first three trimesters of the two study periods were compared, while no statistically significant differences were observed for all the vaccines performed in the 4th trimesters. Vaccines administered at birth (BCG) were less affected compared to booster vaccinations.

**Conclusions:** Immunizations administered in a referral health center in Sierra Leone significantly declined during the pandemic. Although the decline was less pronounced in the last months of the pandemic, we



don't think that the small increase would indicate the recovery of previously missed vaccinations. These findings open new public health challenges for the coming years.

Ilari S, Russo P, Proietti S, Vitiello L, Muscoli C, Tomino C, Bonassi S.

**DNA damage in dementia: Evidence from patients affected by severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) and meta-analysis of most recent literature.**

*Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 878(503499), 503499. doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503499*

Oxidative stress that leads to oxidatively damaged DNA, plays a crucial role in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) as well as in the onset of neurodegenerative diseases. The consequent genomic instability is the first neuropathological event found in the preclinical phase of cognitive impairment (CI), and the level of DNA damage is closely related to the degree of dementia. Since CI has been associated with COPD, we investigated the extent of DNA damage in isolated lymphocytes with the Comet assay, in a group of severe COPD patients with cognitive function measured by the Mini-Mental State Examination (MMSE). An increase in DNA damage was observed in COPD patients with dementia (MMSE $\leq$ 24), although the difference was only borderline (22.4  $\pm$  6.9 vs. 18.5  $\pm$  7.1;  $p = 0.055$ ). Meta-analysis, including the results of the current study, confirmed that patients with MMSE $\leq$  24 showed higher level of DNA damage than patients with MMSE $>$  24. We observed a significant reduction ( $p < 0.001$ ) in the MMSE score in patients with cognitive decline in areas I (Orientation), III (Attention and Calculus) and V (Language). Only the temporal orientation category in area I was also associated with the level of oxidative damage, with higher levels of MDA ( $p < 0.01$ ) and DNA damage ( $p < 0.03$ ). Patients with the lowest temporal orientation score had a 12% higher mean DNA damage (Odds Ratio=1.12; 95% confidence interval (95%CI) 1.01-1.25;  $p < 0.036$ ). Temporal orientation is a component of most screening tests for the diagnosis of cognitive impairment, on the bases that disorientation is a common factor in dementia. Present results show that each component of cognitive decline can have a different etiopathogenesis and clinical relevance. A more thorough assessment of the cognitive functions of patients starting COPD rehabilitation, together with the assessment of DNA and the level of oxidative stress, can provide essential information to adapt and customize the rehabilitation project.

Bini C, Paoletti M, Marcellusi A, Tomino C, Mennini FS.

**Valutazione economica di treosulfan in pazienti sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche.**

*Glob Reg Health Technol Assess Actions Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search. 2022 Oct 5;9:105-116. doi: 10.33393/grhta.2022.2412.*

Objective: To assess the cost-effectiveness and economic sustainability of treosulfan plus fludarabine compared with busulfan plus fludarabine as a conditioning treatment for malignant disease prior to allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT) in adult patients in Italy.

Method: The two theoretical cohorts of patients aged  $\geq 60$  years with acute myeloid leukaemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) were pooled and followed over time using a partitioned survival model with cycles of 28 days. Patients can transition between a post-HSCT recovery/remission state (Event-Free Survival state, EFS state), a relapsed/progressed disease state, and a death state. A lifetime horizon for cost-effectiveness analysis and a 5-years' time horizon for budget impact analysis were used. The perspective of the Italian National Health Service was adopted. Utility values were obtained from published sources. Costs included: drug acquisition, HSCT procedure, management and treatment of adverse reactions, graft-versus-host disease (GvHD) and health states, end of life treatment. Discounting of 3% per year was applied for both costs and outcomes according to Italian guidelines. Sensitivity was tested through both one-way and probabilistic analyses.

Results: Cost-effectiveness analysis showed that treosulfan is both more effective and less expensive compared with busulfan (+1.08 life-years, +0.95 quality-adjusted life-years per patient and -€ 41,388 per

patient). On the side of economic sustainability, the introduction of treosulfan in the market could generate a cumulative decrement of the expense incurred by NHS of about –€ 212,063 over five years.

Conclusion: Treosulfan could represent a cost-effective and sustainable treatment alternative from the perspective of the NHS.

Centofanti F, Alonzi T, Latini A, Spitalieri P, Murdocca M, Chen X, Pandolfi PP.

**Indole-3-carbinol in vitro antiviral activity against SARS-CoV-2 virus and in vivo toxicity.**

*Cell Death Discovery*, 8(1), 491. doi:10.1038/s41420-022-01280-2

The effects of indole-3-carbinol (I3C) compound have been described deeply as antitumor drug in multiple cancers. Herein, I3C compound was tested for toxicity and antiviral activity against SARS-CoV-2 infection. Antiviral activity was assessed in vitro in both in VeroE6 cell line and human Lung Organoids (hLORGs) where I3C exhibited a direct anti-SARS-CoV-2 replication activity with an antiviral effect and a modulation of the expression of genes implicated in innate immunity and inflammatory response was observed at 16.67 µM. Importantly, we further show the I3C is also effective against the SARS-CoV-2 Omicron variant. In mouse model, instead, we assessed possible toxicity effects of I3C through two different routes of administration: intragastrically (i.g.) and intraperitoneally (i.p.). The LD50 (lethal dose 50%) values in mice were estimated to be: 1410 and 1759 mg/kg i.g.; while estimated values for i.p. administration were: 444.5 mg/kg and 375 mg/kg in male and female mice, respectively. Below these values, I3C (in particular at 550 mg/kg for i.g. and 250 mg/kg for i.p.) induces neither death, nor abnormal toxic symptoms as well as no histopathological lesions of the tissues analysed. These tolerated doses are much higher than those already proven effective in pre-clinical cancer models and in vitro experiments. In conclusion, I3C exhibits a significant antiviral activity, and no toxicity effects were recorded for this compound at the indicated doses, characterizing it as a safe and potential antiviral compound. The results presented in this study could provide experimental pre-clinical data necessary for the start of human clinical trials with I3C for the treatment of SARS-CoV-2 and beyond.

Trubetsky V, Pardiñas AF, Qi T, Panagiotaropoulou G, Awasthi S, Bigdeli TB, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium.

**Mapping genomic loci implicates genes and synaptic biology in schizophrenia.**

*Nature*, 604(7906), 502–508. doi:10.1038/s41586-022-04434-5

Schizophrenia has a heritability of 60-80%<sup>1</sup>, much of which is attributable to common risk alleles. Here, in a two-stage genome-wide association study of up to 76,755 individuals with schizophrenia and 243,649 control individuals, we report common variant associations at 287 distinct genomic loci. Associations were concentrated in genes that are expressed in excitatory and inhibitory neurons of the central nervous system, but not in other tissues or cell types. Using fine-mapping and functional genomic data, we identify 120 genes (106 protein-coding) that are likely to underpin associations at some of these loci, including 16 genes with credible causal non-synonymous or untranslated region variation. We also implicate fundamental processes related to neuronal function, including synaptic organization, differentiation and transmission. Fine-mapped candidates were enriched for genes associated with rare disruptive coding variants in people with schizophrenia, including the glutamate receptor subunit GRIN2A and transcription factor SP4, and were also enriched for genes implicated by such variants in neurodevelopmental disorders. We identify biological processes relevant to schizophrenia pathophysiology; show convergence of common and rare variant associations in schizophrenia and neurodevelopmental disorders; and provide a resource of prioritized genes and variants to advance mechanistic studies.

Vitiello L, Ilari S, Sansone L, Belli M, Cristina M, Marcolongo F, Russo, P.

**Preventive measures against pandemics from the beginning of civilization to nowadays-how everything has remained the same over the Millennia.**

*Journal of Clinical Medicine*, 11(7), 1960. doi:10.3390/jcm11071960

As of 27 March 2022, the  $\beta$ -coronavirus severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has infected more than 487 million individuals worldwide, causing more than 6.14 million deaths. SARS-CoV-2 spreads through close contact, causing the coronavirus disease 2019 (COVID-19); thus, emergency lockdowns have been implemented worldwide to avoid its spread. COVID-19 is not the first infectious disease that humankind has had to face during its history. Indeed, humans have recurrently been threatened by several emerging pathogens that killed a substantial fraction of the population. Historical sources document that as early as between the 10th and the 6th centuries BCE, the authorities prescribed physical-social isolation, physical distancing, and quarantine of the infected subjects until the end of the disease, measures that strongly resemble containment measures taken nowadays. In this review, we show a historical and literary overview of different epidemic diseases and how the recommendations in the pre-vaccine era were, and still are, effective in containing the contagion.

Infante M, Vitiello L, Fabbri A, Ricordi C, Padilla N, Pacifici F, Uccioli L.

**Prolonged clinical remission of type 1 diabetes sustained by calcifediol and low-dose basal insulin: a case report.**

*Immunotherapy*, 15(13), 1009–1019. doi:10.2217/imt-2022-0266

Herein, we describe an unusually prolonged duration (31 months) of the clinical remission phase in a 22-year-old Italian man with new-onset type 1 diabetes. Shortly after the disease diagnosis, the patient was treated with calcifediol (also known as 25-hydroxyvitamin D3 or calcidiol), coupled with low-dose basal insulin, to correct hypovitaminosis D and to exploit the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of vitamin D. During the follow-up period, the patient retained a substantial residual  $\beta$ -cell function and remained within the clinical remission phase, as evidenced by an insulin dose-adjusted glycated hemoglobin value  $<9$ . At 24 months, we detected a peculiar immunoregulatory profile of peripheral blood cells, which may explain the prolonged duration of the clinical remission sustained by calcifediol as add-on treatment to insulin.

Russo S, Bonassi S.

**Prospects and pitfalls of machine learning in nutritional epidemiology.**

*Nutrients*, 14(9), 1705. doi:10.3390/nu14091705

Nutritional epidemiology employs observational data to discover associations between diet and disease risk. However, existing analytic methods of dietary data are often sub-optimal, with limited incorporation and analysis of the correlations between the studied variables and nonlinear behaviours in the data. Machine learning (ML) is an area of artificial intelligence that has the potential to improve modelling of nonlinear associations and confounding which are found in nutritional data. These opportunities notwithstanding, the applications of ML in nutritional epidemiology must be approached cautiously to safeguard the scientific quality of the results and provide accurate interpretations. Given the complex scenario around ML, judicious application of such tools is necessary to offer nutritional epidemiology a novel analytical resource for dietary measurement and assessment and a tool to model the complexity of dietary intake and its relation to health. This work describes the applications of ML in nutritional epidemiology and provides guidelines to avoid common pitfalls encountered in applying predictive statistical models to nutritional data. Furthermore, it helps unfamiliar readers better assess the significance of their results and provides new possible future directions in the field of ML in nutritional epidemiology.

Valencia-Quintana R, Bahena-Ocampo IU, González-Castañeda G, Bonilla E, Milić M, Bonassi S, Sánchez-Alarcón J.

**miRNAs: A potentially valuable tool in pesticide toxicology assessment-current experimental and epidemiological data review.**

*Chemosphere*, 295(133792), 133792. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.133792

miRNAs are responsible for the regulation of many cellular processes such as development, cell differentiation, proliferation, apoptosis, and tumor growth. Several studies showed that they can also serve as specific, stable, and sensitive markers of chemical exposure. In this review, current experimental and epidemiological data evidencing deregulation in miRNA expression in response to fungicides, insecticides or herbicides were analyzed. As shown by Venn's diagrams, miR-363 and miR-9 deregulation is associated with fungicide exposure in vitro and in vivo, while let-7, miR-155, miR-181 and miR-21 were found to be commonly deregulated by at least three different insecticides. Furthermore, let-7, miR-30, miR-126, miR-181 and miR-320 were commonly deregulated by 3 different herbicides. Notably, these 5 miRNAs were also found to be deregulated by one or more insecticides, suggesting their participation in the cellular response to pesticides, regardless of their chemical structure. All these miRNAs have been proposed as potential biomarkers for fungicide, insecticide, or herbicide exposure. These results allow us to improve our understanding of the molecular mechanisms of toxicity upon pesticide exposure, although further studies are needed to confirm these miRNAs as definitive (not potential) biomarkers of pesticide exposure.

Russo V, Lallo E, Munnia A, Spedicato M, Messerini L, D'Aurizio R, Peluso M.

**Artificial intelligence predictive models of response to cytotoxic chemotherapy alone or combined to targeted therapy for metastatic colorectal cancer patients: A systematic review and meta-analysis.**

*Cancers*, 14(16), 4012. doi:10.3390/cancers14164012

Tailored treatments for metastatic colorectal cancer (mCRC) have not yet completely evolved due to the variety in response to drugs. Therefore, artificial intelligence has been recently used to develop prognostic and predictive models of treatment response (either activity/efficacy or toxicity) to aid in clinical decision making. In this systematic review, we have examined the ability of learning methods to predict response to chemotherapy alone or combined with targeted therapy in mCRC patients by targeting specific narrative publications in Medline up to April 2022 to identify appropriate original scientific articles. After the literature search, 26 original articles met inclusion and exclusion criteria and were included in the study. Our results show that all investigations conducted on this field have provided generally promising results in predicting the response to therapy or toxic side-effects. By a meta-analytic approach we found that the overall weighted means of the area under the receiver operating characteristic (ROC) curve (AUC) were 0.90, 95% C.I. 0.80-0.95 and 0.83, 95% C.I. 0.74-0.89 in training and validation sets, respectively, indicating a good classification performance in discriminating response vs. non-response. The calculation of overall HR indicates that learning models have strong ability to predict improved survival. Lastly, the delta-radiomics and the 74 gene signatures were able to discriminate response vs. non-response by correctly identifying up to 99% of mCRC patients who were responders and up to 100% of patients who were non-responders. Specifically, when we evaluated the predictive models with tests reaching 80% sensitivity (SE) and 90% specificity (SP), the delta radiomics showed an SE of 99% and an SP of 94% in the training set and an SE of 85% and SP of 92 in the test set, whereas for the 74 gene signatures the SE was 97.6% and the SP 100% in the training set.

Ferroni P, Palmirota R, Egeo G, Aurilia C, Valente MG, Spila A, Guadagni F.

**Association of LTA and SOD gene polymorphisms with cerebral white matter hyperintensities in migraine patients.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(22), 13781. doi:10.3390/ijms232213781

White matter hyperintensities (WMHs) in migraine could be related to inflammatory and antioxidant events. The aim of this study is to verify whether migraine patients with WMHs carry a genetic pro-inflammatory/pro-oxidative status. To test this hypothesis, we analyzed lymphotoxin alpha (LTA; rs2071590T and rs2844482G) and superoxide dismutase 1 (SOD1; rs2234694C) and 2 (SOD2; rs4880T) gene polymorphisms (SNPs) in 370 consecutive patients affected by episodic (EM; n = 251) and chronic (CM; n = 119) migraine and in unrelated healthy controls (n = 100). Brain magnetic resonance was available in 183/370 patients. The results obtained show that genotypes and allele frequencies for all tested SNPs did

not differ between patients and controls. No association was found between single SNPs or haplotypes and sex, migraine type, cardiovascular risk factors or disorders. Conversely, the LTA rs2071590T (OR = 2.2) and the SOD1 rs2234694C (OR = 4.9) alleles were both associated with WMHs. A four-loci haplotype (TGCT haplotype: rs2071590T/rs2844482G/rs2234694C/rs4880T) was significantly more frequent in migraineurs with WMHs (7 of 38) compared to those without WMHs (4 of 134; OR = 8.7). We may, therefore, conclude by suggesting that that an imbalance between pro-inflammatory/pro-oxidative and antioxidant events in genetically predisposed individuals may influence the development of WMHs.

Genovese C, Garozzo A, D'Angeli F, Malfa GA, Bellia F, Tomasello B, Acquaviva R.

**Orobanche crenata Forssk. Extract affects human breast cancer cell MCF-7 survival and viral replication.**

*Cells (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1696. doi:10.3390/cells11101696

Background: Breast cancer (BC) is the leading cause of death worldwide. The severity of BC strictly depends on the molecular subtype. The less aggressive hormone-positive subtype is treated with adjuvant endocrine therapy (AET), which causes both physical and psychological side effects. This condition strongly impacts the adherence and persistence of AET among oncologic patients. Moreover, viral infections also constitute a serious problem for public health. Despite their efficacy, antiviral agents present several therapeutic limits. Accordingly, in the present work, we investigated the antitumor and antiviral activities of *Orobanche crenata* Forssk. (*O. crenata*), a parasitic plant, endemic to the Mediterranean basin, traditionally known for its beneficial properties for human health.

Methods: The MTT assay was carried out to evaluate the cytotoxic effect of *O. crenata* leaf extract (OCLE) on human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) and the primary HFF-1 cell line. The lactic dehydrogenase (LDH) assay was performed on MCF-7 cells to analyze necrotic cell death. The antioxidant effect of OCLE was evaluated by intracellular determination of the reactive oxygen species and thiol groups, by DPPH and ABTS assays. The antiviral activity of OCLE was determined against Poliovirus 1, Echovirus 9, Human respiratory syncytial virus, Adenovirus type 2 and type 5, Coxsackievirus B1 (CoxB1) and B3 (CoxB3), Herpes simplex type 1 (HSV-1) and type 2 (HSV-2), and  $\beta$ -Coronavirus by the plaque reduction assay.

Results: The extract, after 24 h of incubation, did not affect MDA-MB-231 and HFF-1 cell viability. However, at the same time point, it showed a dose-dependent inhibitory effect on MCF-7 cells, with an increase in LDH release. OCLE exhibited free radical scavenging activity and significantly increased non-protein thiol levels in MCF-7 cells. OCLE effectively inhibited HSV-1, HSV-2, CoxB1, and CoxB3 replication.

Conclusions: The overall results showed an interesting inhibitory effect of OCLE on both MCF-7 cell survival and viral replication.

Imarisio A, Pilotto A, Garrafa E, Conforti F, Masciocchi S, Turrone R, Padovani A.

**Plasma cystatin C correlates with plasma NfL levels and predicts disease progression in Parkinson's disease.**

*Neuro-Degenerative Diseases*, 21(5–6), 109–116. doi:10.1159/000523982

Introduction: Previous studies reported increased plasma levels of cystatin C (Cys-C) in Parkinson's disease (PD) and claimed for a possible association with disease severity and progression. The aim of this study was to evaluate plasma Cys-C in PD and healthy controls (HC) and test its association with markers of peripheral inflammation, neurodegeneration, and clinical progression in a longitudinal study.

Methods: Plasma Cys-C, high-sensitive C-reactive protein, interleukin 6, and neurofilament light chain (NfL) were assessed at the baseline in 71 consecutive non-demented PD and 69 HC. PD patients underwent an extensive motor and cognitive assessment at baseline and after 2 years of follow-up. The association of Cys-C with disease severity was evaluated in a multilinear model adjusted for the effect of age, sex, disease duration, and peripheral inflammation.

Results: Cys-C levels appeared to be higher in PD compared to controls and correlated with the plasma neuronal marker NfL ( $r = 0.204$ ,  $p = 0.046$ ). In longitudinal analyses, PD patients with higher Cys-C levels

exhibited faster motor progression at 2 years of follow-up independently from the peripheral inflammatory profile.

Conclusions: Cys-C was associated with higher NfL levels and a remarkably faster motor progression in PD independently from peripheral inflammation. Further studies are needed in order to understand the mechanisms underpinning the association of Cys-C with higher neuronal damage markers in neurodegenerative diseases.

Raparelli V, Nocella C, Proietti M, Romiti GF, Corica B, Bartimoccia S. EVA Collaborators.

**Testosterone-to-estradiol ratio and platelet thromboxane release in ischemic heart disease: the EVA project.**

*Journal of Endocrinological Investigation*, 45(7), 1367–1377. doi:10.1007/s40618-022-01771-0

Background: Data on the interplay between sexual hormones balance, platelet function and clinical outcomes of adults with ischemic heart disease (IHD) are still lacking.

Objective: To assess the association between the Testosterone (T)-to-Estradiol (E2) Ratio (T/E2) and platelet activation biomarkers in IHD and its predictive value on adverse outcomes.

Methods: The EVA study is a prospective observational study of consecutive hospitalized adults with IHD undergoing coronary angiography and/or percutaneous coronary interventions. Serum T/E2 ratios E2, levels of thromboxane B2 (TxB2) and nitrates (NO), were measured at admission and major adverse events, including all-cause mortality, were collected during a long-term follow-up.

Results: Among 509 adults with IHD (mean age  $67 \pm 11$  years, 30% females), males were older with a more adverse cluster of cardiovascular risk factors than females. Acute coronary syndrome and non-obstructive coronary artery disease were more prevalent in females versus males. The lower sex-specific T/E2 ratios identified adults with the highest level of serum TxB2 and the lowest NO levels. During a median follow-up of 23.7 months, the lower sex-specific T/E2 was associated with higher all-cause mortality (HR 3.49; 95% CI 1.24-9.80;  $p = 0.018$ ). In in vitro, platelets incubated with T/E2 ratios comparable to those measured in vivo in the lowest quartile showed increased platelet activation as indicated by higher levels of aggregation and TxB2 production.

Conclusion: Among adults with IHD, higher T/E2 ratio was associated with a lower long-term risk of fatal events. The effect of sex hormones on the platelet thromboxane release may partially explain such finding.

Russo A, Incorvaia L, Capoluongo E, Tagliaferri P, Galvano A, Del Re M, Beretta, G.

**The challenge of the Molecular Tumor Board empowerment in clinical oncology practice: A Position Paper on behalf of the AIOM- SIAPEC/IAP-SIBioC-SIC-SIF-SIGU-SIRM Italian Scientific Societies.**

Critical Reviews in Oncology/Hematology, 169(103567), 103567. doi:10.1016/j.critrevonc.2021.103567

The development of innovative technologies and the advances in the genetics and genomics, have offered new opportunities for personalized treatment in oncology. Although the selection of the patient based on the molecular characteristics of the neoplasm has the potential to revolutionize the therapeutic scenario of oncology, this approach is extremely challenging. The access, homogeneity, and economic sustainability of the required genomic tests should be warranted in the clinical practice, as well as the specific scientific and clinical expertise for the choice of medical therapies. All these elements make essential the collaboration of different specialists within the Molecular Tumor Boards (MTBs). In this position paper, based on experts' opinion, the AIOM-SIAPEC/IAP-SIBioC-SIC-SIF-SIGU-SIRM Italian Scientific Societies critically discuss the available molecular profiling technologies, the proposed criteria for the selection of patients candidate for evaluation by the MTB, the criteria for the selection and analysis of biological samples, and the regulatory and pharmaco-economic issues.

Castelli S, Ciccarone F, De Falco P, Ciriolo MR.

**Adaptive antioxidant response to mitochondrial fatty acid oxidation determines the proliferative outcome of cancer cells.**

*Cancer Letters*, 554(216010), 216010. doi:10.1016/j.canlet.2022.216010

Alterations in lipid catabolism have been broadly described in cancer cells and show tumor-type specific effects on proliferation and cell survival. The factor(s) responsible for this heterogeneity is currently unknown and represents the main limitation in the development of therapeutic interventions that impair lipid metabolism. In this study, we focused on hexanoic acid, a medium-chain fatty acid, that can quickly boost oxidative metabolism by passively crossing mitochondrial membranes. We demonstrated that the antioxidant adaptation of cancer cells to increased fatty acid oxidation is predictive of the proliferative outcome. By interfering with SOD1 expression and glutathione homeostasis, we verified that mitochondrial fatty acid oxidation has antitumor effects in cancer cells that efficiently buffer ROS. In contrast, increased ROS levels promote proliferation in cells with an imbalanced antioxidant response. In addition, an increase in mitochondrial mass and mitophagy activation were observed, respectively. Overall, these data demonstrate that the capacity to manage ROS from mitochondrial oxidative metabolism determines whether lipid catabolism is advantageous or detrimental for cancer cells.

Ravaioli F, Zampieri M, Morandi L, Pirazzini C, Pellegrini C, De Fanti S, Bacalini MG.

**DNA methylation analysis of ribosomal DNA in adults with Down syndrome.**

*Frontiers in Genetics*, 13, 792165. doi:10.3389/fgene.2022.792165

Control of ribosome biogenesis is a critical aspect of the regulation of cell metabolism. As ribosomal genes (rDNA) are organized in repeated clusters on chromosomes 13, 14, 15, 21, and 22, trisomy of chromosome 21 confers an excess of rDNA copies to persons with Down syndrome (DS). Previous studies showed an alteration of ribosome biogenesis in children with DS, but the epigenetic regulation of rDNA genes has not been investigated in adults with DS so far. In this study, we used a targeted deep-sequencing approach to measure DNA methylation (DNAm) of rDNA units in whole blood from 69 adults with DS and 95 euploid controls. We further evaluated the expression of the precursor of ribosomal RNAs (RNA45S) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from the same subjects. We found that the rDNA promoter tends to be hypermethylated in DS concerning the control group. The analysis of epihaplotypes (the combination of methylated and unmethylated CpG sites along the same DNA molecule) showed a significantly lower intra-individual diversity in the DS group, which at the same time was characterized by a higher interindividual variability. Finally, we showed that RNA45S expression is lower in adults with DS. Collectively, our results suggest a rearrangement of the epigenetic profile of rDNA in DS, possibly to compensate for the extranumerary rDNA copies. Future studies should assess whether the regulation of ribosome biogenesis can contribute to the pathogenesis of DS and explain the clinical heterogeneity characteristic of the syndrome.

Pinton G, Boumya S, Ciriolo MR & Ciccarone F.

**Epigenetic insights on PARP-1 activity in cancer therapy.**

*Cancers*, 15(1), 6. doi:10.3390/cancers15010006

The regulation of chromatin state and histone protein eviction have been proven essential during transcription and DNA repair. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymerase 1 (PARP-1) and poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) are crucial mediators of these processes by affecting DNA/histone epigenetic events. DNA methylation/hydroxymethylation patterns and histone modifications are established by mutual coordination between all epigenetic modifiers. This review will focus on histones and DNA/histone epigenetic machinery that are direct targets of PARP-1 activity by covalent and non-covalent PARylation. The effects of these modifications on the activity/recruitment of epigenetic enzymes at DNA damage sites or gene regulatory regions will be outlined. Furthermore, based on the achievements made to the present, we will discuss the potential application of epigenetic-based therapy as a novel strategy for boosting the success of PARP inhibitors, improving cell sensitivity or overcoming drug resistance.

Desideri E, Castelli S, Dorard C, Toifl S, Grazi GL, Ciriolo MR, & Baccarini, M. (2023).

**Impaired degradation of YAP1 and IL6ST by chaperone-mediated autophagy promotes proliferation and migration of normal and hepatocellular carcinoma cells.**

*Autophagy*, 19(1), 152–162. doi:10.1080/15548627.2022.2063004

Impaired degradation of the transcriptional coactivator YAP1 and IL6ST (interleukin 6 cytokine family signal transducer), two proteins deregulated in liver cancer, has been shown to promote tumor growth. Here, we demonstrate that YAP1 and IL6ST are novel substrates of chaperone-mediated autophagy (CMA) in human hepatocellular carcinoma (HCC) and hepatocyte cell lines. Knockdown of the lysosomal CMA receptor LAMP2A increases protein levels of YAP1 and IL6ST, without changes in mRNA expression. Additionally, both proteins show KFERQ-dependent binding to the CMA chaperone HSPA8 and accumulate into isolated lysosomes after stimulation of CMA by prolonged starvation. We further show that LAMP2A downregulation promotes the proliferation and migration in HCC cells and a human hepatocyte cell line, and that it does so in a YAP1- and IL6ST-dependent manner. Finally, LAMP2A expression is downregulated, and YAP1 and IL6ST expression is upregulated, in human HCC biopsies. Taken together, our work reveals a novel mechanism that controls the turnover of two cancer-relevant proteins and suggests a tumor suppressor function of CMA in the liver, advocating for the exploitation of CMA activity for diagnostic and therapeutic purposes. Abbreviations: ACTB: actin beta; ATG5: autophagy related 5; ATG7: autophagy related 7; CMA: chaperone-mediated autophagy; eMI: endosomal microautophagy; HCC: hepatocellular carcinoma; HSPA8: heat shock protein family A (Hsp70) member 8; IL6ST: interleukin 6 cytokine family signal transducer; JAK: Janus kinase; LAMP1: lysosomal associated membrane protein 1; LAMP2A: lysosomal associated membrane protein 2A; MAPK8: mitogen-activated protein kinase 8; P6: pyridine 6; SQSTM1: sequestosome 1; TUBA: tubulin alpha; VDAC1: voltage dependent anion channel 1; VP: verteporfin; YAP1: Yes1 associated transcriptional regulator.

Castelli S, Desideri E, Ciriolo MR

**ROS-mediated activation of p38 protects hepatocellular carcinoma cells from caspase-independent death elicited by lysosomal damage.**

*Biochemical Pharmacology*, 198(114983), 114983. doi:10.1016/j.bcp.2022.114983

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and deadliest cancer in the world. Despite this, few effective drugs are available for its treatment, in part due to the development of resistance, and surgical resection remains the most valuable option, when applicable. Upregulation of anti-apoptotic proteins, downregulation of pro-apoptotic factors and the acquisition of mutations in signaling pathways leading to caspase activation are a few examples of mechanisms that allow cancer cells to evade caspase-dependent apoptosis and continue to grow. The identification of drugs triggering the activation of caspase-independent death may therefore be an effective strategy to circumvent resistance and kill cancer cells. Here, we show that the lysosome damaging compound glycy-L-phenylalanine 2-naphthylamide (GPN) induces cell death by a caspase-independent mechanism in HCC cell lines. Additionally, we identify the MAPK p38 as a novel mediator of the lysosomal stress response. Indeed, a ROS-dependent activation of p38 occurs in response to lysosomal damage, promoting the recovery of lysosomal integrity. As a consequence, pharmacological or genetic inhibition of p38 increases cell death elicited by GPN. Our findings identify p38 as a potential target to potentiate the cytotoxic effects of lysosomal damage and induce caspase-independent cell death in HCC cells, laying the ground for future evaluation of the efficacy of combination therapy.

Iachettini S, Ciccarone F, Maresca C, D' Angelo C, Petti E, Di Vito S, Biroccio A.

**The telomeric protein TERF2/TRF2 impairs HMGB1-driven autophagy.**

*Autophagy*, 19(5), 1479–1490. doi:10.1080/15548627.2022.2138687

TERF2/TRF2 is a pleiotropic telomeric protein that plays a crucial role in tumor formation and progression through several telomere-dependent and -independent mechanisms. Here, we uncovered a novel function



for this protein in regulating the macroautophagic/autophagic process upon different stimuli. By using both biochemical and cell biology approaches, we found that TERF2 binds to the non-histone chromatin-associated protein HMGB1, and this interaction is functional to the nuclear/cytoplasmic protein localization. Specifically, silencing of TERF2 alters the redox status of the cells, further exacerbated upon EBSS nutrient starvation, promoting the cytosolic translocation and the autophagic activity of HMGB1. Conversely, overexpression of wild-type TERF2, but not the mutant unable to bind HMGB1, negatively affects the cytosolic translocation of HMGB1, counteracting the stimulatory effect of EBSS starvation. Moreover, genetic depletion of HMGB1 or treatment with inflachromene, a specific inhibitor of its cytosolic translocation, completely abolished the pro-autophagic activity of TERF2 silencing. In conclusion, our data highlighted a novel mechanism through which TERF2 modulates the autophagic process, thus demonstrating the key role of the telomeric protein in regulating a process that is fundamental, under both physiological and pathological conditions, in defining the fate of the cells. Abbreviations: ALs: autolysosomes; ALT: alternative lengthening of telomeres; ATG: autophagy related; ATM: ATM serine/threonine kinase; CQ: Chloroquine; DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DDR: DNA damage response; DHE: dihydroethidium; EBSS: Earle's balanced salt solution; FACS: fluorescence-activated cell sorting; GFP: green fluorescent protein; EGFP: enhanced green fluorescent protein; GSH: reduced glutathione; GSSG: oxidized glutathione; HMGB1: high mobility group box 1; ICM: inflachromene; IF: immunofluorescence; IP: immunoprecipitation; NAC: N-acetyl-L-cysteine; NHEJ: non-homologous end joining; PLA: proximity ligation assay; RFP: red fluorescent protein; ROS: reactive oxygen species; TIF: telomere-induced foci; TERF2/TRF2: telomeric repeat binding factor 2.

Vitiello L, Gatta L, Ilari S, Bonassi S, Cristina M, Ciatti F, Limongi D.

**Long lasting cellular immune response induced by mRNA vaccination: Implication for prevention strategies.**

*Frontiers in Immunology, 13, 836495. doi:10.3389/fimmu.2022.836495*

As the COVID19 pandemic continues to spread and vaccinations are administered throughout the world at different rates and with different strategies, understanding the multiple aspects of the immune response to vaccinations is required to define more efficient vaccination strategies. To date, the duration of protection induced by COVID19 vaccines is still matter of debate. To assess whether 2-doses vaccination with BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine was sufficient to induce a persistent specific cellular immune response, we evaluated the presence of SARS-COV2 Spike-specific B and T lymphocytes in 28 healthcare workers 1 and 7 months after completing the vaccination cycle. The results showed that at 7 months after second dose a population of Spike-specific B lymphocytes was still present in 86% of the immunized subjects, with a higher frequency when compared to not-immunized controls ( $0.38\% \pm 0.07$  vs  $0.13\% \pm 0.03$ ,  $p < 0.001$ ). Similarly, specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes, able to respond in vitro to stimulation with Spike derived peptides, were found at 7 months. These results confirm that vaccination with BNT162b2 is able to induce a specific immune response, potentially long lasting, and could be helpful in defining future vaccination strategies.

Cifelli P, Ruffolo G, Ceccanti M, Cambieri C, Libonati L, Palma E & Inghilleri M.

**Classical and unexpected effects of ultra-micronized PEA in neuromuscular function.**

*Biomolecules, 12(6), 758. doi:10.3390/biom12060758*

Recently, the endocannabinoid system has attracted growing attention from the scientific community for its involvement in homeostatic and pathological processes as they pertain to human physiology. Among the constituents of the endocannabinoid system, the molecule palmitoyl ethanolamide has particularly been studied for its ability to reduce several inflammatory processes involving the central nervous system. Here, we reviewed published literature and summarized the main targets of the palmitoyl ethanolamide, along with its unique possible mechanisms for restoring correct functioning of the central nervous system. Moreover, we have highlighted a less-known characteristic of palmitoyl ethanolamide, namely its ability to modulate the function of the neuromuscular junction by binding to acetylcholine receptors in different

experimental conditions. Indeed, there are several studies that have highlighted how ultra-micronized palmitoyl ethanolamide is an interesting nutraceutical support for the treatment of pathological neuromuscular conditions, specifically when the normal activity of the acetylcholine receptor is altered. Although further multicentric clinical trials are needed to confirm the efficacy of ultra-micronized palmitoyl ethanolamide in improving symptoms of neuromuscular diseases, all the literature reviewed here strongly supports the ability of this endocannabinoid-like molecule to modulate the acetylcholine receptors thus resulting as a valid support for the treatment of human neuromuscular diseases.

Ceccanti M, Libonati L, Ruffolo G, Cifelli P, Moret F, Frasca V, Cambieri, C.

**Effects of 3,4-diaminopyridine on myasthenia gravis: Preliminary results of an open-label study.**  
*Frontiers in Pharmacology, 13, 982434. doi:10.3389/fphar.2022.982434*

Background: 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) can lead to clinical and electrophysiological improvement in myasthenic syndrome; it may thus represent a valuable therapeutic option for patients intolerant to pyridostigmine. Objective: to assess 3,4-diaminopyridine (3,4-DAP) effects and tolerability in patients with anti-AChR myasthenia gravis. Method: Effects were monitored electrophysiologically by repetitive nerve stimulation (RNS) and by standardized clinical testing (QMG score) before and after a single dose administration of 3,4-DAP 10 mg per os in 15 patients. Patients were divided according to their Myasthenia Gravis Foundation of America (MGFA) class into mild and severe. Results: No significant side effects were found, apart from transient paresthesia. 3,4-DAP had a significant effect on the QMG score ( $p = 0.0251$ ), on repetitive nerve stimulation ( $p = 0.0251$ ), and on the forced vital capacity ( $p = 0.03$ ), thus indicating that it may reduce the level of disability and the decremental muscle response. When the patients were divided according to the MGFA classification, 3,4-DAP showed a positive effect in the severe group, either for the QMG score ( $p = 0.031$ ) or for the RNS decrement ( $p = 0.031$ ). No significant difference was observed in any of the outcome measures within the mild group ( $p > 0.05$ ). A direct effect of 3,4-DAP on nicotinic ACh receptors (nAChRs) was excluded since human nAChRs reconstituted in an expression system, which were not affected by 3,4-DAP application. Conclusion: Our results suggest that 3,4-DAP may be a useful add-on therapy, especially in most severe patients or when immunosuppressive treatment has not yet reached its full effect or when significant side-effects are associated with anticholinesterase.

Ruffolo G, Alfano V, Romagnolo A, Zimmer T, Mills JD, Cifelli P, Palma, E.

**GABAA receptor function is enhanced by Interleukin-10 in human epileptogenic gangliogliomas and its effect is counteracted by Interleukin-1 $\beta$ .**

*Scientific Reports, 12(1), 17956. doi:10.1038/s41598-022-22806-9*

Gangliogliomas (GGs) are low-grade brain tumours that cause intractable focal epilepsy in children and adults. In GG, as in epileptogenic focal malformations (i.e., tuberous sclerosis complex, TSC), there is evidence of sustained neuroinflammation with involvement of the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$ . On the other hand, anti-inflammatory mediators are less studied but bear relevance for understanding seizure mechanisms. Therefore, we investigated the effect of the key anti-inflammatory cytokine IL-10 on GABAergic neurotransmission in GG. We assessed the IL-10 dependent signaling by transcriptomic analysis, immunohistochemistry and performed voltage-clamp recordings on *Xenopus* oocytes microtransplanted with cell membranes from brain specimens, to overcome the limited availability of acute GG slices. We report that IL-10-related mRNAs were up-regulated in GG and slightly in TSC. Moreover, we found IL-10 receptors are expressed by neurons and astroglia. Furthermore, GABA currents were potentiated significantly by IL-10 in GG. This effect was time and dose-dependent and inhibited by blockade of IL-10 signaling. Notably, in the same tissue, IL-1 $\beta$  reduced GABA current amplitude and prevented the IL-10 effect. These results suggest that in epileptogenic tissue, pro-inflammatory mechanisms of hyperexcitability prevail over key anti-inflammatory pathways enhancing GABAergic inhibition. Hence, boosting the effects of specific anti-inflammatory molecules could resolve inflammation and reduce intractable seizures.

Ruffolo G, Gaeta A, Cannata B, Pinzaglia C, Aronica E, Morano A, Palma, E.  
**GABAergic neurotransmission in human tissues is modulated by cannabidiol.**  
*Life (Basel, Switzerland)*, 12(12), 2042. doi:10.3390/life12122042

Recently, the potential use of phytocannabinoids (pCBs) to treat different pathological conditions has attracted great attention in the scientific community. Among the different pCBs, cannabidiol (CBD) has showed interesting biological properties, making it a promising molecule with a high security profile that has been approved for treatment as an add-on therapy in patients afflicted by severe pharmaco-resistant epilepsy, including Dravet syndrome (DS), Lennox-Gastaut syndrome (LGS) and tuberous sclerosis complex (TSC). CBD is pharmacologically considered a "dirty drug", since it has the capacity to bind different targets and to activate several cellular pathways. GABAergic impairment is one of the key processes during the epileptogenesis period able to induce a generalized hyperexcitability of the central nervous system (CNS), leading to epileptic seizures. Here, by using the microtransplantation of human brain membranes approach in *Xenopus* oocytes and electrophysiological recordings, we confirm the ability of CBD to modulate GABAergic neurotransmission in human cerebral tissues obtained from patients afflicted by different forms of pharmaco-resistant epilepsies, such as DS, TSC, focal cortical dysplasia (FCD) type IIb and temporal lobe epilepsy (TLE). Furthermore, using cDNAs encoding for human GABAA receptor subunits, we found that  $\alpha 1\beta 2$  receptors are still affected by CBD, while classical benzodiazepine lost its efficacy as expected.

Scalise S, Zannino C, Lucchino V, Lo Conte M, Scaramuzzino L, Cifelli P, Parrotta EI.  
**Human iPSC modeling of genetic febrile seizure reveals aberrant molecular and physiological features underlying an impaired neuronal activity.**  
*Biomedicines*, 10(5), 1075. doi:10.3390/biomedicines10051075

Mutations in SCN1A gene, encoding the voltage-gated sodium channel (VGSC) NaV1.1, are widely recognized as a leading cause of genetic febrile seizures (FS), due to the decrease in the Na<sup>+</sup> current density, mainly affecting the inhibitory neuronal transmission. Here, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs)-derived neurons (idNs) from a patient belonging to a genetically well-characterized Italian family, carrying the c.434T > C mutation in SCN1A gene (hereafter SCN1AM145T). A side-by-side comparison of diseased and healthy idNs revealed an overall maturation delay of SCN1AM145T cells. Membranes isolated from both diseased and control idNs were injected into *Xenopus* oocytes and both GABA and AMPA currents were successfully recorded. Patch-clamp measurements on idNs revealed depolarized action potential for SCN1AM145T, suggesting a reduced excitability. Expression analyses of VGSCs and chloride co-transporters NKCC1 and KCC2 showed a cellular "dysmaturity" of mutated idNs, strengthened by the high expression of SCN3A, a more fetal-like VGSC isoform, and a high NKCC1/KCC2 ratio, in mutated cells. Overall, we provide strong evidence for an intrinsic cellular immaturity, underscoring the role of mutant NaV1.1 in the development of FS. Furthermore, our data are strengthening previous findings obtained using transfected cells and recordings on human slices, demonstrating that diseased idNs represent a powerful tool for personalized therapy and ex vivo drug screening for human epileptic disorders.

Morano A, Cerulli Irelli E, Salamone EM, Orlando B, Fanella M, Tinelli E, Di Bonaventura C.  
**Late-onset seizures and epilepsy: Electroclinical features suggestive of autoimmune etiology.**  
*Frontiers in Neurology*, 13, 924859. doi:10.3389/fneur.2022.924859

Introduction: Late-onset epilepsy (LOE) has recently become a topic of intense research. Besides stroke, tumors, and dementia, autoimmune encephalitis (AE) has emerged as another possible cause of recurrent seizures in the elderly, and may account for a proportion of cases of LOE of unknown origin (LOEUO). This 24-h ambulatory electroencephalography (AEEG)-based study compared patients with LOEUO and AE to identify features suggestive of immune-mediated seizures in the elderly.

**Materials and methods:** We retrospectively reviewed 232 AEEG examinations performed in patients over 55 years with  $\geq 6$ -month follow-up, and selected 21 subjects with AE and 25 subjects with LOEUO. Clinical charts and AEEG recordings were carefully analyzed.

**Results:** Twenty-five patients with LOEUO (12 women, mean age at onset 67.9 years) and 21 AE subjects (8 women, mean age at onset 65.7 years) were enrolled. High-frequency seizures were reported in 20/21 AE and 7/25 LOEUO cases ( $p < 0.00001$ ). Focal aware seizures were more common in AE (14/21 vs. 6/25,  $p = 0.00058$ ), whereas "isolated" focal-to-bilateral tonic-clonic seizures occurred in 5/25 patients with LOEUO only ( $p = 0.053$ ). AE subjects reported ictal autonomic manifestations more frequently ( $p = 0.0033$ ). Three-hundred-seventy and 24 seizures were recorded in 13/21 patients with AE and 3/25 patients with LOEUO, respectively ( $p = 0.0006$ ). Interictal epileptiform discharges were observed in 70% of both groups, but their sleep activation was more common in AE ( $p = 0.06$ ).

**Conclusion:** Our study shows that high-frequency focal seizures with autonomic manifestations should raise the suspicion of AE in the elderly with new-onset seizures. It also highlights the relevant contribution of AEEG, which might reduce the diagnostic delay and provide useful clues to recognize AE.

Mikroulis A, Ledri M, Ruffolo G, Palma E, Sperk G, Dalli J, Kokaia M.

**Lipid mediator n-3 docosapentaenoic acid-derived protectin D1 enhances synaptic inhibition of hippocampal principal neurons by interaction with a G-protein-coupled receptor.**

FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 36(3), e22203. doi:10.1096/fj.202101815R

Epilepsy is a severe neurological disease manifested by spontaneous recurrent seizures due to abnormal hyper-synchronization of neuronal activity. Epilepsy affects about 1% of the population and up to 40% of patients experience seizures that are resistant to currently available drugs, thus highlighting an urgent need for novel treatments. In this regard, anti-inflammatory drugs emerged as potential therapeutic candidates. In particular, specific molecules apt to resolve the neuroinflammatory response occurring in acquired epilepsies have been proven to counteract seizures in experimental models, and humans. One candidate investigational molecule has been recently identified as the lipid mediator n-3 docosapentaenoic acid-derived protectin D1 (PD1n-3DPA) which significantly reduced seizures, cell loss, and cognitive deficit in a mouse model of acquired epilepsy. However, the mechanisms that mediate the PD1n-3DPA effect remain elusive. We here addressed whether PD1n-3DPA has direct effects on neuronal activity independent of its anti-inflammatory action. We incubated, therefore, hippocampal slices with PD1n-3DPA and investigated its effect on excitatory and inhibitory synaptic inputs to the CA1 pyramidal neurons. We demonstrate that inhibitory drive onto the perisomatic region of the pyramidal neurons is increased by PD1n-3DPA, and this effect is mediated by pertussis toxin-sensitive G-protein coupled receptors. Our data indicate that PD1n-3DPA acts directly on inhibitory transmission, most likely at the presynaptic site of inhibitory synapses as also supported by *Xenopus* oocytes and immunohistochemical experiments. Thus, in addition to its anti-inflammatory effects, PD1n-3DPA anti-seizure and neuroprotective effects may be mediated by its direct action on neuronal excitability by modulating their synaptic inputs.

Morano A, Cerulli Irelli E, Fanella M, Orlando B, Salamone EM, Tinelli E, Di Bonaventura C.

**Olfactory impairment in autoimmune encephalitis: another piece of the puzzle.**

*Journal of Neurology*, 269(5), 2762–2768. doi:10.1007/s00415-022-10959-6

**Background:** Despite being long neglected, olfaction has recently become a focus of intense research in neuroscience, as smell impairment has been consistently documented in both neurodegenerative and neuroinflammatory diseases. Considering the close anatomic-functional correlations between the limbic system and the central olfactory structures, we investigated olfaction in a population of patients with autoimmune encephalitis (AE).

**Methods:** Nineteen adult subjects (14 males, median age 64 years) diagnosed with definite (14/19) or possible (5/19) AE and followed for  $\geq 6$  months were enrolled. The Brief Smell Identification Test (B-SIT), a 12-item, forced-choice, scratch-and-sniff measure, was used to assess the patients' olfactory function in

comparison with a group of sex- and age-matched healthy controls (HC). According to the B-SIT score, subjects were classified as anosmic (< 6), hyposmic (6-8) and normal ( $\geq 9$ ). Electro-clinical, laboratory and neuroimaging findings were reviewed.

Results: Smell impairment was revealed in 15/19 patients (9 hyposmic, 6 anosmic), compared with 5/19 HC ( $p = 0.0029$ ). Age, gender and smoking habits did not affect the participants' performance at B-SIT. Olfactory dysfunction appeared more common among patients with definite AE ( $p = 0.0374$ ), regardless of autoantibody status. Subjects with higher modified Rankin Scale (mRS) scores at AE onset more likely presented hyposmia/anosmia ( $p = 0.033$ ), and so did those with bilateral ictal/interictal EEG abnormalities ( $p = 0.006$ ).

Conclusions: We found olfaction to be impaired in a significantly large proportion of AE cases. Smell deficits appeared more common in subjects with severe AE (as indicated by both definite diagnosis and higher mRS score), and might represent an additional feature of immune-mediated encephalitis.

Alfano V, Romagnolo A, Mills JD, Cifelli P, Gaeta A, Morano A, Ruffolo G.

### **Unexpected effect of IL-1 $\beta$ on the function of GABA<sub>A</sub> receptors in pediatric focal cortical dysplasia.**

*Brain Sciences*, 12(6), 807. doi:10.3390/brainsci12060807

Focal cortical dysplasia (FCD) type II is an epileptogenic malformation of the neocortex, as well as a leading cause of drug-resistant focal epilepsy in children and young adults. The synaptic dysfunctions leading to intractable seizures in this disease appear to have a tight relationship with the immaturity of GABAergic neurotransmission. The likely outcome would include hyperpolarizing responses upon activation of GABA<sub>A</sub>Rs. In addition, it is well-established that neuroinflammation plays a relevant role in the pathogenesis of FCD type II. Here, we investigated whether IL-1 $\beta$ , a prototypical pro-inflammatory cytokine, can influence GABAergic neurotransmission in FCD brain tissues. To this purpose, we carried out electrophysiological recordings on *Xenopus* oocytes transplanted with human tissues and performed a transcriptomics analysis. We found that IL-1 $\beta$  decreases the GABA currents amplitude in tissue samples from adult individuals, while it potentiates GABA responses in samples from pediatric cases. Interestingly, these cases of pediatric FCD were characterized by a more depolarized EGABA and an altered transcriptomics profile, that revealed an up-regulation of chloride cotransporter NKCC1 and IL-1 $\beta$ . Altogether, these results suggest that the neuroinflammatory processes and altered chloride homeostasis can contribute together to increase the brain excitability underlying the occurrence of seizures in these children.

Marzolla V, Infante M, Armani A, Rizzo M & Caprio M.

### **Efficacy and safety of finerenone for treatment of diabetic kidney disease: current knowledge and future perspective.**

*Expert Opinion on Drug Safety*, 21(9), 1161–1170. doi:10.1080/14740338.2022.2130889

Introduction: Diabetic kidney disease (DKD) represents a leading cause of morbidity and mortality in subjects with diabetes and develops in more than one third of diabetic patients. Steroidal mineralocorticoid receptor antagonists (MRAs - eplerenone and spironolactone) reduce mortality in patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF). However, in clinical practice the use of steroidal MRAs is limited by the significant risk of hyperkalemia, especially in patients with impaired renal function. Finerenone, a novel nonsteroidal MRA, shows a higher selectivity and binding affinity for mineralocorticoid receptor (MR) compared to steroidal MRAs and has been shown to reduce chronic kidney disease (CKD) progression and cardiovascular mortality in patients with CKD and T2DM.

Areas covered: This review summarizes the current evidence on efficacy and safety of finerenone in the treatment of patients with CKD and T2DM, and discusses its mechanisms of action investigated in preclinical studies.

Expert opinion: Pharmacological properties of finerenone and its unique tissue distribution are responsible for a lower risk of hyperkalemia. Therefore, finerenone represents a valuable therapeutic tool in patients

with CKD/diabetic kidney disease (DKD). Recent studies have shown that finerenone delays the progression of CKD and reduce cardiovascular events in patients with DKD, highlighting its safety and efficacy in this high-risk population.

Conte C, Camajani E, Lai A & Caprio M.

**Review of Not all very-low-carbohydrate diets are created equal.**

*Diabetologia*, 66(9), 1752–1753. doi:10.1007/s00125-023-05961-0

Ilari S, Proietti S, Russo P, Malafoglia V, Gliozzi M, Maiuolo J, Muscoli C.

**A systematic review and meta-analysis on the role of nutraceuticals in the management of neuropathic pain in in vivo studies.**

*Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 11(12). doi:10.3390/antiox11122361

The control of neuropathic pain is a leading challenge in modern medicine. Traditional medicine has, for a long time, used natural compounds such as nutraceuticals for this purpose, and extensive evidence has supported their role in controlling oxidative stress and persistent pain-related inflammation. Nutraceuticals are natural products belonging to the food sector whose consumption could be related to physiological benefits. Indeed, they are used to improve health, prevent chronic diseases, and delay the aging process. Here, we report a systematic review and meta-analysis to provide a more comprehensive report on the use of nutraceuticals in neuropathic pain, including evaluating confounding factors. A search of the literature has been conducted on principal databases (PubMed, MEDLINE, EMBASE, and Web of Science) following the PRISMA statement, and we retrieved 484 articles, 12 of which were selected for the meta-analysis. The results showed that administration of natural drugs in animals with neuropathic pain led to a significant reduction in thermal hyperalgesia, measured in both the injured paw (SMD: 1.79; 95% CI: 1.41 to 2.17;  $p < 0.0001$ ) and in the two paws (SMD: -1.74; 95% CI: -3.36 to -0.11;  $p = 0.036$ ), as well as a reduction in mechanical allodynia and hyperalgesia (SMD: 1.95, 95% CI: 1.08 to 2.82;  $p < 0.001$ ) when compared to controls. The results of the review indicate that nutraceutical compounds could be clinically relevant for managing persistent neuropathic pain.

Maiuolo J, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C, Scarano F, Nucera S, Mollace V.

**Involvement of the intestinal Microbiota in the appearance of multiple sclerosis: Aloe vera and citrus bergamia as potential candidates for intestinal health.**

*Nutrients*, 14(13), 2711. doi:10.3390/nu14132711

Multiple sclerosis (MS) is a neurological and inflammatory autoimmune disease of the Central Nervous System in which selective activation of T and B lymphocytes prompts a reaction against myelin, inducing demyelination and axonal loss. Although MS is recognized to be an autoimmune pathology, the specific causes are many; thus, to date, it has been considered a disorder resulting from environmental factors in genetically susceptible individuals. Among the environmental factors hypothetically involved in MS, nutrition seems to be well related, although the role of nutritional factors is still unclear. The gut of mammals is home to a bacterial community of about 2000 species known as the "microbiota", whose composition changes throughout the life of each individual. There are five bacterial phylas that make up the microbiota in healthy adults: Firmicutes (79.4%), Bacteroidetes (16.9%), Actinobacteria (2.5%), Proteobacteria (1%) and Verrucomicrobia (0.1%). The diversity and abundance of microbial populations justifies a condition known as eubiosis. On the contrary, the state of dysbiosis refers to altered diversity and abundance of the microbiota. Many studies carried out in the last few years have demonstrated that there is a relationship between the intestinal microflora and the progression of multiple sclerosis. This correlation was also demonstrated by the discovery that patients with MS, treated with specific prebiotics and probiotics, have greatly increased bacterial diversity in the intestinal microbiota, which might be otherwise reduced or absent. In particular, natural extracts of Aloe vera and bergamot fruits, rich in polyphenols and with a high percentage of polysaccharides (mostly found in indigestible and fermentable fibers), appear to

be potential candidates to re-equilibrate the gut microbiota in MS patients. The present review article aims to assess the pathophysiological mechanisms that reveal the role of the microbiota in the development of MS. In addition, the potential for supplementing patients undergoing early stages of MS with Aloe vera as well as bergamot fibers, on top of conventional drug treatments, is discussed.

Ilari S, Passacatini LC, Malafoglia V, Oppedisano F, Maiuolo J, Gliozzi M, Muscoli C.

**Tantali fibromyalgic supplicium: Is there any relief with the antidepressant employment? A systematic review.**

*Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 186(106547), 106547. doi:10.1016/j.phrs.2022.106547

Widespread musculoskeletal pain characterizes fibromyalgia (FM), accompanied by sleep, fatigue, and mood problems. Chronic stress and depression play a crucial role in the etiology and pathophysiology of FM. They may contribute to a dysregulation of the central pain mechanisms together with the neuroendocrine and immune systems. Pharmacological treatments are the first-line therapy to reduce the symptoms of FM. The US Food and Drug Administration (FDA) indicated gabapentinoid, pregabalin, duloxetine, and milnacipran for adult patients. An alternative approach is widely used, based on therapies including interventions in patient education, behavioral therapy, exercise, pain management, and a healthy diet. A systematic search was performed on PubMed, MEDLINE, EMBASE, and Web of Science databases. The authors established the selection, inclusion, and exclusion criteria. We found a total of 908 articles. This systematic review will include ten articles selected after excluding duplicates and reading the abstracts and full texts. All studies related the effect of drugs to various symptoms caused by fibromyalgia patients with depression, such as insomnia/sleepiness, depression, suicide, difficulty walking/working, pain, fatigue, and nervousness. Although, we concluded that antidepressant drugs are effective in treating depression and pain in fibromyalgia, further studies are needed to understand the etiology of this disease and to find a combination of therapies to increase tolerability and adherence of the patient to the drug, decreasing the adverse effects.

Maiuolo J, Musolino V, Gliozzi M, Carresi C, Oppedisano F, Nucera S, Mollace V.

**The employment of genera Vaccinium, Citrus, Olea, and Cynara polyphenols for the reduction of selected anti-cancer drug side effects.**

*Nutrients*, 14(8), 1574. doi:10.3390/nu14081574

Cancer is one of the most widespread diseases globally and one of the leading causes of death. Known cancer treatments are chemotherapy, surgery, radiation therapy, targeted hormonal therapy, or a combination of these methods. Antitumor drugs, with different mechanisms, interfere with cancer growth by destroying cancer cells. However, anticancer drugs are dangerous, as they significantly affect both cancer cells and healthy cells. In addition, there may be the onset of systemic side effects perceived and mutagenicity, teratogenicity, and further carcinogenicity. Many polyphenolic extracts, taken on top of common anti-tumor drugs, can participate in the anti-proliferative effect of drugs and significantly reduce the side effects developed. This review aims to discuss the current scientific knowledge of the protective effects of polyphenols of the genera Vaccinium, Citrus, Olea, and Cynara on the side effects induced by four known chemotherapy, Cisplatin, Doxorubicin, Tamoxifen, and Paclitaxel. In particular, the summarized data will help to understand whether polyphenols can be used as adjuvants in cancer therapy, although further clinical trials will provide crucial information.

Laboy Cintron D, Muir AM, Scott A, McDonald M, Monaghan KG, Santiago-Sim T, Mefford HC.

**A recurrent, de novo pathogenic variant in ARPC4 disrupts actin filament formation and causes microcephaly and speech delay.**

*HGG Advances*, 3(1), 100072. doi:10.1016/j.xhgg.2021.100072

We report seven affected individuals from six families with a recurrent, de novo variant in the ARPC4 gene (c.472C>T [p.Arg158Cys (GenBank: NM\_005718.4)]). Core features in affected individuals include microcephaly, mild motor delays, and significant speech impairment. ARPC4 is a core subunit of the actin-related protein (ARP2/3) complex, which catalyzes the formation of F-actin networks. We show that the recurrent ARPC4 missense change is associated with a decreased amount of F-actin in cells from two affected individuals. Taken together, our results implicate heterozygous ARPC4 missense variants as a cause of neurodevelopmental disorders and microcephaly.

Asif M, Kaygusuz E, Shinawi M, Nickelsen A, Hsieh T-C, Wagle P, Hussain MS.

**De novo variants of CSNK2B cause a new intellectual disability-craniodigital syndrome by disrupting the canonical Wnt signaling pathway.**

*HGG Advances*, 3(3), 100111. doi:10.1016/j.xhgg.2022.100111

CSNK2B encodes for casein kinase II subunit beta (CK2 $\beta$ ), the regulatory subunit of casein kinase II (CK2), which is known to mediate diverse cellular pathways. Variants in this gene have been recently identified as a cause of Poirier-Bienvenu neurodevelopmental syndrome (POBINDS), but functional evidence is sparse. Here, we report five unrelated individuals: two of them manifesting POBINDS, while three are identified to segregate a new intellectual disability-craniodigital syndrome (IDCS), distinct from POBINDS. The three IDCS individuals carried two different de novo missense variants affecting the same codon of CSNK2B. Both variants, NP\_001311.3; p.Asp32His and NP\_001311.3; p.Asp32Asn, lead to an upregulation of CSNK2B expression at transcript and protein level, along with global dysregulation of canonical Wnt signaling. We found impaired interaction of the two key players DVL3 and  $\beta$ -catenin with mutated CK2 $\beta$ . The variants compromise the kinase activity of CK2 as evident by a marked reduction of phosphorylated  $\beta$ -catenin and consequent absence of active  $\beta$ -catenin inside nuclei of the patient-derived lymphoblastoid cell lines (LCLs). In line with these findings, whole-transcriptome profiling of patient-derived LCLs harboring the NP\_001311.3; p.Asp32His variant confirmed a marked difference in expression of genes involved in the Wnt signaling pathway. In addition, whole-phosphoproteome analysis of the LCLs of the same subject showed absence of phosphorylation for 313 putative CK2 substrates, enriched in the regulation of nuclear  $\beta$ -catenin and transcription of the target genes. Our findings suggest that discrete variants in CSNK2B cause dominant-negative perturbation of the canonical Wnt signaling pathway, leading to a new craniodigital syndrome distinguishable from POBINDS.

Hirsch N, Dahan I, D'haene E, Avni M, Vergult S, Vidal-García M, Birnbaum RY.

**HDAC9 structural variants disrupting TWIST1 transcriptional regulation lead to craniofacial and limb malformations.**

*Genome Research*, 32(7), 1242–1253. doi:10.1101/gr.276196.121

Structural variants (SVs) can affect protein-coding sequences as well as gene regulatory elements. However, SVs disrupting protein-coding sequences that also function as cis-regulatory elements remain largely uncharacterized. Here, we show that craniosynostosis patients with SVs containing the histone deacetylase 9 (HDAC9) protein-coding sequence are associated with disruption of TWIST1 regulatory elements that reside within the HDAC9 sequence. Based on SVs within the HDAC9-TWIST1 locus, we defined the 3'-HDAC9 sequence as a critical TWIST1 regulatory region, encompassing craniofacial TWIST1 enhancers and CTCF sites. Deletions of either Twist1 enhancers (eTw5-7 $\Delta/\Delta$ ) or CTCF site (CTCF-5 $\Delta/\Delta$ ) within the Hdac9 protein-coding sequence led to decreased Twist1 expression and altered anterior/posterior limb expression patterns of SHH pathway genes. This decreased Twist1 expression results in a smaller sized and asymmetric skull and polydactyly that resembles Twist1 $\pm$  mouse phenotype. Chromatin conformation analysis revealed that the Twist1 promoter interacts with Hdac9 sequences that encompass Twist1 enhancers and a CTCF site, and that interactions depended on the presence of both regulatory regions. Finally, a large inversion of the entire Hdac9 sequence (Hdac9 INV/+) in mice that does not disrupt Hdac9 expression but repositions Twist1 regulatory elements showed decreased Twist1 expression and led to a craniosynostosis-like phenotype and polydactyly. Thus, our study elucidates essential components of TWIST1 transcriptional



machinery that reside within the HDAC9 sequence. It suggests that SVs encompassing protein-coding sequences could lead to a phenotype that is not attributed to its protein function but rather to a disruption of the transcriptional regulation of a nearby gene.

Fortugno P, Monetta R, Belli M, Botti E, Angelucci F, Palmerini MG, Brancati F.

**RIPK4 regulates cell-cell adhesion in epidermal development and homeostasis.**

*Human Molecular Genetics*, 31(15), 2535–2547. doi:10.1093/hmg/ddac046

Epidermal development and maintenance are finely regulated events requiring a strict balance between proliferation and differentiation. Alterations in these processes give rise to human disorders such as cancer or syndromes with skin and annexes defects, known as ectodermal dysplasias (EDs). Here, we studied the functional effects of two novel receptor-interacting protein kinase 4 (RIPK4) missense mutations identified in siblings with an autosomal recessive ED with cutaneous syndactyly, palmoplantar hyperkeratosis and orofacial synechia. Clinical overlap with distinct EDs caused by mutations in transcription factors (i.e. p63 and interferon regulatory factor 6, IRF6) or nectin adhesion molecules was noticed. Impaired activity of the RIPK4 kinase resulted both in altered epithelial differentiation and defective cell adhesion. We showed that mutant RIPK4 resulted in loss of PVRL4/nectin-4 expression in patient epidermis and primary keratinocytes, and demonstrated that PVRL4 is transcriptionally regulated by IRF6, a RIPK4 phosphorylation target. In addition, defective RIPK4 altered desmosome morphology through modulation of plakophilin-1 and desmoplakin. In conclusion, this work implicates RIPK4 kinase function in the p63-IRF6 regulatory loop that controls the proliferation/differentiation switch and cell adhesion, with implications in ectodermal development and cancer.

Parenti I, Leitão E, Kuechler A, Villard L, Goizet C, Courdier C, Depienne C. ....Brancati F.

**The different clinical facets of SYN1-related neurodevelopmental disorders.**

*Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 1019715. doi:10.3389/fcell.2022.1019715

Synapsin-I (SYN1) is a presynaptic phosphoprotein crucial for synaptogenesis and synaptic plasticity. Pathogenic SYN1 variants are associated with variable X-linked neurodevelopmental disorders mainly affecting males. In this study, we expand on the clinical and molecular spectrum of the SYN1-related neurodevelopmental disorders by describing 31 novel individuals harboring 22 different SYN1 variants. We analyzed newly identified as well as previously reported individuals in order to define the frequency of key features associated with these disorders. Specifically, behavioral disturbances such as autism spectrum disorder or attention deficit hyperactivity disorder are observed in 91% of the individuals, epilepsy in 82%, intellectual disability in 77%, and developmental delay in 70%. Seizure types mainly include tonic-clonic or focal seizures with impaired awareness. The presence of reflex seizures is one of the most representative clinical manifestations related to SYN1. In more than half of the cases, seizures are triggered by contact with water, but other triggers are also frequently reported, including rubbing with a towel, fever, toothbrushing, fingernail clipping, falling asleep, and watching others showering or bathing. We additionally describe hyperpnea, emotion, lighting, using a stroboscope, digestive troubles, and defecation as possible triggers in individuals with SYN1 variants. The molecular spectrum of SYN1 variants is broad and encompasses truncating variants (frameshift, nonsense, splicing and start-loss variants) as well as non-truncating variants (missense substitutions and in-frame duplications). Genotype-phenotype correlation revealed that epileptic phenotypes are enriched in individuals with truncating variants. Furthermore, we could show for the first time that individuals with early seizures onset tend to present with severe-to-profound intellectual disability, hence highlighting the existence of an association between early seizure onset and more severe impairment of cognitive functions. Altogether, we present a detailed clinical description of the largest series of individuals with SYN1 variants reported so far and provide the first genotype-phenotype correlations for this gene. A timely molecular diagnosis and genetic counseling are cardinal for appropriate patient management and treatment.

Romano S, Romano C, Peconi M, Fiore A, Bellucci G, Morena E, Ristori, G.....Mechelli R. (2022).

### **Circulating U13 small nucleolar RNA as a potential biomarker in Huntington's disease: A pilot study.**

International Journal of Molecular Sciences, 23(20), 12440. doi:10.3390/ijms232012440

Plasma small RNAs have been recently explored as biomarkers in Huntington's disease (HD). We performed an exploratory study on nine HD patients, eight healthy subjects (HS), and five psychiatric patients (PP; to control for iatrogenic confounder effects) through an Affymetrix-Gene-Chip-miRNA-Array. We validated the results in an independent population of 23 HD, 15 pre-HD, 24 PP, 28 Alzheimer's disease (AD) patients (to control the disease-specificity) and 22 HS through real-time PCR. The microarray results showed higher levels of U13 small nucleolar RNA (SNORD13) in HD patients than controls (fold change 1.54,  $p = 0.003$  HD vs. HS, and 1.44,  $p = 0.0026$  HD vs. PP). In the validation population, a significant increase emerged with respect to both pre-HD and the control groups ( $p < 0.0001$ ). SNORD13 correlated with the status of the mutant huntingtin carrier ( $r = 0.73$ ;  $p < 0.001$ ) and the disease duration ( $r = 0.59$ ;  $p = 0.003$ ). The receiver operating characteristic (ROC) curve analysis showed the high accuracy of SNORD13 in discriminating HD patients from other groups (AUC = 0.963). An interactome and pathway analysis on SNORD13 revealed enrichments for factors relevant to HD pathogenesis. We report the unprecedented finding of a potential disease-specific role of SNORD13 in HD. It seems to peripherally report a 'tipping point' in the pathogenic cascade at the neuronal level.

Alborghetti M, Bellucci G, Gentile A, Calderoni C, Nicoletti F, Capra R, Salvetti M, Centonze, D.

### **Drugs used in the treatment of multiple sclerosis during COVID-19 pandemic: A critical viewpoint.**

*Current Neuropharmacology*, 20(1), 107–125. doi:10.2174/1570159X19666210330094017

Since COVID-19 has emerged as a world public health problem, attention has been focused on how immune-suppressive drugs used for the treatment of autoimmune disorders influence the risk for SARS-CoV-2 infection and the development of acute respiratory distress syndrome (ARDS). Here, we discuss the disease-modifying agents approved for the treatment of multiple sclerosis (MS) within this context. Interferon (IFN)- $\beta$ 1a and -1b, which display antiviral activity, could be protective in the early stage of COVID-19 infection, although SARS-CoV-2 may have developed resistance to IFNs. However, in the hyperinflammation stage, IFNs may become detrimental by facilitating macrophage invasion in the lung and other organs. Glatiramer acetate and its analogues should not interfere with the development of COVID-19 and may be considered safe. Teriflunomide, a first-line oral drug used in the treatment of relapsing-remitting MS (RRMS), may display antiviral activity by depleting cellular nucleotides necessary for viral replication. The other first-line drug, dimethyl fumarate, may afford protection against SARS-CoV-2 by activating the Nrf-2 pathway and reinforcing the cellular defenses against oxidative stress. Concern has been raised regarding the use of second-line treatments for MS during the COVID-19 pandemic. However, this concern is not always justified. For example, fingolimod might be highly beneficial during the hyperinflammatory stage of COVID-19 for a number of mechanisms, including the reinforcement of the endothelial barrier. Caution is suggested for the use of natalizumab, cladribine, alemtuzumab, and ocrelizumab, although MS disease recurrence after discontinuation of these drugs may overcome a potential risk for COVID-19 infection.

Musella A, Centonze D.

### **Electrophysiology of endocannabinoid signaling.**

*Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2576, 461–475. doi:10.1007/978-1-0716-2728-0\_38

Electrophysiological technique is an efficient tool for investigating the synaptic regulatory effects mediated by the endocannabinoid system. Stimulation of presynaptic type 1 cannabinoid receptor (CB1) is the principal mode by which endocannabinoids suppress transmitter release in the central nervous system, but a non-retrograde manner of functioning and other receptors have also been described. Endocannabinoids are key modulators of both short- and long-term plasticity. Here, we discuss ex vivo electrophysiological

approaches to examine synaptic signaling induced by cannabinoid and endocannabinoid molecules in the mammalian brain.

Gilio L , Buttari F, Pavone L, Iezzi E, Galifi G, Dolcetti E, Azzolini F, Bruno A, Borrelli A, Storto M, Furlan R, Finardi A, Pekmezovic A, Drulovic J, Mandolesi G, Freseigna D, Vanni V, Centonze D, Stampanoni Bassi M.

**Fatigue in multiple sclerosis is associated with reduced expression of interleukin-10 and worse prospective disease activity.**

*Biomedicines*, 10(9), 2058. doi:10.3390/biomedicines10092058

In multiple sclerosis (MS), fatigue is a frequent symptom that negatively affects quality of life. The pathogenesis of fatigue is multifactorial and inflammation may play a specific role. To explore the association between fatigue, central inflammation and disease course in MS in 106 relapsing-remitting (RR)-MS patients, clinical characteristics, including fatigue and mood, were explored at the time of diagnosis. NEDA (no evidence of disease activity)-3 status after one-year follow up was calculated. Cerebrospinal fluid (CSF) levels of a set of proinflammatory and anti-inflammatory molecules and peripheral blood markers of inflammation were also analyzed. MRI structural measures were explored in 35 patients. A significant negative correlation was found at diagnosis between fatigue measured with the Modified Fatigue Impact Scale (MFIS) and the CSF levels of interleukin (IL)-10. Conversely, no significant associations were found with peripheral markers of inflammation. Higher MFIS scores were associated with reduced probability to reach NEDA-3 status after 1-year follow up. Finally, T2 lesion load showed a positive correlation with MFIS scores and a negative correlation with CSF IL-10 levels at diagnosis. CSF inflammation, and particularly the reduced expression of the anti-inflammatory molecule IL-10, may exacerbate fatigue. Fatigue in MS may reflect subclinical CSF inflammation, predisposing to greater disease activity.

Bruno A, Dolcetti E, Azzolini F, Moscatelli A, Gambardella S, Ferese R, Rizzo FR, Gilio L, Iezzi E, Galifi G, Borrelli A, Buttari F, Furlan R, Finardi A, De Vito F, Musella A, Guadalupi L, Mandolesi G, Centonze D, Stampanoni Bassi M.

**Interleukin 6 SNP rs1818879 regulates radiological and inflammatory activity in multiple sclerosis.**

*Genes*, 13(5). doi:10.3390/genes13050897

Background: The clinical course of multiple sclerosis (MS) is critically influenced by the expression of different pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Interleukin 6 (IL-6) represents a major inflammatory molecule previously associated with exacerbated disease activity in relapsing remitting MS (RR-MS); however, the role of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the IL-6 gene has not been fully elucidated in MS. (2) Methods: We explored in a cohort of 171 RR-MS patients, at the time of diagnosis, the associations between four IL-6 SNPs (rs1818879, rs1554606, rs1800797, and rs1474347), CSF inflammation, and clinical presentation. (3) Results: Using principal component analysis and logistic regression analysis we identified an association between rs1818879, radiological activity, and a set of cytokines, including the IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-10, and IL-13. No significant associations were found between other SNPs and clinical or inflammatory parameters. (4) Conclusions: The association between the rs1818879 polymorphism and subclinical neuroinflammatory activity suggests that interindividual differences in the IL-6 gene might influence the immune activation profile in MS.

Sciarretta F, Ceci V, Tiberi M, Zaccaria F, Li H, Zhou ZY, Sun Q, Konja D, Matteocci A, Bhusal A, Verri M, Freseigna D, Balletta S, Ninni A, Di Biagio C, Rosina M, Suk K, Centonze D, Wang Y, Chiurchiù V, Aquilano K, Lettieri-Barbato D.

**Lipocalin-2 promotes adipose-macrophage interactions to shape peripheral and central inflammatory responses in experimental autoimmune encephalomyelitis.**

*Molecular Metabolism*, 76(101783), 101783. doi:10.1016/j.molmet.2023.101783

**Objective:** Accumulating evidence suggests that dysfunctional adipose tissue (AT) plays a major role in the risk of developing multiple sclerosis (MS), the most common immune-mediated and demyelinating disease of the central nervous system. However, the contribution of adipose tissue to the etiology and progression of MS is still obscure. This study aimed at deciphering the responses of AT in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the best characterized animal model of MS.

**Results and methods:** We observed a significant AT loss in EAE mice at the onset of disease, with a significant infiltration of M1-like macrophages and fibrosis in the AT, resembling a cachectic phenotype. Through an integrative and multilayered approach, we identified lipocalin2 (LCN2) as the key molecule released by dysfunctional adipocytes through redox-dependent mechanism. Adipose-derived LCN2 shapes the pro-inflammatory macrophage phenotype, and the genetic deficiency of LCN2 specifically in AT reduced weight loss as well as inflammatory macrophage infiltration in spinal cord in EAE mice. Mature adipocytes downregulating LCN2 reduced lipolytic response to inflammatory stimuli (e.g. TNF $\alpha$ ) through an ATGL-mediated mechanism.

**Conclusions:** Overall data highlighted a role LCN2 in exacerbating inflammatory phenotype in EAE model, suggesting a pathogenic role of dysfunctional AT in MS.

Umeton R, Bellucci G, Bigi R, Romano S, Buscarinu MC, Reniè R, Rinaldi V, Pizzolato, Umeton, Morena M, Romano C, Mechelli R, Salvetti M, Ristori G.

**Multiple sclerosis genetic and non-genetic factors interact through the transient transcriptome.**

*Scientific Reports*, 12(1), 7536. doi:10.1038/s41598-022-11444-w

A clinically actionable understanding of multiple sclerosis (MS) etiology goes through GWAS interpretation, prompting research on new gene regulatory models. Our previous investigations suggested heterogeneity in etiology components and stochasticity in the interaction between genetic and non-genetic factors. To find a unifying model for this evidence, we focused on the recently mapped transient transcriptome (TT), that is mostly coded by intergenic and intronic regions, with half-life of minutes. Through a colocalization analysis, here we demonstrate that genomic regions coding for the TT are significantly enriched for MS-associated GWAS variants and DNA binding sites for molecular transducers mediating putative, non-genetic, determinants of MS (vitamin D deficiency, Epstein Barr virus latent infection, B cell dysfunction), indicating TT-coding regions as MS etiopathogenetic hotspots. Future research comparing cell-specific transient and stable transcriptomes may clarify the interplay between genetic variability and non-genetic factors causing MS. To this purpose, our colocalization analysis provides a freely available data resource at [www.mscoloc.com](http://www.mscoloc.com).

Azzolini F, Gilio L, Pavone L, Iezzi E, Dolcetti E, Bruno A, Buttari F, Musella A, Mandolesi G, Guadalupi L, Furlan R, Finardi A, Micillo T, Carbone F, Matarese G, Centonze D, Stampanoni Bassi M.

**Neuroinflammation is associated with GFAP and sTREM2 levels in multiple sclerosis.**

*Biomolecules*, 12(2), 222. doi:10.3390/biom12020222

**Background:** Astrocytes and microglia play an important role in the inflammatory process of multiple sclerosis (MS). We investigated the associations between the cerebrospinal fluid (CSF) levels of glial fibrillary acid protein (GFAP) and soluble triggering receptors expressed on myeloid cells-2 (sTREM-2), inflammatory molecules, and clinical characteristics in a group of patients with relapsing-remitting MS (RRMS). **Methods:** Fifty-one RRMS patients participated in the study. Clinical evaluation and CSF collection were performed at the time of diagnosis. The CSF levels of GFAP, sTREM-2, and of a large set of inflammatory and anti-inflammatory molecules were determined. MRI structural measures (cortical thickness, T2 lesion load, cerebellar volume) were examined. **Results:** The CSF levels of GFAP and sTREM-2 showed significant correlations with inflammatory cytokines IL-8, G-CSF, and IL-5. Both GFAP and sTREM-2 CSF levels positively correlated with age at diagnosis. GFAP was also higher in male MS patients, and was associated with an increased risk of MS progression, as evidenced by higher BREMS at the onset. Finally, a

negative association was found between GFAP CSF levels and cerebellar volume in RRMS at diagnosis. Conclusions: GFAP and sTREM-2 represent suitable biomarkers of central inflammation in MS. Our results suggest that enhanced CSF expression of GFAP may characterize patients with a higher risk of progression.

Gilio L, Fresegha D, Gentile A, Guadalupi L, Sanna K, De Vito F, ... Stampanoni Bassi, M. (2022).

**Preventive exercise attenuates IL-2-driven mood disorders in multiple sclerosis.**

*Neurobiology of Disease*, 172(105817), 105817. doi:10.1016/j.nbd.2022.105817

Background: Elevated levels of specific proinflammatory molecules in the cerebrospinal fluid (CSF) have been associated with disability progression, enhanced neurodegeneration and higher incidence of mood disorders in people with multiple sclerosis (MS). Studies in animal models of MS suggest that preventive exercise may play an immunomodulatory activity, with beneficial effects on both motor deficits and behavioral alterations. Here we explored the impact of lifestyle physical activity on clinical presentation and associated central inflammation in a large group of newly diagnosed patients with MS. Furthermore, we addressed the causal link between exercise-mediated immunomodulation and mood symptoms in the animal setting.

Methods: A cross-sectional study was conducted on 235 relapsing-remitting MS patients at the time of the diagnosis. Patients were divided into 3 groups ("sedentary", "lifestyle physical activity" and "exercise") according to the level of physical activity in the six months preceding the evaluation. Patients underwent clinical, neuropsychological and psychiatric evaluation, magnetic resonance imaging and lumbar puncture for diagnostic purposes. The CSF levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines were analyzed and compared with a group of 80 individuals with non-inflammatory and non-degenerative diseases. Behavioral and electrophysiological studies were carried out in control mice receiving intracerebral injection of IL-2 or vehicle. Behavior was also assessed in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), animal model of MS, reared in standard (sedentary group) or running wheel-equipped (exercise group) cages.

Results: In exercising MS patients, depression and anxiety were reduced compared to sedentary patients. The CSF levels of the interleukin-2 and 6 (IL-2, IL-6) were increased in MS patients compared with control individuals. In MS subjects exercise was associated with normalized CSF levels of IL-2. In EAE mice exercise started before disease onset reduced both behavioral alterations and striatal IL-2 expression. Notably, a causal role of IL-2 in mood disorders was shown. IL-2 administration in control healthy mice induced anxious- and depressive-like behaviors and impaired type-1 cannabinoid (CB1) receptor-mediated neurotransmission at GABAergic synapses, mimicking EAE-induced synaptic dysfunction.

Conclusions: Our results indicate an immunomodulatory effect of exercise in MS patients, associated with reduced CSF expression of IL-2, which might result in reduced mood disorders. These data suggest that exercise in the early stages may act as a disease-modifying therapy in MS although further longitudinal studies are needed to clarify this issue.

Dolcetti, E., Bruno, A., Azzolini, F., Gilio, L., Moscatelli, A., De Vito, F., ... Stampanoni Bassi, M. (2022).

**The BDNF Val66Met polymorphism (rs6265) modulates inflammation and neurodegeneration in the early phases of multiple sclerosis.**

*Genes*, 13(2), 332. doi:10.3390/genes13020332

Sarshar M, Scribano D, Limongi D, Zagaglia C, Palamara AT, Ambrosi C.

**Adaptive strategies of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: from growth in lab media to virulence during host cell adhesion.**

*International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 25(3), 481–494. doi:10.1007/s10123-022-00235-y

Urinary tract infections (UTIs) are a major concern in public health. The prevalent uropathogenic bacterium in healthcare settings is *Escherichia coli*. The increasing rate of antibiotic-resistant strains demands studies to understand *E. coli* pathogenesis to drive the development of new therapeutic approaches. This study compared the gene expression profile of selected target genes in the prototype uropathogenic *E. coli* (UPEC) strain CFT073 grown in Luria Bertani (LB), artificial urine (AU), and during adhesion to host bladder cells by semi-quantitative real-time PCR (RT-PCR) assays. AU effectively supported the growth of strain CFT073 as well as other *E. coli* strains with different lifestyles, thereby confirming the appropriateness of this medium for in vitro models. Unexpectedly, gene expression of strain CFT073 in LB and AU was quite similar; conversely, during the adhesion assay, adhesins and porins were upregulated, while key global regulators were downregulated with respect to lab media. Interestingly, *fimH* and *papGII* genes were significantly expressed in all tested conditions. Taken together, these results provide for the first time insights of the metabolic and pathogenic profile of strain CFT073 during the essential phase of host cell adhesion.

Brindisi G., Marazzato, M., Brunetti, F., De Castro, G., Loffredo, L., Carnevale, R., ... Zicari, A. M. (2022).

Brindisi G, Marazzato M, Brunetti F, De Castro G, Loffredo L, Carnevale R, Cinicola B, Palamara AT, Conte MP, Zicari AM.

**Allergic rhinitis, microbiota and passive smoke in children: A pilot study.**

*Pediatric Allergy and Immunology: Official Publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 33 Suppl 27(S27), 22–26. doi:10.1111/pai.13621

**Background:** Allergic rhinitis (AR) is one of the most common allergic diseases affecting children. Objective assessment of nasal obstruction is possible through active anterior rhinomanometry (AAR). Several factors, such as passive smoke exposure (PSE), are triggers for worsening nasal obstruction and chronic inflammation. PSE affects bacterial eubiosis in the upper respiratory tract. This study evaluates the influence of PSE and cotinine levels on both nasal obstruction and local microbiome composition in children with AR.

**Methods:** Fifty patients (aged between 6 and 16 years) with AR monosensitized grass pollen were enrolled. They underwent skin prick tests, a nasal swab to evaluate the microbial composition of the anterior nostrils, a basal AAR, a post-decongestion AAR, and spirometry. Serum cotinine levels were assessed to evaluate PSE.

**Results:** A significantly lower percentage of mean nasal flow (mNF%) was observed before and after hydrazine administration in subjects exposed to passive smoke (Exp group) compared with the non-exposed group. In contrast, higher cotinine levels were observed in the Exp group than in the controls. PSE has been associated with a decrease in biodiversity and a change in the nasal microbiome composition; instead, although to a different extent, the abundance of specific taxa resulted in being correlated to cotinine levels and nasal flow.

**Conclusion:** Children with AR exposed to passive smoke with positive serum cotinine could represent a risk factor for developing nasal obstruction and microbial dysbiosis, suggesting their possible role in pathophysiological processes.

Prezioso C., Passerini, S., Limongi, D., Palamara, A. T., Moens, U., & Pietropaolo, V. (2022).

**COS-7 and SVGp12 cellular models to study JCPyV replication and MicroRNA expression after infection with archetypal and rearranged-NCCR viral strains.**

*Viruses*, 14(9). doi:10.3390/v14092070

Since the non-coding control region (NCCR) and microRNA (miRNA) could represent two different and independent modalities of regulating JC polyomavirus (JCPyV) replication at the transcriptional and post-transcriptional levels, the interplay between JC viral load based on NCCR architecture and miRNA levels, following JCPyV infection with archetypal and rearranged (rr)-NCCR JCPyV variants, was explored in COS-7

and SVGp12 cells infected by different JCPyV strains. Specifically, the involvement of JCPyV miRNA in regulating viral replication was investigated for the archetypal CY strain-which is the transmissible form-and for the rearranged MAD-1 strain, which is the first isolated variant from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. The JCPyV DNA viral load was low in cells infected with CY compared with that in MAD-1-infected cells. Productive viral replication was observed in both cell lines. The expression of JCPyV miRNAs was observed from 3 days after viral infection in both cell types, and miR-J1-5p expression was inversely correlated with the JCPyV replication trend. The JCPyV miRNAs in the exosomes present in the supernatants produced by the infected cells could be carried into uninfected cells. Additional investigations of the expression of JCPyV miRNAs and their presence in exosomes are necessary to shed light on their regulatory role during viral reactivation.

Annino G, Manzi M, Alashram RA, Romagnoli C, Coniglio M, Lamouchideli N, Alfonso M, Perrone v, Limongi D, Padua E.

**COVID-19 as a potential cause of muscle injuries in professional Italian Serie A soccer players: A retrospective observational study.**

*International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(17), 11117. doi:10.3390/ijerph191711117

The COVID-19 pandemic has shocked the entire planet. The soccer world has also suffered major upheavals, and many professional soccer players have been infected with the virus. The aim of this study was to evaluate the incidence of injuries in Italian Serie A professional soccer players before and during the COVID-19 pandemic. Methods: We evaluated the incidence of muscle injuries between four competitive seasons of the Italian Serie A (2016-2017, 2017-2018, and 2018-2019 pre-COVID-19 vs. 2020/2021 post-COVID-19) in professional soccer players. Results: Significant differences were found in muscular injuries between the post-COVID-19 season and the previous seasons ( $p < 0.001$ ). The median split of the players' positivity duration was of 15 days. The players' long positivity (PLP) group showed a significant number of muscular injuries compared to the players' short positivity (PSP) group ( $p < 0.0014$ , ES = 0.81, Large). The total teams' days of positivity were significantly related to the total team number of muscular injuries ( $r = 0.86$ ; CI 95% 0.66 to 0.94;  $p < 0.0001$ ). In conclusion, this data showed that the competitive season post-COVID-19 lockdown has a higher incidence of muscle injuries in Italian Serie A soccer players compared to the pre-pandemic competitive season.

Passerini S, Prezioso C, Epifani AC, Sarmati L, Amdreoni M, Moens U, Pirtropaolo V, Ciotti M

**Detection analysis and study of genomic region variability of JCPyV, BKPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 and QPyV in the urine and plasma of HIV-1-infected patients.**

*Viruses*, 14(11), 2544. doi:10.3390/v14112544

Since it was clearly established that HIV/AIDS predisposes to the infection, persistence or reactivation of latent viruses, the prevalence of human polyomaviruses (HPyVs) among HIV-1-infected patients and a possible correlation between HPyVs and HIV sero-status were investigated. PCR was performed to detect and quantify JCPyV, BKPyV, MCPyV, HPyV6, HPyV7 and QPyV DNA in the urine and plasma samples of 103 HIV-1-infected patients. Subsequently, NCCR, VP1 and MCPyV LT sequences were examined. In addition, for MCPyV, the expression of transcripts for the LT gene was investigated. JCPyV, BKPyV and MCPyV's presence was reported, whereas HPyV6, HPyV7 and QPyV were not detected in any sample. Co-infection patterns of JCPyV, BKPyV and MCPyV were found. Archetype-like NCCRs were observed with some point mutations in plasma samples positive for JCPyV and BKPyV. The VP1 region was found to be highly conserved among these subjects. LT did not show mutations causing stop codons, and LT transcripts were expressed in MCPyV positive samples. A significant correlation between HPyVs' detection and a low level of CD4+ was reported. In conclusion, HPyV6, HPyV7 and QPyV seem to not have a clinical relevance in HIV-1 patients, whereas further studies are warranted to define the clinical importance of JCPyV, BKPyV and MCPyV DNA detection in these subjects.

Prezioso C, Ciotti M, Brazzini G, Piacentini F, Passerini S, Grimaldi A, Landi D, Gabri Nicoletti C, Zingaropoli MA, Iannetta M, Altieri M, Conte A, Limongi D, Marifa GA, Ciardi MR, Mastroianni CM, Palamara AT, Moens U, Pietropaolo V.

**Diagnostic value of JC Polyomavirus viruria, viremia, serostatus and microRNA expression in multiple sclerosis patients undergoing immunosuppressive treatment.**

*Journal of Clinical Medicine*, 11(2), 347. doi:10.3390/jcm11020347

Markers of JC polyomavirus (JCPyV) activity can be used to evaluate the risk of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in treated multiple sclerosis (MS) patients. The presence of JCPyV DNA and microRNA (miR-J1-5p), the anti-JCV index and the sequence of the non-coding control region (NCCR) in urine and plasma were determined in 42 MS subjects before treatment (T0), 6 months (T6) and 12 months (T12) after natalizumab, ocrelizumab, fingolimod or dimethyl-fumarate administration and in 25 healthy controls (HC). The number of MS patients with viruria increased from 43% at T0 to 100% at T12, whereas it remained similar for the HC group (35-40%). Viremia first occurred 6 months after treatment in MS patients and increased after 12 months, whereas it was absent in HC. The viral load in urine and plasma from the MS cohort increased over time, mostly pronounced in natalizumab-treated patients, whereas it persisted in HC. The archetypal NCCR was detected in all positive urine, whereas mutations were observed in plasma-derived NCCRs resulting in a more neurotropic variant. The prevalence and miR-J1-5p copy number in MS urine and plasma dropped after treatment, whereas they remained similar in HC specimens. Viruria and miR-J1-5p expression did not correlate with anti-JCV index. In conclusion, analyzing JCPyV DNA and miR-J1-5p levels may allow monitoring JCPyV activity and predicting MS patients at risk of developing PML.

Cipriani C, Tartaglione AM, Giudice M, D'Avorio E, Petrone V, Toschi N, Chiarotti F, Miele MT, Calamandrei G,, Garaci E, Matteucci C, Sinibaldi-Vallebona P , Ricceri L, Balestrieri M.

**Differential expression of endogenous retroviruses and inflammatory mediators in female and male offspring in a mouse model of maternal immune activation.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(22). doi:10.3390/ijms232213930

Maternal infections during pregnancy and the consequent maternal immune activation (MIA) are the major risk factors for autism spectrum disorder (ASD). Epidemiological evidence is corroborated by the preclinical models in which MIA leads to ASD-like behavioral abnormalities and altered neuroinflammatory profiles, with an increase in pro-inflammatory cytokines and microglial markers. In addition to neuroinflammatory response, an abnormal expression of endogenous retroviruses (ERVs) has been identified in neurodevelopmental disorders and have been found to correlate with disease severity. Our aim was to evaluate the transcriptional profile of several ERV families, ERV-related genes, and inflammatory mediators (by RT real-time PCR) in mouse offspring of both sexes, prenatally exposed to polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C), a synthetic double-stranded RNA molecule targeting TLR-3 that mimics viral maternal infection during pregnancy. We found that prenatal exposure to Poly I:C deregulated the expression of some ERVs and ERV-related genes both in the prefrontal cortex (PFC) and hippocampus, while no changes were detected in the blood. Interestingly, sex-related differences in the expression levels of some ERVs, ERV-related genes, and inflammatory mediators that were higher in females than in males emerged only in PFC. Our findings support the tissue specificity of ERV and ERV-related transcriptional profiles in MIA mice.

Behzadi P, Ambrosi C, Scribano D, Zanetti S, Sarshar M, Gajdács M, Donadu M G.

**Editorial: Current perspectives on *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, virulence and contemporary strategies to combat multidrug-resistant (MDR) pathogens.**

*Frontiers in Microbiology*, 13, 975616. doi:10.3389/fmicb.2022.975616

Moens, U, Prezioso C, Pietropaolo V.



**Functional domains of the early proteins and experimental and epidemiological studies suggest a role for the novel human polyomaviruses in cancer.**

*Frontiers in Microbiology*, 13, 834368. doi:10.3389/fmicb.2022.834368

As their name indicates, polyomaviruses (PyVs) can induce tumors. Mouse PyV, hamster PyV and raccoon PyV have been shown to cause tumors in their natural host. During the last 30 years, 15 PyVs have been isolated from humans. From these, Merkel cell PyV is classified as a Group 2A carcinogenic pathogen (probably carcinogenic to humans), whereas BKPyV and JCPyV are class 2B (possibly carcinogenic to humans) by the International Agency for Research on Cancer. Although the other PyVs recently detected in humans (referred to here as novel HPyV; nHPyV) share many common features with PyVs, including the viral oncoproteins large tumor antigen and small tumor antigen, as their role in cancer is questioned. This review discusses whether the nHPyVs may play a role in cancer based on predicted and experimentally proven functions of their early proteins in oncogenic processes. The functional domains that mediate the oncogenic properties of early proteins of known PyVs, that can cause cancer in their natural host or animal models, have been well characterized and we examined whether these functional domains are conserved in the early proteins of the nHPyVs and presented experimental evidence that these conserved domains are functional. Furthermore, we reviewed the literature describing the detection of nHPyV in human tumors.

Marazzato M, Scribano D, Sarshar M., Brunetti F, Fillo S, Fortunato, A, Lista F, Palamara AT, Zagaglia AC, Ambrosi, C. (2022).

**Genetic diversity of antimicrobial resistance and key virulence features in two extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates.**

*International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(5), 2870. doi:10.3390/ijerph19052870

In recent decades, *Acinetobacter baumannii* emerged as a major infective menace in healthcare settings due to scarce therapeutic options to treat infections. Therefore, undertaking genome comparison analyses of multi-resistant *A. baumannii* strains could aid the identification of key bacterial determinants to develop innovative anti-virulence approaches. Following genome sequencing, we performed a molecular characterization of key genes and genomic comparison of two *A. baumannii* strains, #36 and #150, with selected reference genomes. Despite a different antibiotic resistance gene content, the analyzed strains showed a very similar antibiogram profile. Interestingly, the lack of some important virulence determinants (i.e., *bap*, *ata* and *omp33-36*) did not abrogate their adhesive abilities to abiotic and biotic surfaces, as reported before; indeed, strains retained these capacities, although to a different extent, suggesting the presence of distinct vicarious genes. Conversely, secretion systems, lipopolysaccharide (LPS), capsule and iron acquisition systems were highly similar to *A. baumannii* reference strains. Overall, our analyses increased our knowledge on *A. baumannii* genomic content and organization as well as the genomic events occurring in nosocomial isolates to better fit into changing healthcare environments.

Bitossi C , Viscido A, Prezioso C, Brazzini G, Trancassini M, Borrazzo C, Passerini S, Frasca F, Scordio M, Sorrentino L, Oliveto G, Fracella M, D'Auria A, Selvaggi C, Cimino G, Midulla F, Pierangeli A, Antonelli G, Moens U, Pietropaolo V, Scagnolari C.

**High prevalence of Merkel cell polyomavirus is associated with dysregulation in transcript levels of TLR9 and type I IFNs in a large cohort of CF patients from the Italian (Lazio) reference center for cystic fibrosis.**

*Microbial Pathogenesis*, 169(105644), 105644. doi:10.1016/j.micpath.2022.105644

Merkel cell polyomavirus (MCPyV) has been detected in respiratory specimens including those from Cystic Fibrosis (CF) patients, raising questions about its immunological and clinical relevance in the respiratory tract. MCPyV might promote an inappropriate antiviral response contributing to a chronic inflammatory response and resulting in detrimental effects in CF. Respiratory samples (n = 1138) were randomly collected from respiratory tract of CF patients (n = 539) during July 2018-October 2019. MCPyV-DNA detection was

performed by real time PCR and positive samples were characterized by sequencing of the NCCR genomic region. The transcript levels of Toll-like receptor 9 (TLR9) and type I interferon (IFN-I) genes (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  and IFN $\epsilon$ ) were examined by real-time RT-PCR assays. MCPyV-DNA was detected in 268 out of 1138 respiratory specimens (23.5%) without any difference in the prevalence of MCPyV-DNA according to age, gender or bacteriological status of CF individuals. Thirteen out of 137 CF patients remained positive for MCPyV-DNA over the time (a median follow-up period of 8.8 months). Detection of MCPyV-DNA in respiratory specimens was not associated with the occurrence of exacerbation events. Both MCPyV positive adolescents (11-24 years) and adults ( $\geq 25$  years) had lower mRNA levels of TLR9, IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$  and IFN $\alpha$  than the negative patients of the same age group, while MCPyV positive children produced increased levels of TLR9 and IFN-I genes ( $p < 0.05$  for TLR9, IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ ) with respect to the negative ones. There were significant differences in TLR9 levels ( $p < 0.01$ ), but not in those of IFNs, between MCPyV-DNA positive and negative patients with *S. aureus*, *P. aeruginosa* or both. Overall, these results indicate that MCPyV-DNA is frequently detected in the respiratory samples of CF patients and might influence the expression levels of IFN-related genes in an age dependent manner. The concomitant detection of MCPyV together with *S. aureus* and/or *P. aeruginosa* correlated with alterations in TLR9 levels suggesting that virus-bacteria coinfections might contribute to affect antiviral immunity in CF patients.

De Angelis M, Amatore D, Checconi P, Zevini A, Fraternali A, Magnani M, Hiscott J, De Chiara G, Palamara AT, Nencioni L.

**Influenza virus down-modulates G6PD expression and activity to induce oxidative stress and promote its replication.**

*Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 804976. doi:10.3389/fcimb.2021.804976

Influenza virus infection induces oxidative stress in host cells by decreasing the intracellular content of glutathione (GSH) and increasing reactive oxygen species (ROS) level. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) is responsible for the production of reducing equivalents of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) that is used to regenerate the reduced form of GSH, thus restoring redox homeostasis. Cells deficient in G6PD display elevated levels of ROS and an increased susceptibility to viral infection, although the consequences of G6PD modulation during viral infection remain to be elucidated. In this study, we demonstrated that influenza virus infection decreases G6PD expression and activity, resulting in an increase in oxidative stress and virus replication. Moreover, the down regulation of G6PD correlated with a decrease in the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), a key transcription factor that regulates the expression of the antioxidant response gene network. Also down-regulated in influenza virus infected cells was sirtuin 2 (SIRT2), a NADPH-dependent deacetylase involved in the regulation of G6PD activity. Acetylation of G6PD increased during influenza virus infection in a manner that was strictly dependent on SIRT2 expression. Furthermore, the use of a pharmacological activator of SIRT2 rescued GSH production and NRF2 expression, leading to decreased influenza virus replication. Overall, these data identify a novel strategy used by influenza virus to induce oxidative stress and to favor its replication in host cells. These observations furthermore suggest that manipulation of metabolic and oxidative stress pathways could define new therapeutic strategies to interfere with influenza virus infection.

Checconi P, Coni C, Limongi D, Baldelli S, Ciccarone F, De Angelis M, Mengozzi M, Ghezzi P, Maria P, Ciriolo MR, Nencioni L, Palamara AT.

**Influenza virus replication is affected by glutaredoxin1-mediated protein deglutathionylation.**

*FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 37(2), e22729. doi:10.1096/fj.202201239RR

Several redox modifications have been described during viral infection, including influenza virus infection, but little is known about glutathionylation and this respiratory virus. Glutathionylation is a reversible, post-translational modification, in which protein cysteine forms transient disulfides with glutathione (GSH), catalyzed by cellular oxidoreductases and in particular by glutaredoxin (Grx). We show here that (i) influenza virus infection induces protein glutathionylation, including that of viral proteins such as

hemagglutinin (HA); (ii) Grx1-mediated deglutathionylation is important for the viral life cycle, as its inhibition, either with an inhibitor of its enzymatic activity or by siRNA, decreases viral replication. Overall these data contribute to the characterization of the complex picture of redox regulation of the influenza virus replication cycle and could help to identify new targets to control respiratory viral infection.

Prezioso C, Brazzini G, Passerini S, Di Fabio C, Cosio T, Bernardini T, Campione E, Moens U, Pietropaolo V, Ciotti M

**Prevalence of MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV in actinic keratosis biopsy specimens.**

*Viruses*, 14(2), 427. doi:10.3390/v14020427

To date, 14 human polyomaviruses (HPyVs) have been identified using high-throughput technologies. Among them, MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV present a skin tropism, but a causal role in skin diseases has been established only for MCPyV as a causative agent of Merkel cell carcinoma (MCC) and TSPyV as an etiological agent of Trichodysplasia Spinulosa (TS). In the search for a possible role for cutaneous HPyVs in the development of skin malignant lesions, we investigated the prevalence of MCPyV, HPyV6, HPyV7 and TSPyV in actinic keratosis (AK), a premalignant skin lesion that has the potential to progress towards a squamous cell carcinoma (SCC). One skin lesion and one non-lesion skin from nine affected individuals were analyzed by qualitative PCR. MCPyV was detected in 9 out of 9 lesion biopsies and 6 out of 8 non-lesion biopsies. HPyV6 was detected only in healthy skin, while HPyV7 and TSPyV were not detected in any skin sample. These findings argue against a possible role of cutaneous HPyVs in AK. However, considering the small sample size analyzed, a definitive conclusion cannot be drawn. Longitudinal studies on large cohorts are warranted.

di Gioia C, Zullo F, Costanza R, Vecchio B, Pajno C, Perrone G, Galoppi P, Pecorini F, Di Mascio D, Carletti R, Prezioso C, Pietropaolo V, Masuelli L, Bei R, Ciallella C, Della Rocca C, Giancotti A, Brunelli R.

**Stillbirth and fetal capillary infection by SARS-CoV-2.**

*American Journal of Obstetrics & Gynecology MFM*, 4(1), 100523. doi:10.1016/j.ajogmf.2021.100523

We presented the case of stillbirth in a paucisymptomatic mother affected by SARS-CoV-2. At gross examination, the placenta showed a diffuse marble appearance and a focal hemorrhagic area. Multiple areas of hemorrhagic or ischemic necrosis with central and peripheral villous infarctions and thrombosis of several maternal and fetal vessels with luminal fibrin and platelet deposition were observed. All lesions seemed to be synchronous. Virus particles were identified within the cytoplasm of endothelial cells using electron microscopy, whereas SARS-CoV-2 RNA was detected in the placental tissue using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Here, fetal vascular malperfusion was associated with infection; in fact, electron microscopy images showed that marked SARS-CoV-2 endotheliotropism involved the intravillous fetal capillaries. Furthermore, we confirmed that syncytiotrophoblast is the major target cell type for SARS-CoV-2 infection of the placenta. In conclusion, the possible consequences of the action of the placentotropic SARS-CoV-2 included the occurrence of vertical transmission, as reported in the literature, and/or stillbirth: the latter possibility may be triggered by a hampered maternal and/or fetal perfusion of the placenta. The diffuse thrombosis and subsequent ischemia of fetal capillaries induced by COVID-19 cannot be predicted by standard clinical surveillance.

Sarshar M, Scribano D, Palamara AT, Ambrosi C, Masotti.

**The *Acinetobacter baumannii* model can explain the role of small non-coding RNAs as potential mediators of host-pathogen interactions.**

*Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 1088783. doi:10.3389/fmolb.2022.1088783

Bacterial small RNAs (sRNAs) research has accelerated over the past decade, boosted by advances in RNA-seq technologies and methodologies for capturing both protein-RNA and RNA-RNA interactions. The emerging picture is that these regulatory sRNAs play important roles in controlling complex physiological processes and are required to survive the antimicrobial challenge. In recent years, the RNA content of OMVs/EVs has also gained increasing attention, particularly in the context of infection. Secreted RNAs from several bacterial pathogens have been characterized but the exact mechanisms promoting pathogenicity remain elusive. In this review, we briefly discuss how secreted sRNAs interact with targets in infected cells, thus representing a novel perspective of host cell manipulation during bacterial infection. During the last decade, *Acinetobacter baumannii* became clinically relevant emerging pathogens responsible for nosocomial and community-acquired infections. Therefore, we also summarize recent findings of regulation by sRNAs in *A. baumannii* and discuss how this emerging bacterium utilizes many of these sRNAs to adapt to its niche and become successful human pathogen.

Marcocci ME, Jackowska BG, Prezioso C, Protto V, De Angelis M, Di Leva FS, Casciaro B, Carotenuto A, Mangoni ML, Palamara AT, Pietropaolo V, De Chiara G, Nencioni L.

Marcocci ME, Jackowska BG, Prezioso C, Protto V, De Angelis M, Di Leva FS, ... Nencioni, L. (2022). **The inhibition of DNA viruses by the amphibian antimicrobial peptide temporin G: A virological study addressing HSV-1 and JCPyV.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 7194. doi:10.3390/ijms23137194

Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and John Cunningham polyomavirus (JCPyV) are widely distributed DNA viruses causing mainly asymptomatic infection, but also mild to very severe diseases, especially when these viruses reach the brain. Some drugs have been developed to inhibit HSV-1 replication in host cells, but their prolonged use may induce resistance phenomena. In contrast, to date, there is no cure for JCPyV. The search for alternative drugs that can reduce viral infections without undermining the host cell is moving toward antimicrobial peptides (AMPs) of natural occurrence. These include amphibian AMPs belonging to the temporin family. Herein, we focus on temporin G (TG), showing that it strongly affects HSV-1 replication by acting either during the earliest stages of its life cycle or directly on the virion. Computational studies have revealed the ability of TG to interact with HSV-1 glycoprotein B. We also found that TG reduced JCPyV infection, probably affecting both the earliest phases of its life cycle and the viral particle, likely through an interaction with the viral capsid protein VP1. Overall, our results are promising for the development of short naturally occurring peptides as antiviral agents used to counteract diseases related to HSV-1 and JCPyV.

Behzadi, P., Sameer, A. S., Nissar, S., Banday, M. Z., Gajdács, M., García-Perdomo, H. A., ... Ambrosi, C. (2022).

**The interleukin-1 (IL-1) superfamily cytokines and their single nucleotide polymorphisms (SNPs).**

*Journal of Immunology Research*, 2022, 2054431. doi:10.1155/2022/2054431

Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and John Cunningham polyomavirus (JCPyV) are widely distributed DNA viruses causing mainly asymptomatic infection, but also mild to very severe diseases, especially when these viruses reach the brain. Some drugs have been developed to inhibit HSV-1 replication in host cells, but their prolonged use may induce resistance phenomena. In contrast, to date, there is no cure for JCPyV. The search for alternative drugs that can reduce viral infections without undermining the host cell is moving toward antimicrobial peptides (AMPs) of natural occurrence. These include amphibian AMPs belonging to the temporin family. Herein, we focus on temporin G (TG), showing that it strongly affects HSV-1 replication by acting either during the earliest stages of its life cycle or directly on the virion. Computational studies have revealed the ability of TG to interact with HSV-1 glycoprotein B. We also found that TG reduced JCPyV infection, probably affecting both the earliest phases of its life cycle and the viral particle, likely through an interaction with the viral capsid protein VP1. Overall, our results are promising for the development of short naturally occurring peptides as antiviral agents used to counteract diseases related to HSV-1 and JCPyV.

Mollinari C, De Dominicis C, Lupacchini L, Sansone L, Caprini D, Casciola CM, Wang Y, Zhao J, Fini M, Russo MA, Garaci E, Merlo D

**Detection of pathological markers of neurodegenerative diseases following microfluidic direct conversion of patient fibroblasts into neurons.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2147. doi:10.3390/ijms23042147

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease are clinically diagnosed using neuropsychological and cognitive tests, expensive neuroimaging-based approaches (MRI and PET) and invasive and time-consuming lumbar puncture for cerebrospinal fluid (CSF) sample collection to detect biomarkers. Thus, a rapid, simple and cost-effective approach to more easily access fluids and tissues is in great need. Here, we exploit the chemical direct reprogramming of patient skin fibroblasts into neurons (chemically induced neurons, ciNs) as a novel strategy for the rapid detection of different pathological markers of neurodegenerative diseases. We found that FAD fibroblasts have a reduced efficiency of reprogramming, and converted ciNs show a less complex neuronal network. In addition, ciNs from patients show misfolded protein accumulation and mitochondria ultrastructural abnormalities, biomarkers commonly associated with neurodegeneration. Moreover, for the first time, we show that microfluidic technology, in combination with chemical reprogramming, enables on-chip examination of disease pathological processes and may have important applications in diagnosis. In conclusion, ciNs on microfluidic devices represent a small-scale, non-invasive and cost-effective high-throughput tool for protein misfolding disease diagnosis and may be useful for new biomarker discovery, disease mechanism studies and design of personalised therapies.

Cipriani C, Giudice M, Petrone V, Fanelli M, Minutolo A, Miele MT, Toschi N, Maracchioni C, Siracusano M, Benvenuto A, Coniglio A, Curatolo P, Mazzone L, Sandro G, Garaci E, Sinibaldi-Vallebona P, Matteucci C, Balestrieri E

**Modulation of human endogenous retroviruses and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells from autistic children and their parents.**

*Retrovirology*, 19(1), 26. doi:10.1186/s12977-022-00603-6

**Background:** Putative pathogenic effects mediated by human endogenous retroviruses (HERVs) in neurological and psychiatric disorders in humans have been extensively described. HERVs may alter the development of the brain by means of several mechanisms, including modulation of gene expression, alteration of DNA stability, and activation of immune system. We recently demonstrated that autistic children and their mothers share high expression levels of some HERVs and cytokines in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *ex vivo*, suggesting a close mother-child association in Autism Spectrum Disorder (ASD).

**Results:** In the present study, PBMCs from autistic children and their parents were exposed to stimulating factors (Interleukin-2/Phytohaemagglutinin) or drugs, as Valproic acid and Efavirenz. The results show that HERVs and cytokines expression can be modulated *in vitro* by different stimuli in PBMCs from autistic children and their mothers, while no significant changes were found in PBMCs ASD fathers or in controls individuals. In particular, *in vitro* exposure to interleukin-2/Phytohaemagglutinin or valproic acid induces the expression of several HERVs and cytokines while Efavirenz inhibits them.

**Conclusion:** Herein we show that autistic children and their mothers share an intrinsic responsiveness to *in vitro* microenvironmental changes in expressing HERVs and pro-inflammatory cytokines. Remarkably, the antiretroviral drug Efavirenz restores the expression of specific HERV families to values similar to those of the controls, also reducing the expression of proinflammatory cytokines but keeping the regulatory ones high. Our findings open new perspectives to study the role of HERVs in the biological mechanisms underlying Autism.

Calabrese V, Picconi B, Heck N, Campanelli F, Natale G, Marino G, Sciacaluga M, Ghiglieri V, Tozzi A, Anceaume E, Cuoc E, Caboche J, Conquet F, Calabresi P, Charvin D.

**A positive allosteric modulator of mGlu4 receptors restores striatal plasticity in an animal model of l-Dopa-induced dyskinesia.**

*Neuropharmacology*, 218(109205), 109205. doi:10.1016/j.neuropharm.2022.109205

By decreasing glutamate transmission, mGlu4 receptor positive allosteric modulators (mGlu4-PAM), in combination with levodopa (l-DOPA) may restore the synergy between glutamatergic and dopaminergic transmissions, thus maximizing the improvement of motor function in Parkinson's disease (PD). This study aimed to clarify the effects of foliglurax, a selective mGlu4-PAM, on the loss of bidirectional synaptic plasticity associated with l-DOPA-induced dyskinesia (LID). Behavioral assessments compared dyskinesia intensity in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats treated with l-DOPA or l-DOPA plus foliglurax. In slices from the same rats, patch-clamp techniques were used to examine electrophysiological differences in glutamatergic synapses, evaluating the EPSCs mediated by NMDA and AMPA receptors in striatal spiny projection neurons. High-frequency stimulation of corticostriatal fibers was used as long-term potentiation (LTP)-inducing protocol. Conversely, 15 min of low-frequency stimulation was applied to depotentiate LTP. The density of dendritic spines was measured in striatal slices in the same experimental conditions. Our results show that, in corticostriatal slices, foliglurax decreased spontaneous glutamatergic transmission in both sham-operated and 6-OHDA lesioned rats. When co-administered with l-DOPA in 6-OHDA-lesioned rats, foliglurax fully restored dendritic spine density in a dose-dependent manner. Moreover, this co-treatment rescued striatal bidirectional plasticity and attenuated the intensity of l-DOPA-induced dyskinesia. This is the first demonstration in an animal model of PD and dyskinesia that a mGlu4 PAM can restore striatal synaptic plasticity.

Mancini A, de Iure A, Picconi B.

**Basic mechanisms of plasticity and learning.**

*Handbook of Clinical Neurology*, 184, 21–34. doi:10.1016/B978-0-12-819410-2.00002-3

The last century was characterized by a significant scientific effort aimed at unveiling the neurobiological basis of learning and memory. Thanks to the characterization of the mechanisms regulating the long-term changes of neuronal synaptic connections, it was possible to understand how specific neural networks shape themselves during the acquisition of memory traces or complex motor tasks. In this chapter, we will summarize the mechanisms underlying the main forms of synaptic plasticity taking advantage of the studies performed in the hippocampus and in the nucleus striatum, key brain structures that play a crucial role in cognition. Moreover, we will discuss how the molecular pathways involved in the induction of physiologic synaptic long-term changes could be disrupted during neurodegenerative and neuroinflammatory disorders, highlighting the translational relevance of this intriguing research field.

Frustaci A, Najafian B, Donato G, Verardo R, Chimenti C, Sansone L, Belli M, Vernucci E, Russo MA.

**Divergent impact of enzyme replacement therapy on human cardiomyocytes and enterocytes affected by Fabry disease: Correlation with mannose-6-phosphate receptor expression.**

*Journal of Clinical Medicine*, 11(5), 1344. doi:10.3390/jcm11051344

Background: The impact of enzyme replacement therapy (ERT) on cardiomyocytes and intestinal cells, affected by Fabry disease (FD), is still unclear. Methods: Six patients with FD, including five family members with GLA mutation c.666delC and one with GLA mutation c.658C > T, manifesting cardiomyopathy and intestinal symptoms (abdominal pain, diarrhea and malabsorption) were included in the study. Clinical outcome, cardiac magnetic resonance (CMR), endomyocardial and gastro-intestinal biopsies were evaluated before and after 2 years of treatment with agalsidase- $\alpha$  (0.2 mg/kg every other week). Immunohistochemistry and Western blot assessments of mannose-6-phosphate receptors (IGF-II-R) on intestinal and myocardial frozen tissue were obtained at diagnosis and after 2 years of ERT. Results: After ERT left ventricular maximal wall thickness, ranging from pre (<10.5 mm) to mild (<15 mm) and moderate

hypertrophy (16 mm), was not associated with significant changes at CMR. Degree of dyspnea, mean cardiomyocyte diameter and % vacuolated areas of cardiomyocytes, representing intracellular GL3, remained unmodified. In contrast, intestinal symptoms improved with disappearance of diarrhea, recovery of anemia and weight gain, correlating with near complete clearance of the enterocytes from GL3 inclusions. IGF-II-R expression was remarkably higher even at histochemistry in intestinal tissue compared with myocardium ( $p < 0.001$ ) either at baseline and after ERT, thus justifying intestinal recovery. Conclusions: Human cells affected by FD may respond differently to ERT: while cardiomyocytes retain their GL3 content after 2 years of treatment, gastro-intestinal cells show GL3 removal with recovery of function. This divergent response may be related to differences in cellular turnover, as well as tissue IGF-II-R expression.

Frustaci A, Verardo R, Scialla R, Bagnato G, Verardo M, Alfaraano M, Russo MA.

**Downregulation of mannose-6-phosphate receptors in Fabry disease cardiomyopathy: A potential target for enzyme therapy enhancement.**

*Journal of Clinical Medicine*, 11(18), 5440. doi:10.3390/jcm11185440

Background: The efficacy of enzyme replacement therapy (ERT) in mobilizing globotriaosylceramide (Gb3) from Fabry cardiomyocytes is limited. The mechanism involved is still obscure. Methods: Assessment of M6Pr, M6Pr-mRNA, and Ubiquitin has been obtained by Western blot analysis and real-time PCR of frozen endomyocardial biopsy samples, from 17 pts with FD, various degree of left ventricular hypertrophy, and maximal wall thickening (MWT) from 11.5 and 20 mm. The diagnosis and severity of FDCM followed definitions of GLA mutation,  $\alpha$ -galactosidase A enzyme activity, cardiac magnetic resonance, and left ventricular endomyocardial biopsy with the quantification of myocyte hypertrophy and the extent of Gb-3 accumulation. All patients have received alpha or beta agalsidase for  $\geq 3$  years without a reduction in LV mass nor an increase in T1 mapping at CMR. Controls were surgical biopsies from 15 patients undergoing mitral valve replacement. Results: Protein analysis showed mean M6Pr in FDCM to be 5.4-fold lower than in a normal heart ( $4289 \pm 6595$  vs.  $23,581 \pm 4074$ ,  $p = 0.0996$ ) ( $p < 0.001$ ): specifically, 9-fold lower in males,  $p = 0.009$ , ( $p < 0.001$ ) and 3-fold lower in females,  $p = 0.5799$ , ( $p < 0.001$ ) showing, at histology, a mosaic of normal and diseased cells. M6Pr-mRNA expression was normal, while ubiquitin showed an increase of 4.6 fold vs. controls ( $13,284 \pm 1723$  vs.  $2870 \pm 690$ ,  $p = 0.001$ ) suggesting that ubiquitin-dependent post-translational degradation is likely responsible for the reduction of M6Pr in FDCM. Conclusion: M6Pr expression is remarkably reduced in FDCM as a likely result of post-translational degradation. This may explain the reduced efficacy of ERT and be a therapeutic target for the enhancement of ERT activity.

Foglio E, Pellegrini L, Russo MA, Limana F.

**HMGB1-mediated activation of the inflammatory-reparative response following myocardial infarction.**

*Cells (Basel, Switzerland)*, 11(2), 216. doi:10.3390/cells11020216

Different cell types belonging to the innate and adaptive immune system play mutually non-exclusive roles during the different phases of the inflammatory-reparative response that occurs following myocardial infarction. A timely and finely regulation of their action is fundamental for the process to properly proceed. The high-mobility group box 1 (HMGB1), a highly conserved nuclear protein that in the extracellular space can act as a damage-associated molecular pattern (DAMP) involved in a large variety of different processes, such as inflammation, migration, invasion, proliferation, differentiation, and tissue regeneration, has recently emerged as a possible regulator of the activity of different immune cell types in the distinct phases of the inflammatory reparative process. Moreover, by activating endogenous stem cells, inducing endothelial cells, and by modulating cardiac fibroblast activity, HMGB1 could represent a master regulator of the inflammatory and reparative responses following MI. In this review, we will provide an overview of cellular effectors involved in these processes and how HMGB1 intervenes in regulating each of them. Moreover, we will summarize HMGB1 roles in regulating other cell types that are involved in the different phases of the inflammatory-reparative response, discussing how its redox status could affect its activity.

Frustaci A, Russo MA, Chimenti C.

**Review of Individualized immunosuppression in virus-negative inflammatory cardiomyopathy.**  
*European heart journal*, 43(45), 4760. doi:10.1093/eurheartj/ehac559

Sansone L, de Iure A, Cristina M, Belli M, Vitiello L, Marcolongo F, Rosellini A, Macera L, Spezia PG, Tomino C, Bonassi S, A Russo MA, Maggi F, Russo P.

**Nicotine in combination with SARS-CoV-2 affects cells viability, inflammatory response and ultrastructural integrity.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(16), 9488. doi:10.3390/ijms23169488

The aims of our study are to: (i) investigate the ability of nicotine to modulate the expression level of inflammatory cytokines in A549 cells infected with SARS-CoV-2; (ii) elucidate the ultrastructural features caused by the combination nicotine+SARS-CoV-2; and (iii) demonstrate the mechanism of action. In this study, A549 cells pretreated with nicotine were either exposed to LPS or poly(I:C), or infected with SARS-CoV-2. Treated and untreated cells were analyzed for cytokine production, cytotoxicity, and ultrastructural modifications. Vero E6 cells were used as a positive reference. Cells pretreated with nicotine showed a decrease of IL6 and TNF $\alpha$  in A549 cells induced by LPS or poly(I:C). In contrast, cells exposed to SARS-CoV-2 showed a high increase of IL6, IL8, IL10 and TNF $\alpha$ , high cytopathic effects that were dose- and time-dependent, and profound ultrastructural modifications. These modifications were characterized by membrane ruptures and fragmentation, the swelling of cytosol and mitochondria, the release of cytoplasmic content in extracellular spaces (including osmiophilic granules), the fragmentation of endoplasmic reticulum, and chromatin disorganization. Nicotine increased SARS-CoV-2 cytopathic effects, elevating the levels of inflammatory cytokines, and inducing severe cellular damage, with features resembling pyroptosis and necroptosis. The protective role of nicotine in COVID-19 is definitively ruled out.

Frustaci A, Verardo R, Galea N, Alfarano M, Sansone L, Russo MA, Chimenti C.

**Removal of cardiac AL amyloid with positive remodelling of cardiomyocytes and of restrictive cardiomyopathy.**

*ESC Heart Failure*, 9(6), 4330–4334. doi:10.1002/ehf2.14017

Herein, we describe histological mobilization of light chain cardiac amyloid documented by sequential left ventricular endomyocardial biopsies. These findings were associated with positive remodelling of cardiomyocytes and of restrictive cardiomyopathy resulting from 14 courses of chemotherapy over 17 years of time. Histological and ultrastructural findings of light chain cardiac amyloid removal led to increase in cardiomyocyte dimension and electrocardiogram voltages, reduction of biventricular wall thickness with improvement of left ventricular diastolic function, and NYHA class shifting from III to I.

Aventaggiato M, Barreca F, Sansone L, Pellegrini L, Russo MA, Cordani M, Tafani, M. (2022).

**Sirtuins and hypoxia in EMT control.**

*Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 15(6), 737. doi:10.3390/ph15060737

Epithelial-mesenchymal transition (EMT), a physiological process during embryogenesis, can become pathological in the presence of different driving forces. Reduced oxygen tension or hypoxia is one of these forces, triggering a large number of molecular pathways with aberrant EMT induction, resulting in cancer and fibrosis onset. Both hypoxia-induced factors, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$ , act as master transcription factors implicated in EMT. On the other hand, hypoxia-dependent HIF-independent EMT has also been described. Recently, a new class of seven proteins with deacylase activity, called sirtuins, have been implicated in the control of both hypoxia responses, HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  activation, as well as EMT induction. Intriguingly, different sirtuins have different effects on hypoxia and EMT, acting as either activators or inhibitors, depending on the tissue and cell type. Interestingly, sirtuins and HIF can be activated or inhibited with



natural or synthetic molecules. Moreover, recent studies have shown that these natural or synthetic molecules can be better conveyed using nanoparticles, representing a valid strategy for EMT modulation. The following review, by detailing the aspects listed above, summarizes the interplay between hypoxia, sirtuins, and EMT, as well as the possible strategies to modulate them by using a nanoparticle-based approach.

Astanina E, Doronzo G, Corà D, Neri F, Oliviero S, Genova T, Mussano F, Middonti E, Vallariello E, Cencioni C, Valdembrì D, Serini G, Limana F, Foglio E, Ballabio E, Bussolino F.

**The TFEB-TGIF1 axis regulates EMT in mouse epicardial cells.**

Nature Communications, 13(1), 5191. doi:10.1038/s41467-022-32855-3

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a complex and pivotal process involved in organogenesis and is related to several pathological processes, including cancer and fibrosis. During heart development, EMT mediates the conversion of epicardial cells into vascular smooth muscle cells and cardiac interstitial fibroblasts. Here, we show that the oncogenic transcription factor EB (TFEB) is a key regulator of EMT in epicardial cells and that its genetic overexpression in mouse epicardium is lethal due to heart defects linked to impaired EMT. TFEB specifically orchestrates the EMT-promoting function of transforming growth factor (TGF)  $\beta$ , and this effect results from activated transcription of thymine-guanine-interacting factor (TGIF)1, a TGF $\beta$ /Smad pathway repressor. The Tgif1 promoter is activated by TFEB, and in vitro and in vivo findings demonstrate its increased expression when Tfeb is overexpressed. Furthermore, Tfeb overexpression in vitro prevents TGF $\beta$ -induced EMT, and this effect is abolished by Tgif1 silencing. Tfeb loss of function, similar to that of Tgif1, sensitizes cells to TGF $\beta$ , inducing an EMT response to low doses of TGF $\beta$ . Together, our findings reveal an unexpected function of TFEB in regulating EMT, which might provide insights into injured heart repair and control of cancer progression.

Bauza-Mayol G, Quintela M, Brozovich A, Hopson M, Shaikh S, Cabrera F, Shi A, Banche Niclot F, Paradiso F, Combella E, Jovic T, Rees P, Tasciotti E, Francis LW, McCulloch P, Taraballi F.

**Biomimetic scaffolds modulate the posttraumatic inflammatory response in articular cartilage contributing to enhanced neof ormation of cartilaginous tissue in vivo.**

Advanced Healthcare Materials, 11(1), e2101127. doi:10.1002/adhm.202101127

Focal chondral lesions of the knee are the most frequent type of trauma in younger patients and are associated with a high risk of developing early posttraumatic osteoarthritis. The only current clinical solutions include microfracture, osteochondral grafting, and autologous chondrocyte implantation. Cartilage tissue engineering based on biomimetic scaffolds has become an appealing strategy to repair cartilage defects. Here, a chondrogenic collagen-chondroitin sulfate scaffold is tested in an orthotopic Lapine in vivo model to understand the beneficial effects of the immunomodulatory biomaterial on the full chondral defect. Using a combination of noninvasive imaging techniques, histological and whole transcriptome analysis, the scaffolds are shown to enhance the formation of cartilaginous tissue and suppression of host cartilage degeneration, while also supporting tissue integration and increased tissue regeneration over a 12 weeks recovery period. The results presented suggest that biomimetic materials could be a clinical solution for cartilage tissue repair, due to their ability to modulate the immune environment in favor of regenerative processes and suppression of cartilage degeneration.

Hendrickson T, Lupo C, Bauza G, Tavares L, Ingram S, Wang S, Moreno M, Tasciotti E, Valderrabano M, Taraballi F.

**Thermally responsive hydrogel for atrial fibrillation related stroke prevention.**

Materials Today Bio, 14(100240), 100240. doi:10.1016/j.mtbio.2022.100240

Atrial fibrillation induced stroke accounts for up to 15% of all strokes. These strokes are caused approximately 90% of the time by clot formation in the left atrial appendage (LAA). To prevent these clots,

the most common approach is to administer blood thinners. However, contraindications prevent some people from being able to have blood thinners. Devices have been developed to seal the LAA to prevent clot formation in these patients. Current devices, such as the LARIAT® tie off the LAA theoretically preventing blood from entering the LAA. These have had limited clinical success mainly due to failure to completely close the LAA leaving holes and orifices for thrombi to form. To overcome this lack of complete closure, many surgeons use off-label approaches, classically filling the LAA filamentous coils, to cover these holes. Although this usually helps largely cover the holes, placement is challenging, the coils can migrate, the holes are not fully closed as there is space within and around the coils that don't fully mold to the LAA geometry. Furthermore, the coils can develop device related thrombi defeating their purpose. Therefore, these are not fully sufficient to complement the closure techniques in closing the LAA. To address limitation of the closure devices and coil sealing of remaining holes, we developed a thermally responsive hydrogel (Thermogel) that solidifies once injected into the LAA to uniformly and fully close off the LAA thus preventing clot formation and device related thrombi. This Thermogel consists of three portions: 1) a structural component composed of thiolated Pluronic F127 for gel to solid transition following injection, 2) Heparin for anticoagulation, and 3) Dopamine for adhesion to the surrounding endothelium in the turbulent flow encountered in cardiovascular applications. Here we have demonstrated that Thermogel, in conjunction with the LARIAT®, is capable of filling the defects in small and large animals through catheter injection. Thermogel was biocompatible and led to atrophy of the LAA at 5 weeks in a large animal model. Given the advantages of this Thermogel for sealing this defect and ability to be delivered through an endovascular approach, Thermogel presents a viable adjuvant to current occlusion-based treatments for sealing cardiovascular defects.

LINEA 2

**Clinica della disabilità**

---

## AREA DI RICERCA NEUROSCIENZE

### ***BIOMARC PREVICTUS - Studio di correlazione tra Biomarcatori Clinici, Neurofisiologici e Neuroradiologici ed Outcome Riabilitativo per la Previsione del Recupero Funzionale dopo Ictus Cerebrale e suo futuro utilizzo per la personalizzazione del trattamento riabilitativo***

L'ictus è una delle principali cause di morte e una delle maggiori cause di disabilità a lungo termine che interferisce con una buona qualità di vita perché il recupero delle funzioni motorie e linguistiche dopo uno ictus è spesso incompleto. Sei mesi dopo un evento cerebrovascolare acuto, i 2/3 dei pazienti sopravvissuti non sono in grado di partecipare in maniera del tutto autonoma alle attività della vita quotidiana e solo pochi sono in grado di riprendere la loro attività lavorativa. Rimane pertanto un obiettivo di rilevante importanza lo sviluppo di strategie che aumentino l'efficacia dei trattamenti neuroriabilitativi. La prima e maggiore difficoltà per il raggiungimento di tale obiettivo si incontra nel prevedere in modo oggettivo e per ogni singolo paziente il reale potenziale di recupero funzionale, in quanto pazienti che all'inizio della riabilitazione hanno una menomazione motoria del tutto sovrapponibile possono raggiungere livelli molto differenti di recupero motorio ed indipendenza funzionale al termine del percorso riabilitativo.

Negli ultimi anni si è sviluppato un crescente interesse nell'utilizzo di biomarcatori per prevedere il recupero motorio. Un biomarcatore del recupero post-ictus può essere definito come un indicatore dello stato della malattia che può essere usato per predire il recupero funzionale o la risposta al trattamento riabilitativo. I principali biomarcatori identificati sono rappresentati da valutazioni cliniche della menomazione motoria iniziale e da valutazioni neurofisiologiche e neuroradiologiche

Dal 2010 ad oggi si è sviluppato un crescente interesse nell'utilizzo di biomarcatori per prevedere il recupero neurologico, rappresentati da valutazioni cliniche della menomazione iniziale, da valutazioni neurofisiologiche e neuroradiologiche.

La capacità di prevedere il recupero del singolo individuo potrebbe portare a) alla pianificazione di un progetto riabilitativo realmente elaborato "su misura" del paziente, b) alla scelta della strategia riabilitativa più adatta ed efficace, c) ad un più realistica condivisione del progetto riabilitativo e ad una corretta pianificazione delle dimissioni con il paziente ed i familiari, d) ad una maggiore appropriatezza nell'allocazione del tempo e delle risorse umane, e) alla selezione di pazienti omogenei (simili caratteristiche cliniche/neurofisiologiche/di neuroimmagini) nei protocolli di ricerca per aumentarne la potenza statistica. La capacità di previsione dell'outcome post-ictus richiede una definizione personalizzata delle caratteristiche cliniche, neurofisiologiche e neuroradiologiche del paziente.

La valutazione clinica da sola ha una bassa accuratezza prognostica. La valutazione neurofisiologica, rappresentata essenzialmente dalla stimolazione magnetica transcranica, è in grado di oggettivare l'integrità funzionale del tratto corticospinale, ma il suo utilizzo isolato non è superiore alla clinica a causa del suo basso valore predittivo. Poco studiate risultano invece altre tecniche neurofisiologiche di potenziale interesse, come ad esempio le correlazioni tra anomalie delle reti neurali cerebrali, misurate con analisi EEG di connettività funzionale, e recupero post ictus. Le neuroimmagini sono state utilizzate per valutare l'integrità strutturale del fascio corticospinale. L'utilizzo combinato e sequenziale di biomarcatori neurofisiologici e di neuroimmagini si è dimostrato utile per effettuare per ogni singolo paziente una prognosi accurata di recupero dell'arto superiore a 12 settimane ed anche nel predire la risposta a terapia riabilitativa robotica, ma l'utilizzo di tali algoritmi è in grado di prevedere in maniera corretta il recupero motorio solo per il 75-80% dei pazienti ed è più accurata per il recupero di pazienti

che hanno un deficit funzionale iniziale molto lieve o molto grave, mentre il valore predittivo si riduce per i pazienti con valutazioni cliniche iniziali di gravità intermedia.

Verificare la potenza predittiva di diversi biomarcatori clinici, neurofisiologici e di neuroimmagini, acquisiti ed analizzati con tecniche avanzate ed integrate, sul recupero funzionale e motorio e sulla disabilità post ictus e costruire un algoritmo di previsione individuale con un alto valore predittivo dell'*outcome*.

L'obiettivo primario dello studio è quello di valutare la potenza predittiva dei biomarcatori, singolarmente o in combinazione, sullo score della Fugl Meyer Scale - Arto Superiore a due mesi dall'ingresso in reparto e a 4-6 mesi dopo le dimissioni.

Gli obiettivi secondari sono:

1. valutare la potenza predittiva dei biomarcatori, singolarmente o in combinazione, sullo score della Fugl Meyer Scale - Arto Inferiore, Nine Hole Peg Test, National Institute of Health Ictus Scale (NIHSS), mRS Rankin Scale e modified Barthel Index;
2. valutare la fattibilità e la semplicità di esecuzione dell'algoritmo;
3. valutare il rapporto costi/benefici dell'algoritmo;
4. valutare l'eventuale miglioramento di comfort e sicurezza da parte del medico riabilitatore e/o del terapeuta nella elaborazione del progetto riabilitativo e nell'effettuazione dello stesso dopo l'applicazione dell'algoritmo; 5) valutare l'eventuale modifica di percezione del paziente e dei familiari nei confronti della comunicazione da parte del medico della prognosi di recupero a distanza in termini di accuratezza e precisione.

Ci si aspetta di poter:

1. riuscire a costruire un algoritmo di previsione dell'*outcome* neuro riabilitativo post-ictus. Questo risultato permetterà nelle fasi successive di questo filone di ricerca una migliore pianificazione di un progetto riabilitativo realmente elaborato "su misura" del paziente, una più realistica condivisione del progetto riabilitativo con il paziente ed i familiari, una corretta pianificazione delle dimissioni, maggiore appropriatezza nell'allocazione del tempo e delle risorse umane. *MEDICINA DELLE 4 P: partecipativa, personalizzata, preventiva, predittiva*;
2. aumentare le conoscenze sui meccanismi di neuroplasticità sia funzionale al recupero che 'aberrante' e cioè favorente il deficit;
3. maggiore conoscenza del background di recupero di ogni singolo Paziente per una scelta del trattamento riabilitativo più efficace non su base empirica, ma basata sulla conoscenza di circuiti neurali indenni e di biomarcatori della neuroplasticità;
4. selezione di pazienti omogenei (simili caratteristiche cliniche/neurofisiologiche/di neuro immagini) piuttosto che solo sulla base di similitudini di quadro clinico iniziale e della topografia della lesione) nei protocolli di ricerca.

BIOMARC-PREVICTUS è un progetto integrato con l'ambizione di sfruttare in modo trasversale le competenze cliniche e le risorse tecnologiche per diagnosi e terapia dell'IRCCS San Raffaele e della rete di centri ad esso connessi, e di spingere le diverse professionalità di ricerca presenti al suo interno a colloquiare e collaborare sino a formare un substrato comune di ricerca e di clinica avanzate in cui i meccanismi di "traslazione" possano agire quotidianamente per il bene del Malato ed al fine di personalizzare, tramite futuri progetti, sempre di più e meglio l'intervento terapeutico e riabilitativo mirante a limitare al massimo i residui neurologici a breve e lungo termine dell'ictus ed il loro impatto sulla qualità della vita di Malati e Famiglie.

Lo studio è rivolto a tutti i pazienti ricoverati presso i reparti di Riabilitazione Neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele che hanno avuto il primo evento ictale, ischemico o emorragico, nel territorio dell'arteria cerebrale media e presentano plegia o paresi dell'arto superiore.

In tutti i pazienti, previa firma del consenso informato, vengono misurati i biomarcatori clinici, neurofisiologici e neuroradiologici in 3 tempi: T0 (da 14 a 30 giorni post-ictus); T1 (due mesi dal ricovero, pre-dimissione); T2 (dopo 4-6 mesi dalla dimissione - follow-up).

I pazienti vengono sottoposti ad EEG e misurazione dei Potenziali Evocati Motori (durante il ricovero, sia in entrata T0 che in dimissione T1), RMN encefalo senza mdc (sia al momento del ricovero T0 che al follow up a 6 mesi T2) e ad un'approfondita valutazione clinica attraverso la somministrazione di diverse scale di valutazione al T0, T1 e T2 (Fugl Meyer Scale, Trunc Control Test, Functional Ambulation Classification, National Institute of Health Ictus Scale, mRS Rankin Scale, modified Barthel Index, Medical Research Council grade, Nine Hole Peg Test, Box and Block Test) e neuropsicologica al T0 e T2 (MMSE, 15 Parole di Rey – richiamo immediato e differito, Visual Search, Matrici Progressive Colorate di Raven, Stroop Test, Fluenza verbale fonologica e categoriale, Span verbale numerico in avanti e indietro, Span Spaziale in avanti e indietro, Esame Neuropsicologico per l'Afasia).

Una prima analisi statistica ha confrontato le prestazioni dei pazienti reclutati al T0 (da 15 a 30 giorni dopo l'evento ictale) e al T1 (pre-dimissione dopo 60 giorni dal ricovero); dal confronto sono emerse differenze significative nelle seguenti scale: (Fugl Meyer Scale, Trunc Control Test, National Institute of Health Ictus Scale, modified Barthel Index. I pazienti arruolati hanno mostrato un miglioramento significativo delle prestazioni misurate al T1.

*Analisi del trattamento logopedico classico per la disartria ipocinetica nella Malattia di Parkinson con comparazione di valutazioni cliniche soggettive e strumentali mediante dispositivo IOPI*

Nella classificazione delle disartrie, i problemi di voce ed eloquio nella Malattia di Parkinson (MP) vengono definiti "Disartria ipocinetica" e si caratterizzano per: riduzione dell'intensità vocale (ipofonia); qualità di voce soffiata, rauca e aspra; imprecisione articolatoria a causa del ridotto range di movimenti articolatori che tendono a decadere o accelerare verso la fine della frase; monotono; eloquio affrettato, disfluente o esitante. Oltre a queste caratteristiche si possono rilevare anche palilalia e balbuzie. Queste caratteristiche unitamente ad amimia (facies a maschera) contribuiscono a limitare la comunicazione della maggior parte dei pazienti con MP, con effetti significativi in ambito psicologico, sociale e lavorativo. L'alterazione della comunicazione è considerata dai pazienti e dai loro familiari uno dei problemi più rilevanti della malattia. Nei primi anni '90 è stato sviluppato lo IOPI (Iowa Oral Performance Instrument) per esaminare le relazioni tra la forza, la resistenza della lingua, delle labbra e il controllo motorio dello speech.

Lo IOPI è un dispositivo portatile, palmare che misura la pressione massima che un paziente può produrre in un sensore linguale IOPI premendo il bulbo contro il palato con la lingua. La pressione di picco è una misura della forza, espressa in unità di pressione, il chilo Pascal (kPa). Lo strumento contiene una funzione peak-hold (picco massimo – picco minimo) e un timer ed è così composto: linguetta di plastica flessibile piena d'aria (di circa 3,5 centimetri lunghezza e 4.5 cm di diametro con un volume interno approssimativo di 2,8 ml) collegata tramite un tubo di plastica di 11,5 cm di lunghezza a un sensore linguale monouso sul quale si esercita la pressione di picco [in kiloPascal (kPa)]. I ricercatori hanno utilizzato questo dispositivo in molti studi per misurare la forza e la resistenza della lingua, in quanto i pazienti affetti da disartria presentano affaticabilità oro-motoria. La resistenza infatti è inversamente proporzionale all'affaticabilità: bassi valori di resistenza sono indicativi di elevata affaticabilità. Attualmente è una delle tecniche di misurazione disponibili più comunemente usate per misurare in maniera oggettiva la forza e la resistenza della lingua.

Il nostro studio si propone di esaminare la validità del trattamento logopedico classico per la disartria con l'obiettivo di migliorare la qualità della vita dei pazienti afflitti da MP, comparando valutazioni cliniche soggettive con misure strumentali oggettive (IOPI)

Lo studio si prefigge di:

- Osservare eventuali modificazioni cliniche e strumentali (attraverso l'uso del dispositivo IOPI) nel gruppo che esegue una rieducazione logopedica classica.
  - Dimostrare con dati oggettivi che il training riabilitativo logopedico porta a benefici funzionali a livello pneumofonoarticolatorio.
  - Fornire al paziente l'opportunità di osservare i risultati del proprio lavoro e dei propri sforzi per essere sempre maggiormente stimolato e motivato durante la riabilitazione.
  - Valutare la forza della lingua e delle labbra con il dispositivo IOPI pre- e post- trattamento logopedico classico per la disartria.
  - Valutare la resistenza della lingua e delle labbra con il dispositivo IOPI pre- e post trattamento logopedico classico per la disartria.
6. Migliorare la prosodia e aumentare l'intelligibilità dello speech.
1. Migliorare il livello di comunicazione del paziente.
  2. Migliorare l'intenzionalità comunicativa del paziente.
  3. Migliorare la qualità di vita dei pazienti.

Coerentemente con l'ipotesi dello studio è atteso un miglioramento in termini di incremento della forza e della resistenza linguale e buccale (misurate con dispositivo IOPI), con benefici funzionali a livello pneumofonoarticolatorio, di prosodia e intelligibilità dello speech, di comunicazione e intenzionalità comunicativa e conseguentemente di un aumento del benessere bio – psico – sociale e della qualità di vita del paziente.

Viene adoperato un dinamometro per oggettivare il reale aumento di forza e resistenza del distretto oro facciale e quindi misurare indirettamente i benefici e gli effetti della terapia logopedia nei pazienti con il m di Parkinson.

Il progetto è stato concluso, sono stati arruolati e trattati 30 pazienti affetti da Malattia di Parkinson afferenti al Day Hospital neuromotorio. I risultati sono stati elaborati per la pubblicazione di un paper inviato ad una rivista scientifica.

All'elaborazione dei risultati sono state osservate sostanziali modifiche cliniche e strumentali (attraverso l'uso del dispositivo IOPI) nel gruppo che esegue la rieducazione logopedica classica in ingresso e uscita con benefici funzionali sia a livello pneumo-fono-articolatorio che nel miglioramento dell'intenzionalità comunicativa del paziente. Lo IOPI rappresenta dai dati, come sperato e ipotizzato, un efficace strumento valutativo sia della forza della lingua e delle labbra che della resistenza della lingua pre- e post-trattamento logopedico classico per la disartria ipocinetica nella Malattia di Parkinson. Altro risultato emerso è l'importanza di un trattamento logopedico di tipo continuativo nei pz con Parkinson.

## **AREA DI RICERCA RIABILITAZIONE NEUROMOTORIA E ROBOTICA RIABILITATIVA**

### *Indagine retrospettiva sulle persone con amputazione di arto inferiore trattate con protesizzazione*

L'amputazione degli arti inferiori (LLA) è ancora un problema di salute che richiede riabilitazione e assistenza a lungo termine, nonostante i grandi progressi in materia di medicina e prevenzione degli infortuni in ambito industriale [Willey et al., 2018]. Diverse revisioni sistematiche e dati epidemiologici su LLA si sono concentrati sull'efficacia della riabilitazione in termini di uso di protesi [Moxey et al., 2011] per compensare la perdita funzionale [Blumentritt et al., 2001] nell'ambito di un percorso riabilitativo finalizzato al recupero della capacità di stare in piedi e di camminare mentre si indossa una protesi. Studi sul ritorno al lavoro o all'attività sociale nelle persone con LLA includono molti fattori confondenti che riducono l'identificazione di predittori di outcome. Pertanto, studi sui fondamentali fattori sociodemografici (sesso, età, condizione lavorativa) e parametri clinici (come il lato, il dolore e il livello di amputazione)

dovrebbero essere eseguiti cercando di minimizzare l'effetto confondente di variabili come differenti programmi di riabilitazione e/o fabbricazione di protesi. Sembrerebbe che ad oggi siano stati condotti pochi studi basati sulla popolazione un'area geografica ben definita, riducendo al minimo questi fattori [Heikkinen et al., 2007].

L'amputazione degli arti inferiori (LLA) è ancora un problema di salute che richiede riabilitazione e assistenza a lungo termine anche nelle società industriali. Parecchi gli studi su soggetti con LLA si sono concentrati sull'efficacia della riabilitazione e sui fattori che influenzano l'uso della protesi. Tuttavia, i dati della letteratura sul recupero della capacità di camminare all'aperto, e quindi di partecipare alla vita sociale in questa popolazione, sono limitati. È necessario, quindi, indagare le potenziali correlazioni tra fattori sociodemografici e clinici e l'uso della protesi per il cammino indoor e outdoor, detto Community Ambulation (CA), in soggetti con LLA.

Lo scopo di questo studio consiste nell'indagare le potenziali correlazioni tra fattori sociodemografici e clinici e l'uso della protesi indoor e outdoor in termini di partecipazione in persone con LLA, riducendo al minimo i fattori confondenti.

I risultati attesi potrebbero includere un quadro globale dello stato di soggetti con LLA in termini di attività e partecipazione, poiché la perdita di funzionalità e mobilità incide direttamente sulla riduzione della partecipazione. Di conseguenza, i risultati di questo studio potrebbero fornire ulteriori indicazioni sull'utilità della CA come fattore predittivo e per identificare sottogruppi di soggetti che possono meglio rispondere ad una riabilitazione su misura per camminare in autonomia.

Lo studio vuole analizzare e confermare che l'uso regolare di una protesi nelle persone con LLA aiuti a ripristinare un buon livello di partecipazione in termini di capacità di camminare indoor e outdoor. L'identificazione di indicatori per una prognosi mirata permette di ottimizzare un programma riabilitativo personalizzato. Trovare sottogruppi di soggetti con LLA che potrebbero avere una migliore possibilità di recuperare la CA e tornare a partecipare autonomamente nei contesti sociali, sulla base di specifiche sociodemografiche e le caratteristiche cliniche potrebbero guidare i medici per pianificare un programma riabilitativo più efficace.

È stato condotto uno studio di coorte osservazionale su 687 soggetti con LLA. Le caratteristiche sociodemografiche e cliniche di soggetti che hanno ricevuto un trattamento riabilitativo simile rispetto al protocollo standard sono state raccolte da un sondaggio telefonico con un questionario strutturato. Il recupero della CA, in termini di autonomia e partecipazione del paziente, valutata dalla Walking Handicap Scale, è stato considerato come primary outcome.

L'analisi univariata ha mostrato una correlazione positiva statisticamente significativa tra CA e genere ( $\chi^2=3.901$ ,  $P=.048$ ); livello di amputazione ( $\chi^2=24.657$ ,  $P<.001$ ); attività lavorativa pre-LLA ( $\chi^2=6.338$ ,  $P=.012$ ) e in corso ( $\chi^2=25.192$ ,  $P<.001$ ); utilizzo protesi ( $\chi^2=187.037$ ,  $P<.01$ ); e tempo trascorso da LLA ( $r=0,183$ ,  $P<.001$ ); l'aumento dell'età è correlato negativamente con l'esito ( $r=-0.329$ ,  $P<.001$ ), mentre l'intensità del dolore non è risultata significativa. Essere maschi (75,4%); livello di amputazione transtibiale (TT) (9,79%); lavorare prima della LLA (3,81%) e dopo LLA (7,68%); e l'uso della protesi (24,63%) ha aumentato la probabilità di recupero della CA. L'analisi statistica ha confermato che l'uso della protesi ( $P<.001$ ) e il livello di amputazione TT ( $P=.042$ ) sono predittori di una Walking Handicap Scale 4–6.

I risultati evidenziano l'importanza dell'uso della protesi nelle persone con LLA per il ripristino di una buona capacità di partecipazione (CA), soprattutto nei soggetti con livello di amputazione TT. L'identificazione di fattori predittivi può aiutare la personalizzazione di nuovi approcci riabilitativi volti a un precoce reinserimento nella vita sociale.

*Analisi della cinematica dell'arto superiore con Motion Capture durante il Box and Blocks test: dati normativi e da pazienti neurologici e pediatrici*



Il deficit dell'arto superiore può derivare da una serie di differenti condizioni o patologie, tra le quali lo stroke, la Malattia di Parkinson, i disturbi muscolo-scheletrici, la paralisi cerebrale infantile, ecc... Coloro che sono sottoposti a trattamento riabilitativo dell'arto superiore, sono generalmente valutati mediante scale funzionali e motorie (Murphy et al., 2015; Platz et al., 2005) al fine di caratterizzare l'efficacia di una specifica terapia o l'evoluzione della patologia nel tempo. Tipicamente vengono valutate le prestazioni relative ad attività di vita quotidiana (ADL), alla destrezza ed alla forza. Esistono numerosi test validati per valutare persone con disabilità dell'arto superiore. Tuttavia, questi test clinici valutano parzialmente il gesto motorio ed ignorano la qualità del movimento eseguito dal soggetto durante l'esecuzione del task, ovvero incorporano tale qualità in un unico fattore qualitativo. Un modo per eseguire un'analisi dettagliata del gesto motorio è attraverso l'uso dell'analisi strumentata del movimento che consente l'analisi quantitativa e oggettiva di come e quanto i segmenti corporei si muovono l'uno rispetto all'altro in un sistema di riferimento globale (analisi della cinematica). Tale analisi viene tipicamente effettuata con sistemi stereofotogrammetrici (Motion Capture - MoCap) basati su marker riflettenti e telecamere ad infrarosso ad alta risoluzione (Cappozzo et al., 2005). Un'altra tipologia di strumentazione per l'analisi della cinematica del movimento è basata sull'impiego di sensori inerziali (accelerometri e giroscopi) che consentono di misurare accelerazione e orientamento dei segmenti corporei a cui sono applicati: Inertial Measurement Units (IMU). Caratteristiche dei sistemi IMU sono (Zhou et al., 2008): una buona capacità di rilevare la posizione e orientamento (errore quadratico medio di posizione < 0.01 mm e di angolo compreso tra 2.5 e 4.8°, confrontandolo con il MoCap); possibilità di utilizzarlo in ambiente ecologico (fuori dal laboratorio di analisi del movimento); semplice applicazione dei sensori (attraverso fasce con velcro sopra l'abbigliamento del paziente, a differenza della MoCap dove i marker sono applicati sulla pelle); maggiore facilità di utilizzo. Tali caratteristiche rendono il sistema IMU utilizzabile in alternativa alla MoCap per l'analisi del movimento dell'arto superiore.

Diversi studi hanno dimostrato l'utilità della MoCap e degli IMU per analizzare i movimenti degli arti superiori in pazienti con stroke (Cruz et al., 2014; Li et al., 2016), sclerosi multipla (Carpinella et al. 2014), Parkinson (Hoffman & McNamers 2011), o durante ADL (Gates et al., 2016). Tuttavia, solo pochi recenti studi hanno tentato di strumentare test clinici per l'arto superiore al fine di analizzare la cinematica del movimento durante l'esecuzione di task motori ciclici e ripetibili (Hebert, 2014; Kontson et al., 2017).

Lo studio ha come obiettivo la definizione del "Box and Blocks" test (BBT) strumentato per la valutazione oggettiva della cinematica articolare dell'arto superiore su soggetti sani. Successivamente alla definizione di dati normativi caratteristici del gesto, lo studio ha come obiettivo la caratterizzazione del movimento dell'arto superiore patologico in persone con Malattia di Parkinson, confrontando i dati ottenuti rispetto ai dati normativi.

Obiettivo primario dello studio: standardizzazione della valutazione strumentale dell'arto superiore. Analisi della cinematica dell'arto superiore durante il BBT e valutazione di soggetti sani e di soggetti con Malattia di Parkinson.

Obiettivi secondari dello studio: 1. definizione di un protocollo di analisi della cinematica dell'arto superiore durante il BBT; 2. definizione di un protocollo di analisi della cinematica dell'arto superiore durante il BBT; 3. standardizzazione del BBT strumentato su soggetti sani; 4. caratterizzazione del pattern motorio patologico dell'arto superiore in soggetti con Malattia di Parkinson, confrontando i dati ottenuti rispetto ai dati standardizzati.

Ci si attende di poter elaborare un database contenente dati di cinematica articolare durante l'esecuzione del BBT: dati soggetti normodotati e patologici.

Quindi si intende definire uno strumento oggettivo e avanzato di valutazione della performance motoria dell'arto superiore da poter utilizzare ampiamente presso l'IRCCS San Raffaele per comprendere quantitativamente gli effetti delle terapie per l'arto superiore.

L'attività di ricerca del 2022 ha riguardato attività sperimentale di acquisizione su soggetti sani, con malattia di Parkinson e con ictus cerebrale.

Lo studio integra un sistema ecologico di unità di misura inerziale (IMU) per l'analisi del cinematica della parte superiore del corpo durante l'esecuzione di una versione targeted di BBT, da parte di persone normodotate con soggetti con malattia di Parkinson (PD). Parametri descrittivi degli angoli articolari (angolo medio e range di movimenti) e di indici cinematici della traiettoria della mano (velocità media, accelerazione media e jerk adimensionale) sono stati calcolati dai segnali acquisiti da una rete composta da 7 IMU. I sensori sono stati applicati sul tronco, testa e arto superiore per caratterizzare la strategia motoria utilizzata durante l'esecuzione della BBT.

Criteri per il reclutamento del Gruppo di controllo (CG): soggetti adulti normodotati tra i 60 e gli 80 anni senza patologie degli arti superiori (danno neurologico periferico, gravi malattie infiammatorie degenerative articolari, frattura, o risultati di traumi), deficit cognitivo e/o visivo grave.

Criteri per il reclutamento del Gruppo Malattia di Parkinson (PDG): diagnosi di PD idiopatica secondo i criteri della UK Brain Bank; Hoehn e Yahr- H&Y fase 2–3; di età compresa tra i 50 e gli 80 anni; in grado di mantenere una posizione seduta su a sedia senza supporto per almeno 30 min; moderato deficit delle prestazioni motorie degli arti superiori correlato alla malattia; trattamento farmacologico stabilizzato.

Criteri per il reclutamento del Gruppo con esiti di ictus cerebrale: stato cognitivo tale da consentire la comprensione e la successiva corretta esecuzione dell'attività motoria richiesta durante l'esecuzione del BBT; età maggiore di 18 anni; soggetti post-ictus con esiti neurologici a carico dell'arto superiore; emiparesi misurata con Fugl-Meyer Assessment Upper Limb (FM-UL) moderata ( $22 < FM-UL \leq 44$ ) o lieve ( $FM-UL > 44$ ); Modified Ashworth Scale (MAS) delle principali componenti (spalla, gomito e polso) dell'arto superiore  $< 3$ .

Tre soggetti con PD, tre soggetti normodotati e cinque soggetti con stroke sono stati arruolati nello studio nel 2022.

L'attività di ricerca proseguirà nel 2023 e riguarderà il reclutamento di ulteriori soggetti normodotati, con malattia di Parkinson e con esiti da ictus cerebrale. L'analisi comparativa dei dati permetterà, quindi, di caratterizzare in modo quantitativo e oggettivo le strategie di esecuzione del task motorio nei diversi gruppi di soggetti.

### *Studio epidemiologico riabilitativo nelle persone con Ictus Cerebrale*

La messa a punto di strumenti di monitoraggio per la definizione della qualità dell'assistenza, dei percorsi e degli esiti in termini di autonomia e partecipazione delle persone con disabilità di interesse riabilitativo come ad esempio Ictus Cerebrale, Mielolesioni e/o Patologie Traumatologiche-Ortopediche è di grande importanza al fine di definire una corretta programmazione sanitaria. Solo in questa modalità è possibile garantire il miglior livello di salute e qualità della vita delle persone che per diverse cause si trovino improvvisamente in una condizione fisica alterata, con ridotte capacità funzionali ed autonomia. Di fondamentale importanza è anche la valutazione degli esiti dell'assistenza dopo il trattamento sanitario ospedaliero (fase acuta e fase riabilitativa) al fine di ottimizzare i percorsi di cura e migliorare gli esiti clinici. La creazione e mantenimento di una corretta rete di servizi dall'ospedale al territorio (domicilio o strutture sociosanitarie) è momento fondamentale per un buon intervento riabilitativo globale.

A tal fine, lo studio degli indicatori di outcome più sensibili e significativi all'inizio dell'evento morboso e all'ingresso nelle strutture dedicate specificatamente alla riabilitazione, assieme alla definizione corretta e precisa degli outcome, possono consentire di individuare i percorsi migliori per ottenere una riduzione, nei limiti del possibile, delle limitazioni e delle restrizioni di autonomia e partecipazione. Lo studio, infine, degli esiti a distanza di tempo (follow-up) potrà fornire informazioni circa i limiti degli interventi non solo presenti in fase acuta e post-acuta ma anche e soprattutto sul territorio e a domicilio. Solo così si potrà cercare di ottimizzare e finalizzare al meglio la rete dei servizi riabilitativi. È ormai noto e ricco di evidenze scientifiche l'aspetto che assume la precocità dell'intervento riabilitativo. Questo deve essere il più appropriato e specifico in ogni fase del percorso assistenziale della persona: fase acuta di emergenza, fase propria riabilitativa, fase territoriale. La natura dell'intervento riabilitativo è diversa sia per contenuti che per necessità di tempi di intervento in ognuna di queste fasi, ma se include tutto quello che è necessario ed utile in quel momento, anche se l'intervento potrebbe sembrare limitato, può determinare un ottimo risultato al follow-up. Un esempio su tutti è l'importanza di un semplice atto riabilitativo in senso lato cui spesso possono attendere gli Infermieri dei reparti, se ben addestrati ad una cultura di nursing riabilitativo. Questo consiste in una rapida mobilitazione con passaggio alla posizione seduta, appena possibile, della persona coinvolta nell'evento lesivo già a poche ore/giorni dall'episodio acuto.

La raccolta di una coorte di soggetti con esiti di patologia neurologica disabilitante come ictus cerebrale o mielolesione può consentire una raccolta di dati dalla fase acuta e dalla fase riabilitativa al domicilio. Di grande interesse per una struttura riabilitativa di tipo intensivo (codice 56) è anche l'analisi dei dati dei pazienti ricoverati con patologie neurologiche degenerative ed ortopediche. I dati raccolti dovranno includere sia aspetti sociodemografici che clinici intesi sia come interventi clinico-chirurgici che riabilitativi e sociali. Dati importanti circa l'organizzazione riabilitativa nelle strutture proprie dedicate alla riabilitazione intensiva potrebbero emergere da questa raccolta di dati sia prospettici che retrospettivi. Un aspetto che assume sempre più grande utilità ed interesse sarà poi il monitoraggio dei tempi di passaggio tra le varie strutture: Reparti dell'acuzie, Reparti Riabilitativi e Territorio. Infatti, è ormai sempre più evidente che la precocità dell'intervento riabilitativo assume un ruolo importante rispetto l'outcome a distanza di tempo. In dettaglio è in corso uno studio con cui sono stati esplorati nelle lesioni midollari i fattori che incidono su di un miglior recupero nelle persone con lesione postraumatica ricoverate in strutture specializzate per la cura di queste persone in fase post acuta. Si analizzano anche le motivazioni dei rientri (fase cronica) negli stessi centri specializzati di persone con tetra e paraplegia. Verranno esplorati anche gli interventi eseguiti e quali fattori incidono maggiormente nel prolungare la degenza di queste persone che rientrano in fase cronica per "complicanze" durante la permanenza a domicilio. Viceversa, nelle persone con limitazioni funzionali di altra origine neurologica (Ictus Cerebrale, Sclerosi a Placche, Malattia di Parkinson etc.) o di origine ortopedica (esiti di fratture di femore, di interventi chirurgici di elezione per protesi di anca o ginocchio etc..) si studiano i fattori che incidono su un buon recupero funzionale valutato con la Barthel Index modificata, evidenziando, in particolare, l'andamento clinico differente tra le varie patologie causa di disabilità.

Lo studio si prefigge di verificare quali indicatori (sociodemografici e clinici) presenti all'ingresso siano più significativi nel predire un buon recupero in termini di capacità funzionali, partecipazione e rientro al proprio domicilio o in quello di famigliari. Intende anche verificare anche se la rete dei servizi analizzata nello studio mostri delle limitazioni o mancanza di appropriatezza di intervento.

Lo studio dovrebbe mettere in evidenza quella che è la situazione delle persone registrate nel periodo di osservazione fino al controllo alla fine del medesimo. Ci si attende di raccogliere dati consistenti rispetto alle variazioni cliniche in riferimento ai fattori presenti all'inizio

dell'osservazione che hanno svolto un ruolo importante nel conseguimento del miglioramento clinico o meno.

Ci si aspetta anche di poter avere dati circa la presenza di complicanze all'inizio del trattamento riabilitativo e durante il medesimo con l'analisi anche di come si modificano alla dimissione. Questo dato dovrebbe trovare una correlazione con i dati di percorso come possibile causa della presenza di tali menomazioni secondarie all'ingresso in riabilitazione.

Infine, un risultato potenzialmente presente al termine della ricerca è la messa in luce delle falle nella rete dei percorsi per il paziente.

L'aspetto innovativo di questo studio consiste nel verificare sul territorio nazionale, su una coorte di persone sufficientemente rappresentativa, se i dati registrati già in fase acuta, oltre che all'ingresso nelle Unità Operative di Medicina Riabilitativa, possano fornire degli indicatori attendibili circa una prognosi funzionale e la possibilità o meno di rientro nel proprio ambito domestico. Un altro aspetto significativo è rappresentato dall'ottenere dati significativi circa la modulazione futura di reti riabilitative sempre più efficaci ed efficienti.

L'uso di protocolli di valutazione standardizzati è fortemente raccomandato per identificare i bisogni del paziente e per predire le risposte a interventi specifici nella riabilitazione post-ictus. Nel 2008 la Società Italiana di Fisica e Riabilitazione Medicina (SIMFER) ha pubblicato il protocollo di minima per la persona con ictus (PMIC), in riferimento alla ICF. Nel 2019, la SIMFER ha nominato un gruppo di lavoro (WG) per fornire una revisione e una versione aggiornata in linea con la più recente letteratura e adatta a tutte le riabilitazioni: PMIC2020. È stato condotto uno studio descrittivo basato sul consenso di un panel di esperti su persone con disabilità sopravvissute a un ictus. Il coordinatore della Sezione nazionale Stroke SIMFER ha nominato il WG composto dagli 8 membri del consiglio della Sezione Stroke e altri 4 esperti (3 fisiatristi; 1 neurologo). È stata condotta un'ampia revisione della letteratura internazionale sulla valutazione dell'ictus e sulle raccomandazioni.

Il PMIC2020 è un modulo unico, da somministrare in qualsiasi momento del percorso riabilitativo, comprensivo di un insieme minimo di variabili, costituito da una sezione demografica/anamnestica e una sezione valutazione clinica/funzionale. Di recente gli strumenti introdotti includono misure di malnutrizione (BMI<18,5); dolore nei pazienti verbali e non verbali (Numeric Rating Scale-pain, Pain Assessment in Advanced Dementia Scale); impairment neurologico (National Institute of Health-stroke scale); attività (Modified Barthel Index, Short Physical Performance Battery); e partecipazione (Frenchay Activity Index). Il PMIC2020 fornisce uno strumento aggiornato per la valutazione multidimensionale riabilitativa del paziente post-ictus, in qualsiasi fase del percorso riabilitativo; esso mira a fornire un insieme minimo condiviso di variabili che definiscono i bisogni e gli esiti del paziente in diverse strutture e contesti riabilitativi.

Sono stati reclutati trenta pazienti con esiti di ictus cerebrale, di cui ventotto valutati sia all'ingresso che prima della dimissione.

### *Validazione di misure di outcome in riabilitazione*

Nella pratica clinica riabilitativa, l'atto di misurare riveste un ruolo fondamentale; lo scopo di qualunque intervento riabilitativo è quello di determinare un cambiamento positivo nello stato di salute del paziente. Se lo strumento di misura non è in grado di cogliere questo cambiamento, il clinico non può considerare come migliorato lo stato di salute del paziente. Stessa importanza si rileva in ambito di ricerca clinica, politica sanitaria e audit clinico (Küçükdeveci et al., 2011).

Gli strumenti di misura che possono essere utilizzati in campo riabilitativo possono essere suddivisi in strumentali (per esempio l'elettromiografia) – che nella riabilitazione rivestono un

ruolo marginale – e clinici (Streiner& Norman, 2008). Tra gli strumenti clinici, oltre a test funzionali (come il 6 Minute Walking Test) e i test clinici (come il Test di McMurray per la valutazione dei menischi), si trovano anche le scale di valutazione o i questionari che permettono la raccolta di variabili latenti, ovvero che non sono percepibili direttamente dai sensi umani (per esempio la disabilità).

Per effettuare una corretta misurazione, è necessario utilizzare strumenti di misura appropriatamente calibrati sulla variabile da misurare; infatti, è cruciale che lo strumento di misura possieda una certificazione della sua corretta calibrazione. Quando si parla di variabili di interesse riabilitativo, dobbiamo considerare le seguenti tre proprietà psicometriche come calibrazione (Mokkink et al., 2010):

- l'affidabilità - indica il grado con il quale una misura è libera dall'errore di misurazione;
- la validità - indica il grado con il quale lo strumento di misura è un appropriato riflesso della variabile che si intende misurare;
- la responsività - è l'abilità di uno strumento di cogliere il cambiamento nel tempo nella variabile misurata.

Molte misure di outcome sono state sviluppate diversi anni fa, quando le conoscenze in questo ambito non erano avanzate come al giorno d'oggi. Pertanto, alcuni strumenti di misura potrebbero non essere calibrati nella popolazione in cui poi lo strumento sarà somministrato.

Il progetto si prefige di studiare le proprietà psicometriche di strumenti di misura già sviluppati e proposti in letteratura utilizzando un approccio classico (CTT, Classical Theory Test) per:

1. Determinare quali sono i punti di forza e debolezza di questi strumenti;
2. Fornire indicazioni su come poter migliorare la struttura interna di questi strumenti.

I dati raccolti saranno analizzati tramite la CTT.

Ci si attende di poter confermare le proprietà di misurazione, oppure raffinare e/o modificare strumenti già in uso nella pratica e nella ricerca clinica in modo da poterli somministrare nella maniera più appropriata possibile.

Questo progetto di ricerca mette a disposizione, sia per clinici che per ricercatori, strumenti di misura che effettivamente soddisfino le proprietà di misurazione, fornendo una quantità precisa della variabile osservata

STUDIO 1: L'obiettivo di questo studio è stato quello di adattare in modo interculturale la versione italiana del Forgotten Joint Score (FJS-I) e studiarne le proprietà psicometriche in pazienti con artroplastica totale dell'anca (THA). Nel 2021, il FJS-I è stato tradotto secondo le linee guida internazionali e somministrato a 111 pazienti con THA, insieme alla Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC), Numerical Pain Rating Scale (NPRS) e EuroQol 5D-5L (EQ-5D-5L). Validità strutturale (Analisi fattoriale di conferma [CFA]), coerenza interna (alfa di Cronbach), affidabilità test-retest (coefficiente di correlazione intraclassa [ICC]), errore di misurazione (errore standard della misurazione [SEM], modifica minima rilevabile [MDC]) e è stata valutata la validità del costrutto (test di ipotesi con correlazione di WOMAC, NPRS ed EQ-5D-5L).

STUDIO 2: Il dolore di spalla causa dolore e limitazioni nei movimenti e influenza le abilità funzionale, lavorative e sportive, così come le attività della vita quotidiana, e di conseguenza impatta sulla qualità di vita dei pazienti. Negli ultimi anni è stato sviluppato un grande numero di questionari per valutare le funzioni e i cambiamenti clinici nei pazienti con problematiche alla spalla. La Patient Specific Functional Scale è una misura di outcome sviluppata nel 1995 con l'obiettivo di costruire una misura standard per registrare le condizioni dei pazienti che avesse le seguenti caratteristiche: applicabile ad un gran numero di presentazioni cliniche, efficiente e facile da somministrare, efficiente ed facile da registrare all'interno di un report medico, affidabile, valida, capace di identificare i cambiamenti nel tempo e in grado di confrontare i

livelli delle attività specifiche per il singolo paziente in un dato momento rispetto al livello pre infortunio o pre-disabilità.

Inizialmente validata per il low back pain, negli anni successivi sono stati effettuati studi per dimostrarne la validità anche in altri disturbi muscoloscheletrici. Validazioni e adattamenti cross culturali sono stati pubblicati in diverse lingue, per diversi disturbi muscoloscheletrici.

Attualmente nessuna traduzione e validazione è stata effettuata in lingua italiana e lo studio si propone come scopo di effettuarne una in pazienti con spalla dolorosa.

Nel corso del 2022, per ciò che concerne lo STUDIO 1, la FJS-I è stata somministrata a 111 pazienti con artroplastica totale d'anca, insieme alla scala WOMAC, la scala NPRS e la scala EQ-5D-5L. Le analisi psicometriche hanno confermato la struttura ad un fattore tramite l'analisi fattoriale di conferma (CFA). La consistenza interna è stata supportata ( $\alpha = 0.944$ ). È stata trovata un'alta affidabilità test-retest (ICC = 0.985; 95% CI, 0.914-0.980), con un SEM e un MDC di 5.3 e 16.6 punti rispettivamente. Tutte le ipotesi a priori sono state confermate, indicato una soddisfacente validità di costrutto. Dunque le proprietà psicometriche della FJS-I sono state confermate e la scala può essere usata per la valutazione del paziente nella pratica clinica.

Nel corso del 2022, per ciò che riguarda lo STUDIO 2, sono stati reclutati e valutati 19 pazienti con spalla dolorosa. La raccolta dei dati è stata effettuata con una CRF dedicata ed anonimizzata, un registro master è tenuto a cura del principal investigator. Lo studio ha quindi concluso la fase di arruolamento con 109 soggetti. Nel 2023, si proseguirà con l'elaborazione ed analisi dei dati raccolti. I risultati saranno interpretati e verrà preparato il manoscritto per la pubblicazione sulle riviste internazionali impattate.

#### *Valutazione multimodale del movimento in soggetti con patologie disabilitanti di interesse riabilitativo*

La valutazione dello stato motorio e funzionale del paziente preso in carico da una struttura riabilitativa come l'IRCCS San Raffaele è di cruciale importanza sia per definire il progetto riabilitativo, che per comprendere gli effetti di tale progetto.

In letteratura scientifica e nella pratica clinica, sono spesso utilizzate scale e indici di valutazione standardizzati e specifici per ogni patologia. In questo contesto, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha definito un linguaggio standard e unificato per la descrizione della salute e degli stati ad essa correlati: la Classificazione Internazionale del Funzionamento, della Disabilità e della Salute (ICF). Nonostante tale valutazione sia ufficializzata, standardizzata, e ampiamente utilizzata in ambito riabilitativo, si sente sempre di più la necessità di misurare le capacità motorie del paziente in modo quantitativo, oggettivo e sensibile (Zhou & Hu, 2008). In questo contesto, l'introduzione delle nuove tecnologie all'interno delle strutture cliniche, come l'IRCCS San Raffaele, permette di analizzare il movimento del paziente durante l'esecuzione di compiti motori specifici in modo da ottenere informazioni quantitative su "quanto e come" il paziente si muove.

La valutazione strumentale del movimento è di tipo multimodale, in quanto permette di valutare differenti aspetti relativi all'esecuzione del task motorio: cinematica (analisi stereofotogrammetrica o con sensori inerziali); dinamica (analisi delle forze scambiate mediante celle di carico); elettrofisiologica (analisi dei segnali associati ad attività elettrica muscolare o corticale). Se da un lato la letteratura sull'analisi del movimento è molto ampia e ben consolidata, la sua introduzione in ambiente clinico trova delle resistenze legate alla comprensione del dato ottenuto da parte del personale sanitario (Simon 2004).

Gli obiettivi specifici di questo progetto sono:

1) incentivare l'utilizzo del laboratorio di analisi del movimento per una valutazione oggettiva e quantitativa dello stato motorio del paziente;

- 2) analizzare i dati relativi alla cinematica, dinamica e elettromiografia di superficie (sEMG) durante task motori standardizzati (cammino, postura ortostatica) in soggetti con differenti patologie (sia adulti che pediatrici) in modo da caratterizzarle;
- 3) valutare possibili cambiamenti strumentali negli schemi motori, con particolare attenzione al cammino, dovute a terapie riabilitative di tipo robotico o all'utilizzo di protesi o ortesi;
- 4) definire nuovi indici sintetici e standardizzati per una comprensione rapida e accurata della qualità del movimento eseguito dal paziente;
- 5) sviluppare nuove metriche standardizzate (biomarcatori) ottenute dalla fusione di dati eterogenei per l'analisi del cammino (cinematica, dinamica, sEMG) al fine di sintetizzare le differenze tra il soggetto in analisi e i dati normativi.

Al termine del progetto si otterrà:

- 1) un database di dati e segnali acquisiti durante l'esecuzione di task motori di interesse (sia degli arti superiori che inferiori) da parte di un sostanziale numero di soggetti con differenti patologie e età;
- 2) una caratterizzazione delle patologie in base alla modalità di esecuzione di task motori standardizzati (cammino, postura ortostatica);
- 3) la valutazione oggettiva e quantitativa dell'efficacia di terapie riabilitative innovative e dell'uso di protesi o ortesi;
- 4) l'introduzione e l'utilizzo in pratica clinica di nuovi indici e biomarcatori di valutazione del movimento.

La letteratura sulla riabilitazione degli arti superiori assistita da robot ha mostrato che le metriche misurate da robot possono predire gli outcome clinici. Tuttavia, solo un numero limitato di studi ha correlato la cinematica pre-trattamento con il recupero motorio alla dimissione. Data l'importanza di predire gli outcome della riabilitazione per ottimizzare la terapia, è necessario un modello predittivo per il recupero motorio che includa indicatori multidirezionali delle capacità dell'arto superiore di un paziente. Lo scopo di questo studio era sviluppare un modello predittivo per l'outcome della riabilitazione alla dimissione (cioè la forza muscolare valutata dal Motricity Index dell'arto superiore) basato sulla cinematica multidirezionale 2D misurata dal robot. È stata eseguita una nuova analisi dei dati di 66 soggetti con ictus subacuto sottoposti a terapia assistita da robot dell'arto superiore con un robot end-effector. Sono stati sviluppati due modelli di regressione lineare multipla con errore dei minimi quadrati per la previsione dei risultati, che differiscono in termini di procedura di convalida: il modello Split Sample Validation (SSV) e il modello Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV). In entrambi i modelli, gli output erano i Motricity Index dell'arto superiore interessato e i suoi sotto-elementi che valutavano la flessione del gomito e l'abduzione della spalla, mentre gli input erano le metriche misurate dal robot alla baseline.

I parametri estratti misurati dal robot hanno spiegato rispettivamente il 54% e il 71% della varianza negli outcome clinici alla dimissione nelle procedure di convalida SSV e LOOCV. Gli errori normalizzati variavano dal 22% al 35% nei modelli SSV e dal 20% al 24% nei modelli LOOCV. In tutti i modelli, l'errore di movimento delle traiettorie caratterizzate dalla flessione del gomito e dall'estensione della spalla era il predittore significativo e tutte le correlazioni erano significative.

Questo studio evidenzia che i modelli motori valutati con metriche multidirezionali 2D misurate da robot sono in grado di predire la valutazione clinica della forza muscolare degli arti superiori alla dimissione e possono essere utili per i medici per valutare, gestire e programmare una riabilitazione più specifica e appropriata nei pazienti con ictus subacuto.

**AREA DI RICERCA CENTRO DI RICERCA CLINICA E SPERIMENTALE**

*Valutazione prospettica di parametri innovativi di rischio cardiovascolare in pazienti con aumentato rischio cardiovascolare e/o malattie cardiovascolari.*

Le malattie cardiovascolari (CV), in particolare scompenso cardiaco, ipertensione arteriosa, angina pectoris, fibrillazione atriale, malattia coronarica e cardiopatia valvolare, rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale, in entrambi i sessi, e la loro incidenza è destinata ad aumentare nei prossimi decenni.

L'attuale sistema di prevenzione basato sulla stratificazione del rischio non è capace di stimare in maniera ottimale il rischio, sottostimandolo in popolazioni ad alto rischio CV e sovrastimando il medesimo in popolazioni a basso rischio CV, e inoltre non tiene conto del diverso impatto che i fattori di rischio CV e le risposte ai trattamenti farmacologici, hanno nei due sessi. Tutto ciò impone la ricerca di nuovi parametri con un valore prognostico forte, anche basato sulle differenze di genere.

Negli ultimi anni lo studio della funzione endoteliale e della elasticità vascolare e nuovi biomarkers hanno dimostrato la possibilità di predire il rischio cardiovascolare futuro indipendentemente dai classici fattori di rischio sia in prevenzione primaria sia secondaria nella popolazione generale e nei pazienti con malattie CV, pur non rivelando ancora differenze di genere nel determinismo della importanza prognostica anche di questi nuovi fattori di rischio.

Inoltre, se la riabilitazione cardio-metabolica si è dimostrata capace di ridurre l'incidenza di eventi CV, non è ancora noto l'impatto che una stratificazione del rischio elaborata utilizzando anche i nuovi parametri suddetti possa avere sulla risposta alla riabilitazione.

Lo studio, di tipo osservazionale longitudinale prospettico, prevede l'arruolamento di un minimo di 100 e fino a un massimo di 200 soggetti/pazienti anno, di ambo i sessi, età 18-80 anni, diagnosi di malattia CV (in particolare scompenso cardiaco, ipertensione arteriosa, angina pectoris, fibrillazione atriale, malattia coronarica e cardiopatia valvolare, etc.) o presenza di malattia dismetabolica (metabolismo glucidico o lipidico) afferenti al Dipartimento di Scienze Cardiologiche e Respiratorie dell'IRCCS San Raffaele.

Le malattie cardiovascolari (CV) rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale, in entrambi i sessi, con crescente incidenza. L'attuale sistema di prevenzione e valutazione del rischio di CV non tiene conto dell'impatto differenziale che i fattori di rischio e le risposte ai trattamenti farmacologici hanno nei due sessi. La ricerca di parametri innovativi ad alto valore prognostico, anche basati sulle differenze di genere, è perciò di primaria importanza. Negli ultimi anni lo studio della funzione endoteliale e della elasticità vascolare e nuovi biomarkers hanno dimostrato la possibilità di predire il rischio cardiovascolare futuro indipendentemente dai classici fattori di rischio, pur non rivelando ancora differenze di genere nel determinismo della importanza prognostica anche di questi nuovi fattori di rischio.

Obiettivi primari:

1. valutare prospetticamente la rilevanza di parametri innovativi di rischio CV;
2. valutare l'effetto dell'esercizio fisico in pazienti con aumentato rischio e/o malattie CV;
3. valutare il rischio di insorgenza di eventi CV futuri in pazienti con aumentato rischio CV e/o malattie CV;
4. identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore) e/o di indici precoci di aterosclerosi (stiffness e funzionalità vascolare, microalbuminuria e nuovi biomarcatori) in pazienti a basso rischio CV.

Obiettivi secondari:



1. valutare la concordanza di diverse carte del rischio CV (SCORE e carta del Rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità) in una popolazione di soggetti a basso rischio;
2. valutare prospetticamente l'effetto dell'aderenza alle diverse strategie di prevenzione e/o di intervento (educazionali e/o terapeutiche) riabilitativo.

#### Expected outcomes

1. Valutare prospetticamente la modificazione dei fattori di rischio CV, da soli o in associazione a nuovi fattori di rischio emergenti.
2. Identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore, tempo di inizio della menopausa) e/o indici precoci di morbidità cardiovascolare (stiffness e funzionalità vascolare, biomarcatori).
3. Definire prospetticamente il ruolo e l'importanza della associazione dei fattori di rischio tradizionali ed emergenti nella progressione delle malattie CV.
4. Implementare il dialogo fra diversi specialisti (medici di medicina generale, internisti, cardiologi, ginecologi, etc) al fine di ottimizzare le strategie di prevenzione e/o intervento nei pazienti ad aumentato rischio cardiovascolare.

I pazienti vengono sottoposti a una valutazione basale del rischio individuale di eventi CV (morte, infarto del miocardio o ictus) per mezzo di carte del rischio CV validate (carta SCORE e carta del rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità), e a una valutazione dei fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, valutazione della qualità di vita (mediante WHOQOL test), valutazione dello stato cognitivo (mediante MMSE test), valutazione dello stato dell'umore (mediante GDS test) e valutazione dei disturbi del desiderio sessuale (Hypoactive Sexual Desire Disorder - IIEF). Inoltre i pazienti sono sottoposti a una valutazione della funzionalità e morfologia del cuore (ecocardiogramma), alla registrazione grafica dell'attività elettrica del cuore (elettrocardiogramma) e suo monitoraggio nelle 24 ore (ECG Holter delle 24 ore con valutazione di Heart Rate Variability), degli indici precoci di aterosclerosi (stiffness vascolare, valutazione della velocità dell'onda di polso e della pressione aortica centrale, mediante devices dedicati, quali il Complior e lo Sphygmocor), della funzione endoteliale (mediante EndoPAT, pletismografia e/o metodica ecografica), di parametri basali (peso, altezza, circonferenza vita e fianchi e misurazione della pressione arteriosa). Infine i pazienti sono sottoposti ad un prelievo di sangue (due aliquote di sangue sono trasferite in bio-banca) e alla raccolta delle urine. Tutti i pazienti sono sottoposti ad un ecocardiogramma Doppler, colorDoppler con valutazione di parametri emergenti di contrattilità loco-regionale e di flusso intracardiaco e ad un test da sforzo con, quando appropriato, uno studio del consumo di ossigeno.

I soggetti con aumentato rischio cardiovascolare ed i pazienti con malattie cardiovascolari e/o metaboliche vengono sottoposti, a discrezione del medico, a prova da sforzo con o senza consumo di ossigeno, ecocardiogramma, ecoDoppler vascolare, monitoraggio ambulatoriale dell'ECG o della Pressione Arteriosa, TC cardiaca, RMN cardiaca. Le suddette valutazioni verranno ripetute annualmente durante il follow-up. I pazienti vengono quindi inclusi in un programma di riabilitazione cardiometabolica che include dieta individualizzata ed esercizio fisico commisurato alle capacità funzionali.

Ad ogni visita annuale, atta a valutare eventi e stato di salute, verrà effettuato il calcolo del rischio cardiovascolare.

Il periodo di reclutamento previsto è di 48 mesi ed il follow-up minimo per ciascun soggetto/paziente è di dieci anni.

Lo studio è stato interrotto causa epidemia COVID-19 nel Febbraio 2020 e riattivato a seguito della progressiva riattivazione dei servizi ambulatoriali.

*Studio dei fattori psicologici e neuropsicologici e loro impatto su aderenza terapeutica, prognosi e qualità di vita in pazienti con malattie cardiovascolari: fattori di rischio, di protezione e implicazioni terapeutiche*

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale e la loro incidenza è destinata ad aumentare nei prossimi decenni. Nel caso delle patologie cardiovascolari sono presenti fattori di rischio di diversa natura; alcuni non sono modificabili, mentre altri hanno ampi margini di cambiamento. A tal fine, hanno ricevuto sempre più attenzione nell'ambito della ricerca scientifica i fattori di rischio modificabili collegati allo stile di vita poco salutare (dieta irregolare, scarsa attività fisica, abuso di sostanze alcoliche, tabagismo, stress). Di conseguenza, vi è un crescente riconoscimento dell'importanza dei fattori psicologici nelle patologie cardiovascolari, data la loro associazione con i comportamenti di rischio e l'impatto negativo sulla prognosi e sulla qualità di vita.

Numerose ricerche hanno messo in evidenza il ruolo della depressione come fattore di rischio per lo sviluppo di patologie cardiovascolari e fattore predittivo di cattiva prognosi. Altamente correlati ai disturbi depressivi sono i disturbi d'ansia, particolarmente comuni tra gli individui affetti da malattia cardiovascolare. Nonostante l'impatto di questa variabile sia stato meno studiato rispetto a quello della depressione, diverse sono le evidenze empiriche che dimostrano come i disturbi d'ansia possano costituire un fattore predittivo di cattiva prognosi sia a seguito di un evento acuto che nei pazienti cronici.

Inoltre, è ben nota l'associazione tra fattori psicologici (ansia, depressione, non accettazione della patologia cardiaca) e scarsa aderenza ai farmaci nei pazienti cardiovascolari. Ciò è di notevole importanza nel caso dei pazienti cronici che, in conseguenza delle numerose ricadute e dei molteplici ricoveri ospedalieri, risultano meno propensi all'alleanza terapeutica, che è anche un fattore predittivo di cattiva prognosi.

Per tutte queste ragioni, le Linee Guida Internazionali sulla Riabilitazione Cardiaca e le linee guida italiane di cardiologia riabilitativa e prevenzione secondaria delle malattie cardiovascolari suggeriscono una valutazione multidimensionale volta all'individuazione non solo dei deficit ma anche delle risorse psicologiche e cognitive del paziente cardiovascolare.

Un'area di ricerca in espansione riguarda lo studio dei fattori cognitivi come fattore di rischio delle malattie cardiovascolari. I pazienti cardiovascolari sono a elevato rischio di disturbi neuropsicologici, come dimostrato nel Maastricht Study (Zhou et al. 2019). Il deficit cognitivo rappresenta un problema rilevante, predittivo di mortalità e disabilità, nei pazienti con malattie cardiovascolari, tanto da far sì che negli anni si sia introdotto il concetto di demenza "cardiaca" o demenza "circolatoria".

Per questi motivi, il presente studio è volto ad esaminare in maniera trasversale e longitudinale i fattori psicologici e cognitivi in una popolazione selezionata di pazienti con diagnosi di malattia cardiovascolare. Lo studio prevede l'arruolamento di un minimo di 50 e fino a un massimo di 200 soggetti di controllo/pazienti anno, di ambo i sessi, età 18-80 anni, con diagnosi di malattia cardiovascolare (scompenso cardiaco, ipertensione arteriosa, angina pectoris, fibrillazione atriale, malattia coronarica e cardiopatia valvolare, etc.) in assenza di altre malattie gravi (es tumori), afferenti al Dipartimento di Scienze Internistiche dell'IRCCS San Raffaele, seguiti longitudinalmente per 12 anni.

La prima ipotesi è quella di una maggiore prevalenza nei pazienti con diagnosi di malattia cardiovascolare rispetto ai soggetti di controllo dei fattori psicologici riportati dalla letteratura come associati alle patologie cardiovascolari. In particolare ci si aspetta una maggiore prevalenza nel primo gruppo di ansia, depressione, rabbia, ritiro sociale e minori livelli di benessere soggettivo.

Si intende testare l'ipotesi secondo la quale il gruppo di pazienti con malattia cardiovascolare presenti inoltre una maggiore prevalenza di sintomi cognitivi descritti in letteratura come associati a ridotta funzionalità sottocorticale (rallentamento ideomotorio, deficit nelle funzioni esecutive, disturbi dell'attenzione e del ragionamento complesso) ma si esplora anche -senza ipotesi a priori- l'eventuale presenza di differenze tra i pattern neuropsicologici confrontando le patologie cardiache tra loro.

Si ipotizza inoltre che depressione, ansia e deficit cognitivi siano predittori significativi di scarsa prognosi, scarsa compliance farmacologica e peggiore qualità di vita nei pazienti con malattia cardiovascolare.

Si intende testare l'ipotesi che pazienti con malattia cardiovascolare acuta e cronica differiscano tra loro per pattern comportamentali e neuropsicologici. L'ipotesi è che ci sia una maggiore prevalenza nel secondo gruppo di ansia, depressione, ritiro sociale e minori livelli di benessere soggettivo. Si esplora senza ipotesi a priori l'eventuale presenza di differenze tra i pattern neuropsicologici tra i gruppi.

Vengono inoltre confrontati i profili psicologici all'interno di sottogruppi di età e genere, ipotizzando -come da letteratura- una maggiore prevalenza di ansia e depressione nei sottogruppi "fragili" (soprattutto gli anziani e coloro con deterioramento cognitivo) e nelle donne in quanto più longeve ed esposte a maggior rischio di demenza e correlati disturbi comportamentali.

Si intende testare infine l'ipotesi di una possibile correlazione tra indici di funzionalità cardiaca e funzioni cognitive e sintomi psicologici, controversa attualmente in letteratura.

Il presente studio osservazionale si compone di una parte trasversale e una longitudinale-prospettica, e a sua volta di una parte hypothesis-driven e di una parte esplorativa.

Il primo obiettivo consiste nel valutare i fattori psicologici e cognitivi confrontando un gruppo di pazienti affetti da patologie cardiovascolari con un gruppo di controllo, ovvero non affetto da patologie di tipo cardiovascolare né di altra natura. L'ipotesi da testare è quella di una maggiore prevalenza nel primo gruppo dei fattori psicologici e neuropsicologici riportati dalla letteratura come associati alle patologie cardiovascolari.

Il secondo obiettivo consiste nel confrontare i profili psicologici e cognitivi di pazienti affetti da diverse forme di patologia cardiovascolare, distinguendo fra diagnosi di malattia acuta e di malattia di tipo cronico. Vengono inoltre effettuati confronti dei profili psicologici e neuropsicologici per sottogruppi di età e genere. Si provvede così alla sottotipizzazione di pazienti "ad alto rischio" di vulnerabilità psicologica e cognitiva ("frailty"). Lo scopo è l'identificazione di un fenotipo di paziente cardiovascolare "fragile".

Il terzo obiettivo intende valutare l'impatto dei fattori psicologici e cognitivi sulla aderenza farmacologica e sulla qualità di vita. Si ipotizza che depressione, ansia e deficit cognitivi siano predittori significativi di scarsa compliance farmacologica e peggiore qualità di vita nei pazienti con malattie cardiovascolari.

Il quarto obiettivo consiste nel valutare longitudinalmente l'impatto dei fattori di rischio sulla prognosi, a medio e lungo termine. Si ipotizza una relazione diretta tra ansia, depressione e peggiore prognosi nei pazienti con malattie cardiovascolari.

Il quinto obiettivo consiste nel valutare longitudinalmente, in un sottogruppo di pazienti che accettano di sottoporsi a un ciclo di sedute psicoterapeutiche, l'effetto di un intervento psicologico a breve termine sul miglioramento della compliance farmacologica (laddove presente scarsa compliance al baseline) e della qualità di vita. Tale parte dello studio è da considerarsi esplorativa ed ha come finalità quella di fornire risultati preliminari da approfondire in un ulteriore studio.

Risultati attesi:

1. Identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psicologici, sintomi cognitivi anche sotto-soglia) sugli outcomes cardiovascolari, aderenza farmacologica e qualità di vita.
2. Identificare il fenotipo di paziente cardiovascolare “fragile”. Ci si aspetta, in base ai dati di letteratura esistente, che il paziente “fragile” sia anziano, affetto da patologia cardiaca cronica, affetto da comorbidità, con ridotta funzione cardiaca, deficit cognitivo e disturbi comportamentali.
3. Valutare prospetticamente l’andamento dei fattori di rischio psicologici e cognitivi nel tempo.
4. Definire prospetticamente il ruolo e l'importanza della associazione dei fattori di rischio tradizionali ed emergenti nella progressione delle malattie cardiovascolari.
5. Implementare il dialogo fra diversi specialisti (medici di medicina generale, internisti, cardiologi e psicologi) al fine di ottimizzare le strategie di prevenzione e/o intervento nei pazienti con malattia cardiovascolare ad aumentato rischio di demenza e disturbi comportamentali.

I pazienti vengono sottoposti a una valutazione basale della aderenza terapeutica (Indice di Moriski), della qualità di vita (World Health Organization Quality of Life assessment -WHOQOL test), della depressione (Hamilton Depression Rating Scale - HDRS), dell’ansia (State-Trait Anxiety Inventory -STAI), della rabbia (State-Trait Anger Expression Inventory -STAXI), dei sintomi comportamentali e neuropsichiatrici (Neuropsychiatric Inventory Questionnaire –NPI (da sottoporre al caregiver se disponibile); della consapevolezza di malattia (Clinical Insight Rating Scale -CIRS).

I pazienti vengono inoltre sottoposti a uno screening dello stato cognitivo (Mini Mental State Examination -MMSE) e a una valutazione neuropsicologica completa (Mental Deterioration Battery –MDB).

I pazienti sono sottoposti a scan della aorta addominale e vascolare periferico (Ecografo con modulo di analisi vascolare), a valutazione della funzionalità cardiaca (Ecocardiografo per frazione di eiezione), della saturazione (saturimetro), ad elettrocardiogramma, e a valutazione della capacità funzionale (Test da sforzo).

Infine i pazienti sono sottoposti ad un prelievo di sangue (due aliquote di sangue saranno trasferite in bio-banca) e alla raccolta delle urine.

I pazienti vengono quindi inclusi in un programma di riabilitazione psicologica.

Le suddette valutazioni vengono ripetute annualmente durante il follow-up. Ad ogni visita annuale, atta a valutare eventi e stato di salute, viene effettuato il calcolo del rischio cardiovascolare, la capacità funzionale ed i parametri di funzionalità ventricolare oltre alle valutazioni neuropsicologiche, comportamentali e dei parametri ematochimici.

Il periodo di reclutamento previsto è di 48 mesi ed il follow-up minimo per ciascun soggetto/paziente è di dieci anni.

## AREA DI RICERCA CEFALEA E DOLORE NEUROPATICO

### *Studio randomizzato sull'efficacia della MBSR (Mindfulness Based Stress Reduction) nella profilassi dell'emicrania episodica ad alta frequenza*

La cefalea è la patologia più diffusa del genere umano secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e colpisce l'individuo nell'età di maggiore produttività (20-50 anni), causando massima disabilità socio-lavorativa ed essendo responsabile del 1-4% degli accessi annuali al Pronto Soccorso [www.org.int]. L'emicrania è la cefalea più comune dopo la cefalea di tipo tensivo e rappresenta la seconda causa di disabilità secondo il Global Burden of Disability. Essa riguarda il 12% della popolazione presentando una chiara preferenza per il sesso femminile (rapporto F/M = 3:1) nel quale giunge ad una prevalenza del 27% nel corso della fase riproduttiva. L'emicrania produce significativa riduzione della qualità di vita soprattutto nella sua forma ad alta frequenza, limitando la partecipazione alle attività quotidiane e incrementando il rischio di sviluppare depressione. Ciò nonostante, l'emicrania è una patologia tutt'ora insufficientemente trattata in senso preventivo dal momento che a fronte di una percentuale di pazienti teoricamente suscettibili di prevenzione pari al 38.8%, solo il 12.4% è in realtà in trattamento profilattico. Questa differenza è in parte spiegabile sulla base della scarsa tollerabilità delle cure preventive. Infatti gli eventi avversi rappresentano non solo un limite prescrittivo per il medico ma anche una causa di frequenti interruzioni precoci del trattamento per eventi avversi farmaco-correlati (topiramato: 23.7%, amitriptilina: 16.7%; propranololo: 7.7%). Infine, esistono importanti limiti nel trattamento farmacologico di profilassi nelle popolazioni più fragili, quali adolescenti, donne in gravidanza, anziani, o pazienti con comorbidità che precludono o limitano l'intervento con farmaci. L'emicrania è una patologia multifattoriale. I fattori stressanti psicosociali rappresentano di gran lunga il primo fattore scatenante dei suoi attacchi ed uno dei principali elementi di cronicizzazione. Ciò rappresenta il razionale scientifico per un intervento preventivo non farmacologico in una patologia a carattere familiare che pur riconosce chiare basi biologiche e neurofisiologiche.

La metodica denominata Mindfulness-Based Stress Reduction (MBSR) è stata inclusa come trattamento non-farmacologico per la riabilitazione del dolore cronico negli ultimi decenni. Il protocollo MBSR è stato ideato nel 1979 dal medico statunitense Jon Kabat-Zinn, presso l'Università del Massachusetts. La Mindfulness (letteralmente: "presenza mentale") è definibile come *"la consapevolezza che emerge se si presta attenzione in maniera intenzionale e non giudicante al dispiegarsi dell'esperienza momento dopo momento"*. Tale definizione introduce due concetti fondamentali: a) l'importanza del porre attenzione al fine di sviluppare consapevolezza e b) la dimensione del non giudizio, così invece fortemente caratterizzante l'esperienza umana. Da qualche tempo l'interesse dei ricercatori è volto a sperimentare la MBSR anche nel campo dell'emicrania e della cefalea di tipo tensivo come approccio terapeutico alternativo o complementare. Il razionale è quello di aumentare la consapevolezza del dolore da parte del paziente cefalalgico, migliorando la capacità di gestione dell'attacco prima di ricorrere al farmaco. Inoltre, essendo lo stress psicosociale il principale fattore scatenante l'emicrania, la provata efficacia del protocollo MBSR nella riduzione dello stress potrebbe permettere di ridurre numero e/o intensità e/o durata degli attacchi. I risultati sembrano essere molto promettenti, specie nelle forme croniche ed in presenza di iperuso di analgesici. Nella cefalea di tipo tensivo cronica, la MBSR si è dimostrata in grado di ridurre significativamente la frequenza dei giorni di cefalea ( $p = 0.016$ ) e di migliorare l'intensità del dolore e la sua consapevolezza ( $p < 0.001$ ). Nell'emicrania cronica, la MBSR ha evidenziato una significativa riduzione della percezione dell'intensità del dolore ( $p \leq 0.001$ ) ed il miglioramento significativo nelle scale di valutazione di benessere fisico, funzionamento sociale e dolore fisico

( $p < 0.05$ ). Un recente studio italiano condotto su 50 emicranici cronici ha evidenziato una sostanziale sovrapposibilità dell'outcome clinico nei trattati con MBSR rispetto a quelli trattati con terapia farmacologica di profilassi. Alle medesime conclusioni è giunto un ulteriore studio su 51 pazienti cefalgici, comprensivo però di soggetti affetti da emicrania, cefalea tensiva e cefalea grappolo. L'impiego della MBSR si è inoltre dimostrato efficace anche in gruppo di 20 adolescenti affetti da emicrania. Nei soggetti trattati si è osservato un miglioramento della qualità della vita e del benessere fisico, riduzione dei sintomi depressivi ed incremento della capacità di accettazione del dolore.

L'obiettivo primario del presente studio consiste nel valutare l'efficacia della MBSR nella profilassi dell'emicrania episodica ad alta frequenza, entità clinica ad alto rischio di trasformazione in forma cronica e di iperuso di analgesici.

La scelta di tale tipologia di paziente è finalizzata ad escludere l'effetto confondente di una eventuale *regression to the mean*, più frequente nelle forme a frequenza bassa e media, nonché ad escludere le forme croniche caratterizzate da diverse comorbidità confondenti che possono inquinare la comprensione del risultato clinico. Inoltre, lo studio consentirà di verificare le correlazioni tra eventuali variazioni dei parametri biologico-molecolare ed il risultato clinico.

I risultati attesi per lo studio riguardano una riduzione della frequenza delle crisi emicraniche di circa il 20%, una riduzione nell'intensità delle stesse ed una migliore gestione degli attacchi.

Questo rappresenta il primo studio randomizzato per valutare l'efficacia della MBSR nella profilassi dell'emicrania in soggetti con alta frequenza di attacchi mediante valutazione clinica e laboratoristica.

Sono randomizzati 100 pazienti, di questi 50 sono randomizzati al trattamento con MBSR e 50 a trattamento farmacologico con SoC. La MBSR si articola in sedute di gruppo della durata di 2 ore e mezza ciascuna, che si ripetono settimanalmente per 8 settimane, comprendendo inoltre una giornata intensiva aggiuntiva di circa 7 ore tra 6° e 7° incontro. Ciascun paziente randomizzato a trattamento con MBSR è inoltre tenuto ad eseguire al proprio domicilio gli esercizi richiesti. Questi ultimi consistono in 30-45 minuti al giorno (6 giorni su 7 per otto settimane) di pratiche formali di meditazione di consapevolezza eseguite seguendo delle tracce audio fornite dalle guide, più delle semplici pratiche informali caratterizzate ad esempio dal compiere con attenzione, momento per momento, una serie di attività abituali, come lavarsi i denti o lavare i piatti. Man mano che il protocollo va avanti, si è incoraggiati a porre lo stesso tipo di attenzione ad eventi che accadono nel mondo esterno, ed in particolare alle situazioni che possiamo percepire come fonte di stress. Viene inoltre valutato tramite citofluorimetria lo stato del sistema immunitario dei soggetti emicranici, con particolare riferimento alle cellule T infiammatorie e regolatorie. I pazienti effettuano i seguenti prelievi seriati di campioni ematici: emocromo, glicemia, ALT, AST, gammaGT, creatinina, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, TSH, eventuale fT4; parametri di infiammazione (IL-6, proteina C Reattiva, rapporto Neutrofili/Leucociti, rapporto Monociti/Piastrine).

Criteri di inclusione:

1. Età compresa tra 18 e 65 anni
2. Diagnosi di emicrania con o senza aura in accordo con i criteri della ICHD-III beta
3. Frequenza di emicrania compresa  $\geq 8$  e 14 gg al mese (emicrania ad alta frequenza) dimostrata nel corso del periodo di 28 giorni di screening
4. Esordio dell'emicrania in età inferiore ai 50 anni
5. Assenza di profilassi emicranica da almeno 30 gg
6. Sottoscrizione di consenso informato scritto

Criteri di esclusione:

1. Diagnosi di cefalea diverse da quelle riportate al punto 2 dei criteri di inclusione

2. Presenza di comorbidità che nel giudizio del medico possano influenzare l'aderenza terapeutica (ad esempio patologie psichiatriche maggiori)
3. Trattamento dell'emicrania con tossina botulinica in un periodo inferiore a 3 mesi
4. Presenza di iperuso di analgesici secondo i criteri della ICHD-III beta
5. Uso di antidepressivi in dose non stabile da almeno 3 mesi oppure di antidepressivi triciclici
6. Uso regolare di benzodiazepine per cause diverse dall'insonnia
7. Presenza di condizioni morbose, terapie o anomalie laboratoristiche di qualsiasi tipo che nel giudizio dello sperimentatore possano rappresentare un ostacolo alla partecipazione allo studio.

Sono stati reclutati 15 pazienti di cui 2 screening failure. Al momento il reclutamento è stato interrotto per analizzare i primi risultati ottenuti e valutare come procedere.

*Studio osservazionale multicentrico italiano, real-life per la conferma a lungo termine dell'efficacia, tollerabilità e sicurezza di Erenumab nella profilassi dell'emicrania episodica e cronica (EARLY STUDY)*

#### **AREA DI RICERCA EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE**

*Terapia riabilitativa personalizzata: Approcci di sistema in "Real Life Medicine"*

Il progetto affronta alcune delle criticità nella gestione di pazienti affetti da "Non-Communicable Diseases" (NCDs). La realizzazione di programmi di riabilitazione integrata è particolarmente importante.

I pazienti sono parte di uno studio di fattibilità di un approccio di Systems Medicine in real life medicine. Gli studi di real life sono un passaggio fondamentale per validare i dati ottenuti dai trial clinici randomizzati che richiedono criteri stringenti di inclusione/esclusione e sono condotti in centri di eccellenza nazionali/internazionali. Di solito è coinvolto l'1% della popolazione con una data malattia, ma i risultati ottenuti sono applicati al 100% dei pazienti. Come esempio di real life medicine il Salford Lung Study è stato designato per una vasta real-world population di pazienti con BPCO in condizioni di "normal care" [Vestbo et al. N Engl J Med. 2016; 375:1253-60]. La Real Life o Real World Medicine è raccomandata dalla European Medicines Agency (EMA) [[http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/committee/stamp/2016-03\\_stamp4/4\\_real\\_world\\_evidence\\_ema\\_presentation.pdf](http://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/committee/stamp/2016-03_stamp4/4_real_world_evidence_ema_presentation.pdf)] e rappresenta uno strumento indispensabile dell'eccellenza nella pratica clinica e conseguentemente determina una migliore qualità delle cure erogate.

Gli obiettivi che il progetto si prefigge di raggiungere sono:

1. Sperimentare e convalidare l'utilizzo di approcci di sistema nella pratica clinica quotidiana all'interno del SSN.
2. Definire gli "outcome" associati al profilo dei "responders" quali: cambiamenti funzionali di organo, valori di laboratorio, scale psicologiche/comportamentali, attività quotidiane, parametri omici validati e selezionati quali SNPs correlati alla risposta alla terapia con glucocorticoidi [Pharmacogenomics J. 2013; 13:306-11; N Engl J Med. 2011; 365:1173-8] e profilo metabolomico.
3. Valutare il ruolo delle comorbidità
4. Costruire un algoritmo preventivo per l'identificazione dei "responders".

Ci si aspetta di poter:

1. Quantificare le risorse necessarie alla implementazione della piattaforma;
2. Valutarne la fattibilità;

3. Testare in un gruppo pilota la possibile efficacia di un intervento globale in confronto all'approccio tradizionale;
4. Studiare e validare i predittori di risposta inclusi OMICS;
5. Creare un algoritmo complesso in grado di predire, all'avvio del trattamento, la risposta del paziente, così come gli eventi avversi. La disponibilità di tale algoritmo è lo strumento iniziale per l'avvio di terapie personalizzate, tarate sui principali predittori di risposta al trattamento integrato. Sebbene gli scopi del progetto siano molti e applicabili a vari campi, la capacità di predire la risposta è quella con maggiori implicazioni cliniche e sicuramente prioritaria.

Negli ultimi anni molte energie sono state investite nella ricerca di sistemi eHealth per una gestione personalizzata del paziente. La maggior parte dei sistemi esistenti si focalizza su uno specifico dominio medico; pertanto l'ipotesi di aggiornare queste piattaforme con l'approccio Rehabilomics creerà nuove linee guida. Si intende sviluppare una nuova architettura progettata per consentire la valutazione multidisciplinare completa del profilo dei pazienti in grado di aggiornare in maniera flessibile i cambiamenti di dominio. Il design specifico della nostra piattaforma è, secondo le sue stesse regole, orientato al paziente che pone il paziente al centro e non la malattia, in una visione osteriana. Per quanto a nostra conoscenza, ad oggi non esiste alcun tentativo di costruire una piattaforma così integrata in Italia. Gli sviluppi recenti hanno preso in considerazione, ad esempio, solo misure strumentali per prevedere le riacutizzazioni della BPCO ottenendo risultati predittivi. La piattaforma rappresenta un approccio rivoluzionario alla profilazione multimodale di pazienti con malattie croniche non trasmissibili in grado di modificare la visione globale della gestione delle stesse. Le informazioni raccolte nell'ambito del progetto possono essere riassunte secondo l'area cui si riferiscono:

Stili di vita ed esposizione ambientale (fumo, dieta, attività lavorativa e ludica);

- Eventi stressanti e relazioni sociali;
- Anamnesi di comorbidità clinica [Charlson comorbidity index (J Chronic Diseases 1987; 40 : 373–83)];
- Valutazione tramite “rating scales” di qualità di vita, abilità della vita quotidiana, stato cognitivo e psicologico, sintomatologia [Quality of life (QoL) attraverso Activities of Daily Living (ADL); Instrumental Activities of Daily Living (IADL); 36-Item Short Form Health Survey (SF-36) General Health and SF-36 Mental Health. Stato cognitivo e psicologico utilizzando: Mini-Mental State Examination (MMSE); Montreal Cognitive Assessment (MoCa); Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D); Zung Self-Rating Anxiety Scale (SAS). Coping strategies utilizzando Brief COPE;
- Valutazione respiratoria (emogasanalisi, spirometria, Medical Research Council (MRC) dyspnea scale, St. George's Respiratory Questionnaire (SGRQ), Maugeri Respiratory Failure (MRF26), Borg and Barthel scales. Functional exercise capacity was measured at baseline and after PR using Six-Minute Walking Test (6MWT);
- Esami strumentali (ECG, pressione arteriosa);
- Visita medica con esame obiettivo;
- Esami ematochimici ed emocromo;
- La disponibilità di campioni raccolti e aliquotati, prima e dopo tre settimane di riabilitazione, per analisi di tipo OMICS è in grado di completare il set di informazioni necessarie per una valutazione personalizzata delle performance di ogni singolo paziente.
- Valutazione degli SNPs mediante real time PCR.
- Il programma di riabilitazione consiste in un periodo di ricovero di tre settimane ed include l'esercizio fisico, il supporto nutrizionale, la gestione delle riacutizzazioni, la



gestione delle dispnea e lo supporto psicologico se necessario. Nel corso della riabilitazione è associata una terapia farmacologica in accordo alle linee guida vigenti.

- Le associazioni relative dei singoli item e le risposte multivariabili sono analizzate in dettaglio utilizzando la regressione logistica multinomiale. Questa tecnica è un metodo di classificazione che permette di utilizzare la regressione logistica ai problemi con più di due variabili ed è utilizzato per predire le probabilità di differenti outcome di una variabile dipendente distribuita in modo categoriale, dato un set di variabili indipendenti. Per le analisi statistiche è utilizzato il software STATA12, and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). La significatività statistica è valutata mediante:  $\alpha$  di Cronbach, per la consistenza interna di specifici test, correlazione di Spearman, test di Student's e Mann-Whitney U. Le differenze nella distribuzione degli studi che analizzano il genotipo sono analizzate mediante Kruskal-Wallis test e Jonckheere-Terpstra trend test.

## AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO

*Applicazione clinica di nuove strategie terapeutiche per la cura di pazienti con malattia di Parkinson: coesistenza di terapie consolidate ed innovazione farmacologica*

Il Centro Parkinson porta avanti progetti innovativi nelle aree clinico-farmacologica, psicologica e riabilitativa nei pazienti affetti da Malattia di Parkinson (MdP). L'esigenza è quella di organizzare ed eseguire a livello locale quanto avviene in ambito nazionale e internazionale, con studi clinici promossi da industrie, società scientifiche, enti di ricerca e singoli ricercatori. Negli ultimi anni il Centro continua a condurre numerose sperimentazioni farmacologiche che possiamo sintetizzare in tre direzioni:

1. Validare sicurezza, tollerabilità ed efficacia di nuove molecole, che si inseriscono sia nell'obiettivo di rallentare/bloccare il decorso della malattia (anticorpi monoclonali in testa) sia nel migliorare i sintomi della malattia già in corso (discinesie, blocchi, disturbi cognitivi, sintomi non motori, ecc).
2. Studiare nuove formulazioni di molecole già consolidate nel trattamento dei sintomi della malattia;
3. Migliorare l'utilizzo di farmaci già utilizzati correntemente alla luce delle maggiori conoscenze acquisite;

**1.** Un meccanismo proposto per spiegare la natura progressiva della MdP è quello dell'aggregazione patologica dell' $\alpha$ -sinucleina modificata; questa si diffonde da cellula a cellula, in maniera analoga ad una trasmissione prionica, ed induce un ripiegamento errato dell' $\alpha$ -sinucleina che porta a degenerazione la cellula dopaminergica. È stato quindi proposto di prendere di mira gli aggregati di  $\alpha$ -sinucleina extracellulari come ipotesi di trattamento modificante il decorso della MdP. Cinpanemab è un anticorpo monoclonale di derivazione umana che si lega preferenzialmente alle forme aggregate di  $\alpha$ -sinucleina extracellulare. È stata condotta una sperimentazione di fase 2a per valutare l'effetto clinico, la sicurezza, farmacocinetica e farmacodinamica del Cinpanemab somministrato per via endovenosa nelle persone con MdP allo stadio iniziale, della durata di 52 settimane; lo studio, multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, è stato condotto in Austria, Canada, Francia, Germania, Israele, Italia, Spagna, Regno Unito Regno e Stati Uniti. Il Trial è stato condotto da gennaio 2018 a aprile 2021, anche durante la pandemia di Covid-19. Un totale di 482 persone con malattia di Parkinson sono state valutate per l'idoneità, e di questi randomizzati 357. Il nostro centro ha partecipato con una significativa casistica di 14 pazienti (2 screening failure per criteri di esclusione). Purtroppo questo studio con Cinpanemab non ha mostrato alcuna prova di beneficio rispetto a placebo per quanto riguarda la clinica, l'imaging o misure di qualità della vita. Ha sicuramente fornito delle informazioni preziose per il miglioramento delle ricerche in questa direzione, che stanno proseguendo con nuovi studi.

Sono stati anche resi noti i risultati di un analogo studio di fase 2a con l'anticorpo Prasinezumab. Anche se l'analisi dei dati non ha mostrato una chiara significatività, il questo anno si è iniziato lo studio di fase 2b. L'attuale studio è progettato per valutare l'effetto del prasinezumab sul rallentamento della progressione clinica, in pazienti con MdP in fase iniziale già trattati con farmaci sintomatici standard (protocollo BN42358). All'IRCCS San Raffaele si stanno seguendo 14 pazienti.

**2.** La levodopa, precursore che viene convertito in dopamina una volta raggiunto il sistema nervoso, è il più potente farmaco dopaminergico disponibile. La maggioranza dei pazienti che rispondono alla levodopa sviluppa complicazioni motorie durante la terapia a lungo termine

caratterizzate da marcate oscillazioni tra stato di immobilità (OFF) e mobilità (ON) (fluttuazioni motorie, wearing-off e fenomeni ON-OFF) e da movimenti involontari (discinesie e distonie). All'origine di tali complicanze motorie ci sono la progressiva riduzione dei recettori dopaminergici, causata dalla progressione della malattia, e la prolungata terapia con levodopa. È dunque cruciale comprendere l'importanza del modo di somministrare i farmaci antiparkinsoniani per prevenire lo sviluppo delle complicazioni motorie e per superare il sopravvenire di OFF improvvisi. Particolare attenzione deve essere volta al ruolo della stimolazione pulsatile dei recettori dopaminergici, provocata dalla ripetuta somministrazione orale di levodopa. Si ritiene, sulla base di studi sull'animale, che la pulsatilità indotta dall'assunzione del farmaco provochi un'alterazione della funzione dei gangli della base, con modificazioni della plasticità recettoriale, caratterizzate generalmente da fenomeni di tolleranza e sensitivizzazione (reverse tolerance). Nel corso di quest'anno sono proseguiti gli studi sulla somministrazione di levodopa in infusione continua sottocutanea, la valutazione di terapie che potenziano l'efficacia della Levodopa agendo su altri sistemi neuro-trasmittoriali o sul catabolismo enzimatico, l'utilizzo di "rescue therapy" in nuove formulazioni (apomorfina sub-linguale) per il superamento di OFF resistenti.

2a. L'infusione continua è considerata la via di somministrazione ottimale per il trattamento di pazienti con fluttuazioni motorie, gli attuali sistemi di infusione richiedono un intervento chirurgico invasivo. L'infusione sottocutanea di levodopa (SC) ha il potenziale per fornire una via di somministrazione continua di levodopa più tollerata e conveniente. ND0612 è in fase di sviluppo come prodotto combinato che fornisce levodopa/carbidopa continua tramite un sistema di rilascio sottocutaneo minimamente invasivo per i pazienti con PD che presentano fluttuazioni motorie. Gli studi clinici di farmacocinetica hanno dimostrato che ND0612, somministrato in modo continuo con una concentrazione di levodopa di 60 mg/ml in combinazione con carbidopa 7,5 mg/ml e integrato con levodopa/carbidopa orale, è adatto per la somministrazione continua di 24 ore in pazienti con malattia di Parkinson. Le concentrazioni plasmatiche stabili di levodopa raggiunte predicono l'utilità di ND0612 come formulazione parenterale per ottenere una somministrazione clinicamente utile di levodopa per i pazienti con PD. Nel corso degli anni precedenti nel centro sono stati seguiti circa 20 pazienti con il trattamento di levodopa sottocute, alcuni dei quali continuano la terapia in fase di esenzione con ottimi risultati.

2b. l'apomorfina per via sottocutanea è approvata per il trattamento on-demand degli episodi di off in pazienti con MdP avanzata, ma la necessità di un'iniezione sottocutanea e dell'iniziale titolazione supervisionata in clinica, i possibili gravi effetti collaterali dopaminergici e il frequente sviluppo di noduli cutanei e ulcerazioni nei siti di iniezione ne hanno limitato la compliance. È stato quindi studiata una nuova formulazione più pratica per i pazienti. L'apomorfina sotto forma di pellicola sublinguale (APL-130277) è una nuova formulazione in pellicola sottile che si dissolve sotto la lingua per un trattamento acuto e intermittente degli episodi di OFF.

APL-130277 ha terminato la fase 3 della sperimentazione clinica in Europa e il centro ha partecipato in maniera diretta in diversi studi sia di efficacia che di sicurezza.

- Valutare i tempi del miglioramento motorio con carbidopa/levodopa (CD/LD) e film sublinguale di apomorfina (SL-APO) in pazienti con MdP ed episodi OFF. Metodi: Un'analisi aggregata post hoc di due studi ha valutato i punteggi della scala di valutazione per i disturbi del movimento Parte III (MDS-UPDRS-III) e i punteggi FULL ON valutati dallo sperimentatore. Risultati: A 15 e 30 minuti dopo la prima dose giornaliera di CD/LD prescritta, i miglioramenti medi nei punteggi MDS-UPDRS-III erano rispettivamente di -6,7 e -16,3 e il FULL ON è stato raggiunto dal 6,5 e dal 41,8% dei pazienti. Dopo una dose ottimizzata di SL-APO, i miglioramenti medi nei punteggi MDS-

UPDRS-III sono stati -13,9 e -22,9 e il FULL ON è stato raggiunto dal 34,7 e dall' 81,0% dei pazienti. Conclusione: la somministrazione concomitante di SL-APO con carbidopa/levodopa può essere utile per l'ON ritardato.

- È stato condotto uno studio randomizzato per valutare gli effetti dell'apomorfina sublinguale (SL-APO) sull'intervallo QT corretto (QTc) e altri parametri di conduzione cardiaca in pazienti con malattia di Parkinson (PD) ed episodi "OFF". I pazienti sono stati titolati a una dose di SL-APO che ha portato ad un FULL "ON", seguita da un massimo di due dosi aggiuntive (massimo 60 mg), quindi randomizzati alla dose più alta tollerata a una sequenza di trattamento di SL-APO, placebo e moxifloxacin (400 mg, controllo positivo) in un disegno di studio crossover a tre vie. Quaranta pazienti sono stati randomizzati e hanno ricevuto dosi singole dei trattamenti in studio. I limiti superiori degli intervalli di confidenza (CI) al 90% per  $\Delta\Delta\text{QTcF}$  di SL-APO erano al di sotto della soglia normativa di 10 millisecondi in tutti i punti temporali prespecificati, non dimostrando alcun effetto clinicamente significativo sul QTcF. I limiti inferiori degli intervalli di confidenza al 90% per  $\Delta\Delta\text{QTcF}$  della moxifloxacin hanno superato la soglia normativa di 5 millisecondi in tutti i punti temporali fino a 3 ore, confermando la sensibilità del test. SL-APO non ha avuto effetti clinicamente significativi su QTcB, intervalli PR/QRS, frequenza cardiaca o morfologia derivata dall'elettrocardiogramma.

3. Gli inibitori enzimatici della dopamina sono una classe di farmaci molto importante per i malati con MdP in quanto permettono di aumentare la biodisponibilità della dopamina endogena e di inibirne il catabolismo. Possiamo distinguere due gruppi:

Gli inibitori delle monoaminoossidasi di tipo B (MAO-B) - il blocco di questo enzima fa sì che l'eliminazione della dopamina si rallenti e ne aumenti la sua permanenza nella sinapsi. Gli inibitori delle MAOB in commercio sono la selegilina, la rasagilina e la safinamide, che oltre alla inibizione MAOB agisce anche sui canali del sodio.

Gli inibitori delle catecol-O-metiltransferasi (COMT) - possono essere bloccate dai farmaci di questa classe per aumentarne la permanenza nel sangue e quindi l'efficacia nel tempo. Questi inibitori vengono usati quando appaiono le fluttuazioni motorie. Gli inibitori COMT in commercio sono il tolcapone (potenzialmente epatotossico e quindi va usato come seconda scelta), l'entacapone (Comtan) e l'opicapone che grazie alla sua azione prolungata permette una monosomministrazione giornaliera.

Il centro ha partecipato a numerosi studi che hanno preceduto l'immissione in commercio di questi farmaci, ed ha proseguito la collaborazione in ulteriori sviluppi ed approfondimenti.

3a. Safinamide è un inibitore MAO B altamente selettivo e reversibile recentemente commercializzato nei paesi europei e nordamericani. Per definire meglio le indicazioni cliniche riguardanti i sintomi motori e non motori, la popolazione target e la sicurezza di questo farmaco, dieci specialisti in disturbi del movimento si sono riuniti e hanno discusso: il ruolo del glutammato nella malattia di Parkinson, le fluttuazioni motorie, l'efficacia della safinamide sui sintomi motori, le complicanze motorie e i sintomi non motori, la qualità della vita, sicurezza di safinamide e popolazione target per l'uso. Gli specialisti sull'efficacia di safinamide su sintomi motori, fluttuazioni motorie, qualità della vita e sicurezza. Tra i sintomi non motori, è stato raggiunto un consenso positivo per i sintomi sonno/affaticamento, umore e dolore mentre mancava il consenso per le affermazioni riguardanti l'efficacia della safinamide nel migliorare le funzioni cognitive, urinarie e sessuali. La dichiarazione sull'ipotensione ortostatica ha ottenuto un consenso negativo. Il consistente e ampio accordo raggiunto in questo panel Delphi riflette perfettamente la percezione dell'efficacia, della sicurezza e della tollerabilità di safinamide, come risulta dagli studi cardine e dalla pratica clinica e mostra come questi risultati possano guidare gli specialisti dei disturbi del movimento nel loro approccio terapeutico clinico. L'impatto dei sintomi non motori nel morbo di Parkinson è considerevole e la gestione rimane

un'esigenza insoddisfatta. In questo contesto, la capacità della safinamide di influenzare alcuni sintomi non motori può rappresentare la caratteristica più promettente e distintiva di questo composto e merita ulteriori indagini.

3b. L'inibizione della catecol-O-metiltransferasi prolunga l'emivita plasmatica della levodopa, consentendo potenzialmente ai medici di ottimizzare il regime di levodopa nei pazienti con MdP che presentano fluttuazioni motorie.

- È stato condotto uno studio per valutare gli effetti di opicapone una volta al giorno sulla farmacocinetica plasmatica della levodopa e sulla risposta motoria quando aggiunto a due diversi regimi di dosaggio della levodopa. Un totale di 24 pazienti con PD e fluttuazioni motorie sono stati arruolati in uno studio esplorativo, in aperto, cross-over modificato. I partecipanti hanno ricevuto prima levodopa/carbidopa 500/125 mg (cinque assunzioni) per 2 settimane e sono stati quindi assegnati in modo casuale (1:1) a levodopa/carbidopa 400/100 mg somministrati in quattro o cinque assunzioni giornaliere più opicapone 50 mg per un ulteriore 2 settimane. La farmacocinetica di levodopa a 12 ore era l'outcome primario (ossia, escludendo l'effetto dell'assunzione di levodopa/carbidopa l'ultima sera), con complicanze motorie valutate come outcome secondari.

Oltre la farmacocinetica di 12 ore e rispetto a cinque assunzioni di levodopa/carbidopa 500/125 mg senza opicapone, le concentrazioni massime di levodopa erano simili o non significativamente superiori con entrambi i regimi di levodopa/carbidopa 400/100 mg più opicapone. Nonostante una dose giornaliera totale inferiore di 100 mg di levodopa/carbidopa, l'aggiunta di 50 mg di opicapone ha almeno raddoppiato l'emivita plasmatica della levodopa e le concentrazioni minime, con un aumento significativo di circa il 30% dell'esposizione totale. L'indice di fluttuazione della levodopa era significativamente inferiore solo per il regime a cinque assunzioni più opicapone (differenza di -71,8%;  $P < 0,0001$ ). Le modifiche alla farmacocinetica della levodopa sono state associate a una diminuzione del tempo di sospensione e ad un aumento del tempo di somministrazione. La combinazione di opicapone 50 mg con una dose giornaliera inferiore di 100 mg di levodopa fornisce una maggiore biodisponibilità della levodopa evitando i livelli minimi. Nonostante la dose più bassa di levodopa, la modifica del profilo farmacocinetico della levodopa con opicapone è stata associata a una diminuzione del tempo di sospensione e ad un aumento del tempo di somministrazione.

- Le analisi post-hoc di studi precedenti (BIPARK-I e II) hanno dimostrato che l'opicapone (OPC) 50 mg è efficace sull'intera traiettoria dell'evoluzione delle fluttuazioni motorie nei pazienti con MdP e sulle fluttuazioni motorie di fine dose, con maggiore efficacia nei pazienti che erano in anticipo o in ritardo nel decorso della malattia e nel percorso di trattamento con levodopa. Sono state eseguite analisi post-hoc complementari per valutare la sicurezza/tollerabilità dell'OPC seguendo la stessa segmentazione predefinita dell'ampio spettro di durata della terapia con PD e levodopa, nonché della storia delle fluttuazioni motorie, in questa popolazione di pazienti. I dati dei bracci di trattamento corrispondenti in BIPARK-I e II sono stati combinati per i gruppi placebo (PLC) e OPC 50 mg e sono state eseguite analisi post-hoc esplorative per studiare la sicurezza/tollerabilità di OPC 50 mg e PLC in 22 sottogruppi di pazienti che si trovavano in stadi "precoci" vs. "tardivi" sia del decorso della malattia (ad es., durata del PD <6 anni vs. ≥6 anni) sia del percorso di trattamento con levodopa (ad es., durata del trattamento con levodopa <4 vs. ≥ 4 anni). Le valutazioni di sicurezza/tollerabilità includevano la valutazione degli eventi avversi emergenti dal trattamento. Il set di sicurezza includeva 522 pazienti (PLC, n = 257; OPC 50 mg, n = 265). Per OPC 50 mg, le incidenze di eventi avversi che hanno portato all'interruzione sono state inferiori per i

pazienti nelle fasi precedenti o successive del decorso della malattia e del percorso di trattamento con levodopa nell'86,4, 86,4, 63,6 e 68,2% dei 22 confronti a coppie condotti, rispettivamente (rispetto a 63,6, 77,3, 18,2 e 45,5%, rispettivamente, nei 22 confronti PLC corrispondenti).

Conclusione: OPC 50 mg è stato generalmente ben tollerato quando utilizzato per il trattamento di pazienti con malattia di Parkinson con fluttuazioni di fine dose, con un profilo di tollerabilità ancora più favorevole nei pazienti che erano in precedenza, anziché in seguito, nel decorso della malattia e nel trattamento con levodopa percorso, supportando ulteriormente il suo uso come aggiunta precoce alla levodopa nel MdP

- L'aggiunta di un inibitore della catecol-O-metiltransferasi (COMT) alla terapia con inibitore della levodopa/dopa decarbossilasi (DDC) riduce le fluttuazioni nel profilo dei livelli plasmatici di levodopa dopo la somministrazione orale e può quindi essere utile per la gestione delle complicanze motorie. L'obiettivo dello studio EPSILON è quello di indagare l'efficacia dell'opicapone nel migliorare il beneficio clinico della levodopa nei pazienti nelle prime fasi del MdD, senza fluttuazioni motorie di fine dose. EPSILON è uno studio di fase III, in doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo e a gruppi paralleli, progettato per valutare l'efficacia e la sicurezza dell'OPC in aggiunta alla terapia con levodopa/inibitore della DDC in pazienti con PD precoce che non presentano segni di complicanze motorie. I pazienti idonei saranno randomizzati (1:1) per ricevere OPC 50 mg o placebo, in aggiunta alla terapia esistente con levodopa/inibitore della DDC, per un periodo di trattamento in doppio cieco di 24 settimane, dopodiché avranno la possibilità di entrare in un ulteriore periodo di estensione in aperto di 1 anno, durante il quale tutti i pazienti riceveranno OPC 50 mg. Risultati pianificati: gli endpoint primari di efficacia sono la variazione del punteggio totale della Parte III della Movement Disorders Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) dal basale alla fine del periodo in doppio cieco (fase in doppio cieco) e la variazione della MDS-UPDRS Punteggio totale della Parte IV dal basale in aperto alla fine del periodo in aperto (fase in aperto). Gli esiti secondari durante la fase in doppio cieco includeranno altre misure dei sintomi del PD, tra cui la qualità della vita, i sintomi non motori e lo sviluppo delle fluttuazioni motorie. Lo studio è in corso e 6 pazienti sono seguiti presso il nostro centro.

## **AREA DI RICERCA RIABILITAZIONE CARDIOVASCOLARE, TELEMEDICINA, E-HEALTH**

*Effetti di due programmi di training combinato (aerobico continuo + forza versus interval training + forza) sulla pressione arteriosa e sulla variabilità a breve termine della pressione arteriosa di pazienti con ipertensione arteriosa*

L'esercizio fisico è un intervento non farmacologico efficace nella gestione dell'ipertensione arteriosa (PA); le linee guida congiunte ESH-ESC, raccomandano il training fisico con livello di evidenza IA per la prevenzione e per il trattamento dell'ipertensione. L'esercizio aerobico continuo è la modalità di training più studiata per quanto riguarda l'effetto anti-ipertensivo, ed è noto che esso determina una riduzione della PA di 5-10 mmHg. Nell'ultimo decennio, altre modalità di training sono state studiate e fra esse anche l'esercizio di resistenza e l'interval training si sono dimostrate in grado di ridurre la PA. L'associazione fra l'esercizio aerobico continuo ed esercizi di resistenza coinvolgenti diversi gruppi muscolari, viene definito "esercizio combinato". L'effetto anti-ipertensivo prodotto dall'esercizio combinato è stato confrontato

con il non esercizio e con l'esercizio aerobico continuo: la riduzione della pressione che si osserva dopo una sessione di esercizio combinato è simile a quella prodotta da una sessione di esercizio aerobico continuo. A parità di effetto anti-ipertensivo, comunque, l'esercizio combinato può farsi preferire in determinate categorie di pazienti come gli anziani ed i diabetici in quanto la componente "resistenza" della sessione presenta uno spiccato effetto sul trofismo muscolare e potenzia gli effetti metabolici della componente aerobica. Pertanto, le linee guida raccomandano di aggiungere due sessioni/settimana di esercizi di resistenza all'attività aerobica continua.

Recentemente, alcuni autori hanno valutato l'efficacia di un particolare tipo di esercizio combinato in cui la componente aerobica non è organizzata in forma di esercizio continuo bensì in forma di interval training. L'effetto anti-ipertensivo, in acuto ed a medio-lungo termine, prodotto da un training combinato "interval-resistenza" non è noto. Non sono inoltre disponibili lavori di confronto fra training combinato "continuo" versus "interval" in cui l'endpoint primario sia l'effetto prodotto sulla pressione arteriosa. Tuttavia sulla base di recenti lavori, la combinazione interval-forza rappresenta una attraente modalità di training.

Il gruppo di ricercatori clinici ha recentemente confrontato tre differenti sedute di esercizio, aerobico continuo, interval ed esercizio combinato (aerobico continuo + resistenza) in pazienti ipertesi con cardiopatia ischemica, valutando l'effetto anti-ipertensivo prodotto nelle 24/h successive alla sessione di allenamento. È stata osservata una maggiore riduzione della pressione sistolica e diastolica nelle prime 5-6 h dopo l'esercizio in favore dell'esercizio aerobico continuo e combinato, mentre l'interval determinava una maggior riduzione pressoria durante la notte ed al mattino successivo, rispetto alle altre due modalità. Si può pertanto supporre che combinando le diverse modalità di training, si possa ottenere il migliore effetto anti-ipertensivo.

L'obiettivo del presente studio è pertanto, di confrontare gli effetti prodotti da 2 diverse modalità di training combinato, in acuto e dopo un periodo di 12 settimane, sulla PA di pazienti ipertesi con cardiopatia ischemica. L'ipotesi degli investigatori è che un training combinato di tipo "interval", possa determinare una più prolungata riduzione della PA nell'arco delle 24/h rispetto al training combinato "continuo". L'endpoint primario dello studio sarà il confronto degli effetti sulla pressione sistolica delle 24/h. Endpoints secondari saranno: cambiamenti della pressione sistolica diurna; pressione diastolica; variabilità pressoria sistolica delle 24/h, funzione atriale sinistra e funzione diastolica ventricolare sinistra, comparazione dei cambiamenti pressori tra genere maschile e femminile.

Il presente studio è concepito come uno studio pilota, pensato per verificare l'adeguatezza e la fattibilità del progetto, e per ricavare dati preliminari che permettano di determinare la grandezza del campione dello studio definitivo. La numerosità del campione pertanto è di 50 pazienti.

Lo studio è un trial randomizzato a tre bracci.

- A- Training combinato "continuo" (TCC);
- B- Training combinato "interval" (TCI).
- C- Gruppo di controllo senza esercizio

Su un totale di 50 pazienti previsti per l'arruolamento, 20 pazienti saranno allocati nel gruppo di esercizio "TCC"; 20 pazienti nel gruppo "TCI"; 10 pazienti nel gruppo di controllo, "no esercizio". Il 60% dei pazienti arruolati è di genere maschile e il 40% di genere femminile.

Lo studio si sviluppa in 3 mesi, e prevede 3 fasi così articolate:

Ogni soggetto effettua 3 visite: V1 (Screening), V2 (randomizzazione), V3 (fine studio).

## *Confronto tra gli effetti acuti ed a 12 settimane di 2 diverse modalità di training fisico sulla funzione atriale sinistra in pazienti ipertesi*

Gli effetti prodotti dall'esercizio fisico sulla struttura e la funzione dell'atrio sinistro sono ad oggi controversi. Dati derivanti da studi condotti su atleti hanno rilevato che una attività fisica intensa si può associare a dilatazione atriale, compromissione del riempimento diastolico ed aumentata suscettibilità a sviluppare tachiaritmie, fra cui la fibrillazione atriale. Il livello di compromissione della funzione degli atri esercizio-indotta sembra essere correlata al livello di intensità dell'esercizio stesso ed è maggiore fra gli atleti che praticano endurance rispetto a quelli che fanno esercizi di forza. Sanz-de la Garza et al. hanno valutato la risposta acuta degli atri, prima e dopo una attività fisica di variabile intensità, ed hanno documentato che all'aumentare del livello di intensità dell'attività aerobica aumentava il grado di compromissione della funzione degli atri; in particolare hanno osservato dapprima una riduzione della funzione di reservoir atriale (per esercizio di intensità media), quindi una compromissione della fase contrattile (per esercizio sforzi di alta intensità). In un recente studio condotto in soggetti sani, 10 mesi di intenso esercizio aerobico hanno determinato rimodellamento dell'atrio sinistro maggiore rispetto al Ventricolo sinistro. Viceversa dati ottenuti in soggetti cardiopatici sembrano indicare che l'esercizio fisico determina effetti positivi a livello atriale. Un programma di esercizio fisico della durata di 6 mesi in pazienti con pregresso infarto miocardico nel contesto della riabilitazione cardiologica ha determinato una riduzione volumetrica dell'atrio sinistro. E' probabile che, così come nei soggetti sani, anche nell'ambito patologico gli effetti dell'esercizio siano diversi in funzione della sua intensità, durata e modalità. Tuttavia studi di confronto fra differenti modalità di esercizio sono scarsi e non è chiaro, ad oggi, se differenti modalità di esercizio promuovono diverse risposte nel volume e nella funzione atriale sinistra. Lo strain dell'atrio sinistro valutato attraverso la tecnica "speckle-tracking echocardiography in 2 dimensioni", è una metodica ecocardiografica, ancora poco diffusa in ambito clinico, che consente una accurata valutazione delle diverse fasi funzionali dell'atrio sinistro (reservoir, conduzione, contrazione). Lo strain dell'atrio sinistro consente una valutazione più accurata della funzione diastolica ventricolare sinistra. L'obiettivo dello studio è di valutare gli effetti prodotti da 2 diverse modalità di esercizio, interval training e training combinato, in acuto ovvero dopo una singola sessione di esercizio, e dopo un periodo di training di 12 settimane, sulla funzione dell'atrio sinistro valutata attraverso lo strain, in pazienti ipertesi e con cardiopatia nota.

Lo studio è monocentrico, prospettico, osservazionale, non farmacologico, in aperto, condotto presso l'IRCCS San Raffaele, volto a comparare e verificare l'effetto prodotto da 2 modalità di esercizio sulla funzione atriale sinistra di pazienti ipertesi con cardiopatia nota.

Il protocollo coinvolge un totale di 50 pazienti così distribuiti: 20 pazienti nel gruppo di esercizio "interval training"; 20 pazienti nel gruppo "esercizio combinato"; 10 pazienti nel gruppo di controllo, "no esercizio". I pazienti hanno età compresa fra i 55 e gli 80 anni, di genere maschile. I tre gruppi sono così formati:

A- Interval training (20)

B- Training combinato (20)

Controllo, no esercizio (10)

Lo studio si sviluppa in 3 mesi, e prevede 4 fasi così articolate: ogni soggetto effettua 4 visite: V1 (Screening), V2 (randomizzazione), V3 (valutazione in acuto) e V4 (fine studio).

Durante V1, dopo la firma del consenso informato allo studio, precedentemente approvato dal Comitato Etico di riferimento, gli individui sono sottoposti presso lo studio medico ad un ecocardiogramma c/d (SIEMENS Acuson SC2000 prime) con valutazione della qualità della finestra acustica ed acquisizione delle immagini in 2D; 2) test ergometrico (mortara) che serve



ad escludere ischemia da sforzo, a valutare la capacità funzionale ed a programmare l'intensità dell'allenamento.

Dopo 3-7gg (visita 2), i soggetti vengono sottoposti ad una nuova valutazione ecocardiografica volta a valutare la riproducibilità della metodica. I soggetti vengono quindi randomizzati in uno dei tre gruppi di studio

V3: prima sessione di esercizio (valutazione in "acuto": A) per i 40 pazienti inclusi nei 2 gruppi di training: viene eseguito ecocardiogramma prima e dopo 30'- 60' minuti dopo la fine della sessione di esercizio. B) gruppo di controllo: viene eseguito ecocardiogramma in condizioni di riposo a distanza di 1 h circa.

V4- Visita di fine studio. Viene effettuata entro 1 settimana dalla fine dei protocolli di esercizio ed include l'esecuzione di nuovo ecocardiogramma c/d a riposo ed un test ergometrico.

#### *Valutazione prospettica di parametri innovativi di rischio cardiovascolare in pazienti con aumentato rischio cardiovascolare e/o malattie cardiovascolari*

Le malattie cardiovascolari (CV), in particolare scompenso cardiaco, ipertensione arteriosa, angina pectoris, fibrillazione atriale, malattia coronarica e cardiopatia valvolare, rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale, in entrambi i sessi, e la loro incidenza è destinata ad aumentare nei prossimi decenni.

L'attuale sistema di prevenzione basato sulla stratificazione del rischio non è capace di stimare in maniera ottimale il rischio, sottostimandolo in popolazioni ad alto rischio CV e sovrastimando il medesimo in popolazioni a basso rischio CV, e inoltre non tiene conto del diverso impatto che i fattori di rischio CV e le risposte ai trattamenti farmacologici, hanno nei due sessi. Tutto ciò impone la ricerca di nuovi parametri con un valore prognostico forte, anche basato sulle differenze di genere.

Negli ultimi anni lo studio della funzione endoteliale e della elasticità vascolare e nuovi biomarkers hanno dimostrato la possibilità di predire il rischio cardiovascolare futuro indipendentemente dai classici fattori di rischio sia in prevenzione primaria sia secondaria nella popolazione generale e nei pazienti con malattie CV, pur non rivelando ancora differenze di genere nel determinismo della importanza prognostica anche di questi nuovi fattori di rischio.

Inoltre, se la riabilitazione cardio-metabolica si è dimostrata capace di ridurre l'incidenza di eventi CV, non è ancora noto l'impatto che una stratificazione del rischio elaborata utilizzando anche i nuovi parametri suddetti possa avere sulla risposta alla riabilitazione.

Lo studio, di tipo osservazionale longitudinale prospettico, prevede l'arruolamento di un minimo di 100 e fino a un massimo di 200 soggetti/pazienti anno, di ambo i sessi, età 18-80 anni, diagnosi di malattia CV (in particolare scompenso cardiaco, ipertensione arteriosa, angina pectoris, fibrillazione atriale, malattia coronarica e cardiopatia valvolare, etc.) o presenza di malattia dismetabolica (metabolismo glucidico o lipidico) afferenti al Dipartimento di Scienze Cardiologiche e Respiratorie dell'IRCCS San Raffaele.

Le malattie cardiovascolari (CV) rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale, in entrambi i sessi, con crescente incidenza. L'attuale sistema di prevenzione e valutazione del rischio di CV non tiene conto dell'impatto differenziale che i fattori di rischio e le risposte ai trattamenti farmacologici hanno nei due sessi. La ricerca di parametri innovativi ad alto valore prognostico, anche basati sulle differenze di genere, è perciò di primaria importanza. Negli ultimi anni lo studio della funzione endoteliale e della elasticità vascolare e nuovi biomarkers ha dimostrato la possibilità di predire il rischio cardiovascolare futuro indipendentemente dai classici fattori di rischio, pur non rivelando ancora differenze di genere nel determinismo della importanza prognostica anche di questi nuovi fattori di rischio.

Obiettivi primari:

- valutare prospetticamente la rilevanza di parametri innovativi di rischio CV;
- valutare l'effetto dell'esercizio fisico in pazienti con aumentato rischio e/o malattie CV;
- valutare il rischio di insorgenza di eventi CV futuri in pazienti con aumentato rischio CV e/o malattie CV;
- identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore) e/o di indici precoci di aterosclerosi (stiffness e funzionalità vascolare, microalbuminuria e nuovi biomarcatori) in pazienti a basso rischio CV.

Obiettivi secondari:

- valutare la concordanza di diverse carte del rischio CV (SCORE e carta del Rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità) in una popolazione di soggetti a basso rischio;

valutare prospetticamente l'effetto dell'aderenza alle diverse strategie di prevenzione e/o di intervento (educazionali e/o terapeutiche) riabilitativo.

Expected outcome:

- Valutare prospetticamente la modificazione dei fattori di rischio CV, da soli o in associazione a nuovi fattori di rischio emergenti.
- Identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore, tempo di inizio della menopausa) e/o indici precoci di morbilità cardiovascolare (stiffness e funzionalità vascolare, biomarcatori).
- Definire prospetticamente il ruolo e l'importanza della associazione dei fattori di rischio tradizionali ed emergenti nella progressione delle malattie CV.
- Implementare il dialogo fra diversi specialisti (medici di medicina generale, internisti, cardiologi, ginecologi, etc) al fine di ottimizzare le strategie di prevenzione e/o intervento nei pazienti ad aumentato rischio cardiovascolare.

Il presente studio osservazionale è volto a valutare parametri innovativi di rischio CV in pazienti con aumentato rischio CV e/o malattie CV.

I pazienti vengono sottoposti a una valutazione basale del rischio individuale di eventi CV (morte, infarto del miocardio o ictus) per mezzo di carte del rischio CV validate (carta SCORE e carta del rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità), e a una valutazione dei fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, valutazione della qualità di vita (mediante WHOQOL test), valutazione dello stato cognitivo (mediante MMSE test), valutazione dello stato dell'umore (mediante GDS test) e valutazione dei disturbi del desiderio sessuale (Hypoactive Sexual Desire Disorder - IIEF). Inoltre i pazienti sono sottoposti a una valutazione della funzionalità e morfologia del cuore (ecocardiogramma), alla registrazione grafica dell'attività elettrica del cuore (elettrocardiogramma) e suo monitoraggio nelle 24 ore (ECG Holter delle 24 ore con valutazione di Heart Rate Variability), degli indici precoci di aterosclerosi (stiffness vascolare, valutazione della velocità dell'onda di polso e della pressione aortica centrale, mediante devices dedicati, quali il Complior e lo Sphygmocor), della funzione endoteliale (mediante EndoPAT, pletismografia e/o metodica ecografica), di parametri basali (peso, altezza, circonferenza vita e fianchi e misurazione della pressione arteriosa). Infine i pazienti sono sottoposti ad un prelievo di sangue (due aliquote di sangue saranno trasferite in bio-banca) e alla raccolta delle urine. Tutti i pazienti sono sottoposti ad un ecocardiogramma Doppler, colorDoppler con valutazione di parametri emergenti di contrattilità loco-regionale e di flusso intracardiaco e ad un test da sforzo con, quando appropriato, uno studio del consumo di ossigeno.

I soggetti con aumentato rischio cardiovascolare ed i pazienti con malattie cardiovascolari e/o metaboliche vengono sottoposti, a discrezione del medico, a prova da sforzo con o senza consumo di ossigeno, ecocardiogramma, ecoDoppler vascolare, monitoraggio ambulatoriale dell'ECG o della Pressione Arteriosa, TC cardiaca, RMN cardiaca. Le suddette valutazioni

vengono ripetute annualmente durante il follow-up. I pazienti vengono quindi inclusi in un programma di riabilitazione cardiometabolica che include dieta individualizzata ed esercizio fisico commisurato alle capacità funzionali.

Ad ogni visita annuale, atta a valutare eventi e stato di salute, viene effettuato il calcolo del rischio cardiovascolare.

Il periodo di reclutamento previsto è di 48 mesi ed il follow-up minimo per ciascun soggetto/paziente è di dieci anni.

Lo studio ha una immediata trasferibilità per il Servizio Sanitario, in quanto ha lo scopo di valutare il ruolo e l'impatto dei fattori di rischio cardiovascolari tradizionali ed emergenti nel calcolo del rischio cardiovascolare globale. La valutazione di fattori di rischio emergenti ed indici subclinici di aterosclerosi ha lo scopo di meglio caratterizzare la prognosi cardiovascolare in pazienti con scompenso cardiaco, pazienti anziani o in altri sottogruppi "fragili". La valutazione più accurata del rischio di morbidità individuale permette di ottimizzare le strategie di prevenzione ed intervento, con importanti ripercussioni di tipo socio-economico

### *Studio comparativo fra due diversi integratori alimentari di agire sul profilo lipidico e sulla qualità di vita associati alla malattia venosa cronica*

La malattia venosa cronica (CVD) e l'ipercolesterolemia nello stesso paziente sono frequenti. La malattia venosa cronica è una condizione clinica, spesso progressiva, che non solo limita la qualità di vita dei pazienti che ne sono affetti ma che può evolvere verso patologie gravi, quali la comparsa di ulcere venose. L'ipercolesterolemia è un noto fattore di rischio cardiovascolare ed è un obiettivo comune di trattamento.

Nei pazienti a basso rischio cardiovascolare, e/o in prevenzione primaria che rifiutano l'assunzione di agenti ipolipemizzanti o nei pazienti intolleranti alle statine, l'uso di integratori alimentari può essere aggiunto allo stile di vita per ottenere una riduzione dei livelli plasmatici del colesterolo. Numerosi sono gli integratori alimentari disponibili; molti di questi sono in grado di agire contemporaneamente su diversi parametri metabolici, quali il colesterolo, ed emodinamici, quali la malattia venosa, aumentando quindi la compliance al trattamento da parte del paziente.

L'obiettivo specifico di questo studio, che fa parte di un progetto più ampio di valutazione dell'efficacia e sicurezza di diversi nutraceutici su parametri metabolici ed emodinamici, è quello di paragonare l'efficacia di integratori alimentari sul metabolismo lipidico e sui sintomi e segni clinici associati alla malattia venosa ed alla qualità di vita.

Il primo di questi studi coinvolge 123 pazienti ambulatoriali affetti da malattia venosa cronica (MVC) e ipercolesterolemia che non abbiano assunto negli ultimi tre mesi farmaci e/o nutraceutici e/o integratori alimentari per il trattamento dell'ipercolesterolemia e/o della MVC. I pazienti eleggibili vengono randomizzati secondo lo schema a blocchi permutati 1:1:1 ed assegnati ad uno dei tre bracci di trattamento: A (Armolid plus, efarma), B (Colven, PhytoActiva Srl), C (placebo).

Dei 42 pazienti che hanno firmato il consenso informato, 16 non sono stati arruolati per la mancata adesione ai criteri di inclusione e/o di esclusione. Sono stati quindi arruolati n. 26 pazienti, di cui 3 non hanno svolto la visita V2 per problemi personali ad effettuare la visita di follow up (drop out).

Le analisi sono state pertanto svolte su n. 23 pazienti.

I dati mostrano una riduzione significativa del colesterolo totale nel gruppo randomizzato a gruppo A ( $p=0,0071$ ) rispetto al gruppo C e nel gruppo randomizzato a B ( $p=0,0133$ ) rispetto al gruppo C. I due gruppi A e B non differiscono significativamente tra di loro per colesterolo totale.

Per la variabile LDL, i dati sono speculari. Vi è una riduzione significativa dei valori di LDL nel gruppo randomizzato a gruppo A ( $p=0,0107$ ) rispetto a C e nel gruppo randomizzato a gruppo B ( $p=0,0149$ ) rispetto a C. I due gruppi A e B non differiscono significativamente tra di loro per LDL.

Nel corso dello studio, 6 pazienti hanno presentato eventi avversi: di questi 2 non relati alle molecole dello studio (interventi minori programmati).

Lo studio viene chiuso nel 2022 per dimostrata efficacia.

## **RICERCA TRASLAZIONALE**

### **Laboratorio di Bioingegneria della Riabilitazione**

*Valutazione di efficacia e ottimizzazione del protocollo di Action Observation Therapy in pazienti neurologici.*

Negli ultimi anni, al fine di migliorare l'Attività della Vita Quotidiana (Activity of Daily Living, ADL), sono sorte come trattamenti riabilitativi nuove strategie non invasive in alternativa a terapie fisiche tradizionali. Il Trattamento di Osservazione dell'Azione (AOT), sostenuto da risultati raccolti attraverso studi clinici controllati randomizzati (RCT), è uno di queste. Questo nuovo approccio riabilitativo si basa sulle proprietà del Mirror Neuron System (MNS). La vasta ricerca degli ultimi 20 anni sul MNS umano (hMNS) ha mostrato la sua importanza nel riconoscimento dell'azione, nelle intenzioni motorie e in altre funzioni cognitive sociali.

Il recupero dell'arto superiore in seguito ad un evento di ictus è cruciale per aumentare le prestazioni funzionali e la partecipazione alla vita quotidiana. Gli approcci efficienti per il recupero dell'arto superiore si basano solitamente su una pratica intensiva e ripetitiva di task motori object-oriented. Tra le strategie riabilitative innovative come alternative alla terapia fisica convenzionale troviamo l'AOT, che genera una stimolazione multisensoriale che facilita la neuroplasticità attraverso l'attivazione dei neuroni specchio. Durante l'AOT si richiede al paziente di osservare una sequenza ripetuta di video di azioni o di gesti reali eseguiti dal terapeuta, con a volte successiva esecuzione degli stessi utile ad incrementare la riorganizzazione della corteccia motoria primaria. L'ipotesi di base dell'utilizzo di questo trattamento è che l'osservazione dell'azione sia modulata dall'esperienza motoria pregressa del soggetto, contribuendo alla formazione di memorie motorie dell'azione osservata.

Tuttavia, l'analisi della letteratura evidenzia l'eterogeneità nel trattamento in termini di protocolli, nello specifico di contenuti dei video/ tipologia dei gesti, tempi di osservazione e di esecuzione, prospettiva da utilizzare e il dosaggio del trattamento.

Il progetto intende valutare la riabilitazione somministrata per mezzo di un protocollo AOT ottimizzato su pazienti affetti da ictus in fase cronica, per verificare la presenza di un miglioramento della funzione degli arti superiori in termini di bradicinesia e di manualità. Inoltre, si prefigge di analizzare le caratteristiche elettrofisiologiche per valutare il recupero funzionale e fornire un protocollo terapeutico ottimizzato e innovativo per soggetti neurologici. A tal fine è stato formulato un protocollo AOT dai terapisti, sulla base dei risultati preliminari ottenuti negli anni precedenti analizzando le registrazioni elettroencefalografiche durante l'osservazione di categorie di azioni della vita quotidiana, che miravano a individuare quale categoria stimolasse maggiormente l'attivazione del sistema mirror.

Le scale di valutazione clinica sono state utilizzate per discriminare non solo il gruppo sperimentale che risponde o meno alla terapia, ma anche per individuare gli outlier da eliminare dall'indagine statistica per rendere il campione sperimentale il più possibile omogeneo. Le valutazioni definiscono il profilo dei pazienti prima e dopo la terapia; il recupero

della funzionalità dell'arto superiore viene maggiormente indagato integrando i risultati clinici con i marcatori elettrofisiologici sia in termini di attivazione corticale, sia in termini di reclutamento muscolare. I ricercatori si aspettano che i risultati della sperimentazione restituiscano un miglioramento dell'attività cerebrale nelle aree coinvolte nella pianificazione e nell'esecuzione motoria dei pazienti che hanno eseguito le sessioni di AOT ottimizzata.

Si apre la strada verso una nuova metodologia che possa definire in maniera efficiente il protocollo di osservazione dell'azione più adatto per promuovere le capacità nelle attività della vita quotidiana dei pazienti neurologici. Il profilo corticale dei pazienti risultante da un task motorio standardizzato che replica un gesto semplice di reaching restituisce parametri quantitativi della proprietà del sistema di mirror di innescare meccanismi neuroplastici che stimolano la riorganizzazione dei circuiti cerebrali in presenza di alterazioni neurologiche. Dall'indagine elettrofisiologica, emerge un nuovo impatto sull'identificazione degli indicatori di neuroimaging da utilizzare per studi predittivi sul recupero riabilitativo.

Per studiare l'efficacia della terapia dell'osservazione con la visualizzazione di video che proiettano gesti semplici e categorizzati della vita quotidiana, i pazienti reclutati sono stati divisi in due gruppi, sperimentale e controllo, e sottoposti a scale di valutazione clinica riconosciute dalla letteratura e dalle linee guida internazionali e a registrazioni elettroencefalografiche.

Misure di outcome primarie: Fugl-Meyer Assessment.

Outcome secondari: Frenchay Arm Test, Box e Block Test, Modified Ashworth Scale, Modified Bartel Index, Nine Hole Peg Test, desincronizzazione evento-correlata calcolata a partire dalle mappe tempo-frequenza.

Le valutazioni cliniche sono state somministrate da un terapeuta ignaro dell'assegnazione del gruppo. Per ciascun paziente idoneo, in seguito alla firma del consenso informato, sono stati valutati deterioramento, capacità funzionali e recupero all'inizio del trattamento (T0), alla fine di esso (T1), e alla visita di controllo (follow-up a 2 mesi) (T2).

Il segnale EEG è stato registrato utilizzando l'elettroencefalografo EGI GEODESIC a 128 canali (0,01-100 Hz passa-banda; frequenza di campionamento: 1000 Hz) dapprima durante lo stato di riposo e successivamente durante un task motorio di puntamento, somministrato per mezzo di un set-up sperimentale implementato in Labview 2020; i segnali elettromiografici sono stati registrati su 4 muscoli dell'arto superiore con le sonde del sistema BTS FREEEMG 1000. Sono stati implementati setup sensorizzati grazie ai quali la somministrazione del pointing task risulta sincronizzata al network di sensori indossabili EMG e al sistema EEG per la valutazione della risposta evento-correlata.

Sulla base dei risultati ottenuti dalle analisi preliminari del progetto (diversa sollecitazione del sistema mirror a seconda della tipologia di stimolo visuomotorio) il terapeuta ha formulato la terapia riabilitativa ottimizzata distribuita su 15 sedute AOT in 5 settimane per il gruppo sperimentale, ciascuna delle quali consisteva nell'osservazione di gesti motori ripetuti per due minuti e successiva esecuzione di 1 minuto dei gesti osservati; al gruppo di controllo è stata somministrato un trattamento riabilitativo di esecuzione di gesti motori con la stessa posologia, durante il quale i video di osservazione dell'azione sono stati sostituiti con video di paesaggi naturali.

Sono stati reclutati 19 soggetti con esiti di ictus ischemico in fase cronica (distanza dall'evento acuto maggiore di 6 mesi) con deficit dell'arto superiore clinicamente evidente.

10 soggetti del gruppo sperimentale e 9 soggetti del gruppo di controllo hanno firmato il consenso informato; un soggetto del gruppo di controllo si è successivamente ritirato dallo studio.

Il protocollo ottimizzato ha permesso la somministrazione della terapia che desse maggior peso ai video con azioni finalizzate nelle categorie di feeding e self-care. I risultati sull'analisi elettrofisiologica delle risposte corticali correlate al task motorio di test ha mostrato come nel

gruppo sperimentale la capacità di adempiere all'intenzione motoria e/o alla reale attuazione del gesto sia esplicitata grazie ad una potenza neuronale finalizzata all'atto motorio di maggiore portata in seguito all'AOT. È visibile, infatti, una desincronizzazione bilaterale durante l'esecuzione del task più intensa in banda beta in entrambe le aree cerebrali, che invece non emerge nel gruppo di controllo. Una nota positiva è dettata dalla mancata differenza dei biomarcatori analizzati tra T0 e T1 nel gruppo sperimentale nell'emisfero ipsilaterale all'arto che esegue il compito: è noto che i pazienti che ottengono risultati migliori nella riabilitazione mostrano un'attivazione più lateralizzata dell'emisfero ipsilesionale nei movimenti della mano deficitaria, mentre pazienti con minori risultati continuano a mostrare questo pattern bilaterale di attivazione anche a distanza temporale dall'evento ischemico, in maniera cronica.

Per l'analisi degli effetti muscolari, lo studio dell'EMG ha mostrato un aumento significativo della co-contrazione muscolare dei deltoidi nel gruppo sperimentale rispetto al gruppo di controllo. Poiché la co-contrazione muscolare è essenziale per la stabilizzazione delle articolazioni durante le prestazioni motorie raffinate, questo risultato supporta l'ipotesi di un effetto di miglioramento funzionale della terapia ottimizzata.

Dal punto di vista clinico, è stato accertato statisticamente un miglioramento clinico sul gruppo sperimentale con risultato significativo (con aumento medio di 2 punti nello specifico) a livello statistico con  $p=0,08$ .

Lo studio ha quindi permesso di accertare una modulazione dello stato clinico ed elettrofisiologico (corticale e muscolare) a seguito dell'AOT ottimizzata.

Il presente progetto valida e ottimizza il trattamento dell'osservazione dell'azione. È degno di nota il fatto che l'attuale trattamento riabilitativo potrebbe essere istituito praticamente in tutti i siti del sistema sanitario nazionale. Il presente studio supporta una strategia facile e conveniente per la riabilitazione di un grande numero di pazienti con ictus cronico.

#### *Studio delle caratteristiche dinamiche, cinematiche ed elettrofisiologiche per la valutazione funzionale del gesto motorio*

Il sistema nervoso, il sistema scheletrico ed il sistema muscolare sono coinvolti nella realizzazione delle azioni quotidiane in una rigorosa combinazione di coordinazione ed equilibrio. Le patologie o i traumi generano lesioni nette o parziali che alterano e riducono i meccanismi coinvolti nei gesti motori della vita quotidiana, sia che essi interessino gli arti inferiori sia gli arti superiori. Nella pratica clinica, l'obiettivo della riabilitazione è il recupero della funzione motoria perduta in termini di funzionalità e qualità dei movimenti, che vengono valutati per mezzo di scale somministrate dai terapeuti: sono molte le metodologie di cui ci si avvale per lo studio dell'arto di interesse, per indagarne moduli e combinazioni motorie. Tuttavia, esse non consentono un'analisi dettagliata della cinematica articolare e delle attività muscolari e cerebrali durante il movimento. A tal proposito è sorta da anni l'esigenza di implementare protocolli e metodi che possano quantificare in maniera oggettiva le performance motorie dei pazienti.

Negli ultimi anni alcuni studi scientifici si sono concentrati sulla ricerca di nuove strategie non invasive per eseguire la riabilitazione in soggetti con patologie neurologiche. Insieme alla terapia fisica, questi nuovi approcci potrebbero migliorare la riabilitazione in termini di impegno, qualità della vita (QoL) e self-acceptance. Queste tecniche coinvolgono non solo approcci di robotica ma anche realtà virtuale, realtà aumentata e protocolli complessi che comprendono una combinazione di essi che possono essere raggruppati in un quadro basato su meccanismi di apprendimento motorio e plasticità neurale.

Nel progettare protocolli riabilitativi è possibile ottenere maggiori informazioni relative al recupero del movimento. Valutare un paziente prima di iniziare un protocollo di riabilitazione

neuromotoria è essenziale per garantire l'erogazione sicura ed efficace delle cure. Questo processo di valutazione prevede la raccolta di informazioni relative alla storia medica del paziente, ai sintomi attuali e alle capacità funzionali. Il panorama tecnologico a disposizione consente la definizione di procedure e metodologie per la valutazione funzionale della disabilità motoria basata su criteri qualitativi, oggettivi, accurati, ripetibili ma soprattutto multidominio. Una piattaforma di acquisizione di dati provenienti da domini diversi consente di restituire un profilo del paziente puntuale, corredato da indici di natura clinica ed elettrofisiologica.

Al fine di valutare e validare l'efficacia reale della riabilitazione e di personalizzarla durante il trattamento terapeutico è necessario addentrarsi il più possibile, in maniera non invasiva, nei meccanismi corticali, muscolari e articolari adottati dal soggetto prima e dopo la terapia per realizzare il gesto motorio sotto indagine. Con questo obiettivo specifico è stata implementata una piattaforma multi-dominio innovativa, in quanto consente l'acquisizione sincrona di indici legati a tre diversi segnali, oltre alla segmentazione automatica degli eventi caratteristici del task e quindi gli outcome comportamentali.

Il task motorio sotto indagine è stato un gesto di puntamento standardizzato tramite un codice in-house sviluppato in Labview 2020, che è stato validato su soggetti sani e affetti da ictus, fornendo così un nuovo paradigma di valutazione e concentrandosi su aspetti di pianificazione e controllo motori basati sull'elettroencefalografia e sull'elettromiografia.

I principali outcome includono la soppressione evento-correlata dei ritmi cerebrali, che ci si aspetta precoce e di maggior entità nei soggetti sani, l'attività muscolare insieme alla cocontrazione tra muscoli antagonisti e lo spostamento del tronco, che rappresenta uno dei fenomeni compensativi nei soggetti affetti da ictus per compiere un gesto di reaching. La definizione di algoritmi di elaborazione dei dati biometrici grezzi delle traiettorie e dei segnali elettrofisiologici durante movimenti finora non ancora strumentati facilita la ricerca di biomarcatori ottenuti tramite protocolli standardizzati che forniscano informazioni dettagliate sul recupero funzionale e sulla sua predizione.

Le informazioni raccolte durante la valutazione vengono utilizzate per identificare eventuali controindicazioni o precauzioni che possono influire sulla capacità del paziente di partecipare al programma riabilitativo, nonché per sviluppare scopi e obiettivi specifici per la cura del paziente. Inoltre, la valutazione fornisce una misura di base delle capacità funzionali del paziente che può essere utilizzata per monitorare i progressi durante il programma di riabilitazione. È importante che gli operatori sanitari coinvolti nella cura del paziente lavorino a stretto contatto per garantire un approccio globale al processo di valutazione, nonché per assicurarsi che le esigenze del paziente siano soddisfatte durante tutto il programma di riabilitazione. È il primo passo come valido supporto alla ricerca traslazionale che deve stimolare il clinico ed il terapeuta ad individuare approcci innovativi e standardizzati per facilitare il recupero motorio. Un beneficio dell'acquisizione multidominio è la possibilità di diminuire sensibilmente il tempo di intervento sul paziente per le acquisizioni e la possibilità di correlarne i risultati per interpretare i ruoli e le interazioni tra i diversi domini indagati.

Il protocollo implementato e realizzato per la somministrazione e valutazione strumentale del pointing task ha proposto la triplice funzione di gestione, profilazione e somministrazione del task: un'interfaccia grafica (GUI) facilmente fruibile dagli operatori, contiene al suo interno i comandi per la registrazione del paziente su database locale, la reportistica associata alle performance del soggetto e l'export dei dati anagrafici/performance in formato csv o pdf. La piattaforma del Pointing Task è stata articolata principalmente in: somministrazione del task mediante monitor 27" touch-screen con un pulsante che funge trigger-box e analisi dei biosegnali. Il task inizia con la pressione di un pulsante situato su un tavolo all'altezza dello sterno e si procede iterativamente per ogni marker in due fasi: la prima consiste nella comparsa a video di un marker che resta attivo in attesa del raggiungimento da parte del paziente, la

seconda nella pressione del pulsante che funge anche come start dell'intero task. Per mezzo del pulsante, subito prima della prova tutti i dispositivi vengono sincronizzati. Al soggetto è stato richiesto di raggiungere i 9 markers, presentati sullo schermo uno per volta per 3 volte.

Sono stati valutati 16 soggetti sani e 22 soggetti affetti da ictus con il protocollo multi-dominio del pointing task sopra descritto. Dopo il danno da ictus, le menomazioni riflettono la modulazione cerebrale e l'attivazione muscolare. Osservando il confronto tra pazienti con ictus cronico e soggetti sani, e in accordo con altri lavori simili, i cambiamenti più consistenti sono stati riportati nella banda di frequenza  $\beta$ . La banda  $\beta$  è principalmente attivata nella popolazione sana con entità significativa dal punto di vista statistico negli ultimi intervalli prima del completamento dell'attività.

I segnali muscolari dei soggetti sperimentali hanno mostrato una maggiore attività e contrazione tra coppie di muscoli agonisti-antagonisti rispetto ai soggetti sani. L'aumento dell'attivazione muscolare negli individui con ictus cronico può verificarsi a causa di cambiamenti nel controllo neurale dell'attivazione muscolare a seguito della lesione cerebrale causata dall'ictus. Infatti, negli individui con ictus cronico, la spasticità può causare cambiamenti nei tempi e nell'ampiezza del segnale EMG, nonché nei modelli di attivazione muscolare. Da questi risultati è chiaro il grande contributo di un'analisi derivante da una piattaforma di somministrazione di un protocollo di valutazione per interpretare in maniera completa ed efficiente il recupero funzionale post-trattamento.

## **Laboratorio di Brain Connectivity**

### *Studio della connettività cerebrale in condizioni fisiologiche e patologiche*

Il progetto ha l'obiettivo specifico di individuare dei marcatori neurofisiologici che riflettano lo stato cerebrale che possa identificare alterazioni della plasticità corticale attraverso investigazioni con tecniche elettrofisiologiche (NIBS-EEG ed EEG a riposo).

Per fare questo vengono studiate tutte le possibili patologie trattate presso l'IRCCS o in tutte le strutture che vogliono essere coinvolte.

Possono essere utilizzate anche registrazioni EEG prima e dopo riabilitazione motoria o cognitiva, e potrebbero essere utili per lo scopo del progetto anche registrazioni riguardanti apprendimento o compiti motori, visivi, acustici.

Dal punto di vista preclinico possono essere prese in considerazione anche registrazioni su modelli animali come topi o primati.

L'obiettivo di questo progetto è la valutazione dei network cerebrali per lo studio della connettività funzionale, strutturale ed effettiva. L'attività è specificatamente rivolta alla valutazione delle modulazioni dei network cerebrali dovuti a patologie neurodegenerative e non (come ad esempio in pazienti affetti da Alzheimer, epilessia, sclerosi, Parkinson, Stroke) come anche al trattamento terapeutico e di riabilitazione motoria o cognitiva (ad esempio in Alzheimer, Stroke).

Le metodiche di acquisizione utilizzate sono: dati elettroencefalografici (EEG), dati di risonanza magnetica (MRI), registrazioni simultanee di dati elettroencefalografici e stimolazione elettrica e magnetica (EEG-TMS, EEG-tDCS, EEG-tACS).

Le maggiori innovazioni apportate a questo progetto consistono prima di tutto nell'approccio multimodale alla patologia e nell'integrazione tra dati di origini diverse, ma anche come dati provenienti da test neuropsicologici e clinici che permettono una correlazione con le valutazioni neurofisiologiche per seguire il paziente durante la progressione della malattia o il recupero funzionale e cognitivo attraverso nuovi approcci di riabilitazione, come quelli legati a compiti



cognitivi e stimolazioni magnetiche ed elettriche mirati allo specifico recupero cognitivo di determinate aree cerebrali.

Ci si aspetta di poter:

- individuare marcatori neurofisiologici che riflettano lo stato cerebrale; che si possa identificare alterazioni della plasticità corticale attraverso investigazioni con tecniche elettrofisiologiche;
- individuare modulazioni EEG nelle bande di frequenza di interesse (delta, theta, alpha 1, alpha 2, beta 1, beta 2, gamma);
- individuare l'impatto delle stimolazioni NIBS sui meccanismi di plasticità cerebrale nel recupero funzionale e nel decorso patologico e fisiologici;
- individuare gli indici di predizione delle patologie e miglioramento ed efficacia delle metodiche di neuroriabilitazione.

Tutto ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di moderne tecniche di analisi che vengono utilizzate nel Laboratorio come le valutazioni delle sorgenti corticali cerebrali, la loro interazione funzionale e le loro interconnessioni strutturali ma anche grazie allo sviluppo e l'implementazione di nuovi algoritmi di calcolo basati su applicazioni d'avanguardia della teoria dei grafi.

#### Registrazione EEG ed analisi preliminari

L'attività elettrica cerebrale è registrata tramite EEG (0,3-100 Hz passa-banda, frequenza di campionamento: 512 Hz) da 19, 32, 64 o 128 elettrodi posizionati secondo Sistema Internazionale 10-20 aumentato durante le condizioni di riposo ad occhi chiusi e aperti (5 minuti ciascuno). Per monitorare i movimenti degli occhi, è stato acquisito elettroculogramma orizzontale e verticale (0,3-70 Hz passa-banda).

Per eliminare le interferenze causate da artefatti di origine oculare, muscolare, cardiaca ed altri tipi di rumore, l'EEG è stato frammentato in epoche da 2-s e sono stati utilizzati due processi: i dati sono stati rivisti per eliminare manualmente le epoche con forme d'onda aberranti; la rilevazione degli artefatti è stata completata con un algoritmo per l'analisi delle componenti indipendenti (ICA) sviluppato in EEGLAB. Sono stati presi in considerazione gli spezzoni privi di artefatti per le successive analisi. Le bande di frequenza di interesse sono delta (2-4 Hz), theta (4-8 Hz), alfa 1 (8-10,5 Hz), alfa 2 (10,5-13 Hz), beta1 (13-20 Hz), beta2 (20-30 Hz) e gamma (30-40 Hz).

#### Analisi di potenza delle sorgenti EEG

I dati EEG sono stati normalizzati ed è stata calcolata la densità di corrente di attivazione delle sorgenti corticali su 6239 voxels usando standardized Low Resolution Electromagnetic Tomography (sLORETA), disponibile come pacchetto di software gratuito.

Tale metodo si basa sulla risoluzione del problema inverso, ricostruendo la distribuzione corticale delle sorgenti di attività elettrica neuronale in maniera tridimensionale, partendo dai dati EEG. Data la bassa risoluzione spaziale insita del metodo, sono state ricostruite 12 regioni cerebrali di interesse (centrale, frontale, occipitale, temporale e limbica nell'emisfero destro e sinistro), basandosi sull'atlante di Talairach.

#### Analisi di connettività funzionale delle sorgenti cerebrali

La Connettività cerebrale è stata calcolata con il software eLORETA su 84 regioni di interesse definite in base alle 42 aree di Brodmann, per gli emisferi destro e sinistro.

Attraverso le 84 regioni di interesse di eLORETA, è stata calcolata la Lagged Linear Coherence con il metodo "all nearest voxels" tra tutte le possibili coppie di regioni di interesse. I valori di connettività calcolati per ogni banda di frequenza e per ogni soggetto, sono stati usati come peso del grafo calcolato con la teoria dei grafi.

#### Teoria dei grafi

Sono state utilizzate innovative misure di analisi dei network cerebrali per studiarne la connettività e seguirne la sua modulazione successiva al trattamento riabilitativo.

Per ogni partecipante ed in ogni banda di frequenza sono stati calcolati almeno i seguenti parametri sulle sorgenti di attivazione cerebrale:

- Characteristic path length (L): rappresenta una misura di integrazione cerebrale ed è data dalla media del più breve path tra ogni coppia di nodi connessi.
- Clustering coefficient (C): rappresenta una misura di segregazione cerebrale quantificata come la tendenza del network a formare cluster.
- Small-worldness (S): è calcolato il rapporto tra C ed L normalizzati.

#### Analisi statistica

E' stata effettuata l'analisi parametrica. Le variabili continue sono state descritte come media  $\pm$  deviazione standard, mentre le variabili di categoria sono state riportate usando frequenza e valore percentuale.

Le medie delle misure sono state analizzate separatamente attraverso misure ripetute di ANOVA testando differenti fattori sperimentali.

Sono state calcolate correlazioni specifiche tra indici comportamentali e neurofisiologici.

Il progetto prevede la continuazione delle attività già avviate con lo scopo di individuare marcatori neurofisiologici che riflettano lo stato cerebrale che possa identificare alterazioni della plasticità corticale attraverso investigazioni con tecniche elettrofisiologiche:

- Modulazioni EEG nelle bande di frequenza di interesse (delta, theta, alpha 1, alpha 2, beta 1, beta 2, gamma);
- Impatto delle stimolazioni NIBS sui meccanismi di plasticità cerebrale nel recupero funzionale e nel decorso patologico e fisiologico.
- Indici di predizione delle patologie e miglioramento ed efficacia delle metodiche di neuro riabilitazione.

## PUBBLICAZIONI

Algieri C, Bernardini C, Marchi S, Forte M, Tallarida MA, Bianchi F, La Mantia D, Algieri V, Stanzione R, Cotugno M, Costanzo P, Trombetti F, Maiuolo L, Forni M, De Nino A, Di Nonno F, Sciarretta S, Volpe M, Rubattu S, Nesci S.

### **1,5-disubstituted-1,2,3-triazoles counteract mitochondrial dysfunction acting on F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase in models of cardiovascular diseases.**

*Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 187(106561), 106561. doi:10.1016/j.phrs.2022.106561

The compromised viability and function of cardiovascular cells are rescued by small molecules of triazole derivatives (Tzs), identified as 3a and 3b, by preventing mitochondrial dysfunction. The oxidative phosphorylation improves the respiratory control rate in the presence of Tzs independently of the substrates that energize the mitochondria. The F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, the main candidate in mitochondrial permeability transition pore (mPTP) formation, is the biological target of Tzs and hydrophilic F<sub>1</sub> domain of the enzyme is depicted as the binding region of Tzs. The protective effect of Tz molecules on isolated mitochondria was corroborated by immortalized cardiomyocytes results. Indeed, mPTP opening was attenuated in response to ionomycin. Consequently, increased mitochondrial roundness and reduction of both length and interconnections between mitochondria. In in-vitro and ex-vivo models of cardiovascular pathologies (i.e., hypoxia-reoxygenation and hypertension) were used to evaluate the Tzs cardioprotective action. Key parameters of porcine aortic endothelial cells (pAECs) oxidative metabolism and cell viability were not affected by Tzs. However, in the presence of either 1 μM 3a or 0.5 μM 3b the impaired cell metabolism of pAECs injured by hypoxia-reoxygenation was restored to control respiratory profile. Moreover, endothelial cells isolated from SHRSP exposed to high-salt treatment rescued the Complex I activity and the endothelial capability to form vessel-like tubes and vascular function in presence of Tzs. As a result, the specific biochemical mechanism of Tzs to block Ca<sup>2+</sup>-activated F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase protected cell viability and preserved the pAECs bioenergetic metabolism upon hypoxia-reoxygenation injury. Moreover, SHRSP improved vascular dysfunction in response to a high-salt treatment.

Authors/Task Force Members; McDonagh TA, Metra M, Adamo M, Gardner RS, Baumbach A, Böhm M, Burri H, Butler J, Čelutkienė J, Chioncel O, Cleland JGF, Coats AJS, Crespo-Leiro MG, Farmakis D, Gilard M, Heymans S, Hoes AW, Jaarsma T, Jankowska EA, Lainscak M, Lam CSP, Lyon AR, McMurray JJV, Mebazaa A, Mindham R, Muneretto C, Francesco Piepoli M, Price S, Rosano GMC, Ruschitzka F, Kathrine Skibelund A; ESC Scientific Document Group.

### **2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: Developed by the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). With the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(1), 4–131. doi:10.1002/ejhf.2333

N, Eckardt L, Friede T, Haugaa KH, Hocini M, Lambiase PD, Marijon E, Merino JL, Peichl P, Priori SG, Reichlin T, Schulz-Menger J, Sticherling C, Tzeis S, Verstrael A, Volterrani M; ESC Scientific Document Group

### **ESC Scientific Document Group. (2022). 2022 ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death.**

*European Heart Journal*, 43(40), 3997–4126. doi:10.1093/eurheartj/ehac262

Kapłon-Cieślicka A, Benson L, Chioncel O, Crespo-Leiro MG, Coats AJS, Anker SD, Filippatos G, Ruschitzka F, Hage C, Drożdż J, Seferovic P, Rosano GMC, Piepoli M, Mebazaa A, McDonagh T, Lainscak M, Savarese G, Ferrari R, Maggioni AP, Lund LH; on behalf of the Heart Failure

Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Heart Failure Long-Term Registry Investigators.

**A comprehensive characterization of acute heart failure with preserved versus mildly reduced versus reduced ejection fraction - insights from the ESC-HFA EORP Heart Failure Long-Term Registry.**

*European Journal of Heart Failure, 24(2), 335–350. doi:10.1002/ejhf.2408*

**Aims:** To perform a comprehensive characterization of acute heart failure (AHF) with preserved (HFpEF), versus mildly reduced (HFmrEF) versus reduced ejection fraction (HFrEF).

**Methods and results:** Of 5951 participants in the ESC HF Long-Term Registry hospitalized for AHF (acute coronary syndromes excluded), 29% had HFpEF, 18% HFmrEF, and 53% HFrEF. Hospitalization reasons were most commonly atrial fibrillation (more in HFmrEF and HFpEF), followed by ischaemia (HFmrEF), infection (HFmrEF and HFpEF), worsening renal function (HFrEF), and uncontrolled hypertension (HFmrEF and HFpEF). Hospitalization characteristics included lower blood pressure, more oedema and higher natriuretic peptides with lower ejection fraction, similar pulmonary congestion, more mitral regurgitation in HFrEF and HFmrEF and more tricuspid regurgitation in HFrEF. In-hospital mortality was 3.4% in HFrEF, 2.1% in HFmrEF and 2.2% in HFpEF. Intravenous diuretic (~80%) and nitrate (~15%) use was similar but inotrope use greater in HFrEF (16%, vs. HFmrEF 7.4% vs. HFpEF 5.3%). Weight loss and estimated glomerular filtration rate improvement were greater in HFrEF, whereas reduction in natriuretic peptides was similar. Over 1 year post-discharge, events per 100 patient-years (95% confidence interval) in HFrEF versus HFmrEF versus HFpEF were: all-cause death 22 (20-24) versus 17 (14-20) versus 17 (15-20); cardiovascular (CV) death 12 (10-13) versus 8.6 (6.6-11) versus 8.4 (6.9-10); non-CV death 2.4 (1.8-3.1) versus 3.3 (2.1-4.8) versus 4.5 (3.5-5.9); all-cause hospitalization 48 (45-51) versus 35 (31-40) versus 42 (39-46); HF hospitalization 29 (27-32) versus 19 (16-22) versus 17 (15-20); and non-CV hospitalization 7.7 (6.6-8.9) versus 9.6 (7.5-12) versus 15 (13-17).

**Conclusion:** In AHF, HFrEF is more severe and has greater in-hospital mortality. Post-discharge, HFrEF has greater CV risk, HFpEF greater non-CV risk, and HFmrEF lower overall risk.

Caminiti G, Perrone MA, Iellamo F, D'Antoni V, Catena M, Franchini A, Volterrani, M.

**Acute left atrial response to different eccentric resistance exercise loads in patients with heart failure with middle range ejection fraction: A pilot study.**

*Journal of Personalized Medicine, 12(5). doi:10.3390/jpm12050689*

In this study, we aimed to assess acute changes occurring on atrial function following single bouts of eccentric resistance exercise (ECC-RE) performed at two different loads. Twenty-five patients with chronic heart failure with middle range ejection fraction (HFmrEF) participated in three experimental sessions in a randomized order and on separate days: two sessions of ECC RE at 20% (ECC-20) of one-repetition maximum (1-RM) and 50% (ECC-50) 1-RM, and one session of control, without exercise. Each session lasted three minutes. Before and immediately after the sessions, patients underwent echocardiography and blood pressure and heart rate measurement. Peak atrial longitudinal strain (PALS) and peak atrial contractile strain (PACS) significantly increased after both ECC-20 (+16.3%) and ECC-50 (+18.1%) compared to control (between sessions  $p = 0.022$ ). Peak atrial contractile strain (PACS) significantly increased after ECC-50 (+28.4%) compared to ECC-20 (+17.0%) and control (between sessions  $p = 0.034$ ). The ratio of transmitral and annular velocities ( $E/E'$ ) increased significantly after ECC-20 (+10.4%) and ECC-50 (+19.0%) compared to control (between groups  $p = 0.003$ ). EF, left ventricular longitudinal strain, and stroke volume did not change after ECC-RE sessions compared to control. Cardiac output increased significantly after ECC-20 and ECC-50 compared to control, (between groups  $p = 0.025$ ). In conclusion, both ECC-RE sessions were well tolerated, and LA functional reserve was properly mobilized in response to ECC-RE in patients with HFmrEF. Cardiac output increased at the cost of an increased LV filling pressure, but no detrimental changes of LV function occurred.

Tomasoni D, Adamo M, Bozkurt B, Heidenreich P, McDonagh T, Rosano GMC, Virani SA, Zieroth S, Metra M.

**Aiming at harmony. Comparing and contrasting International HFREF Guidelines.**

*European Heart Journal Supplements: Journal of the European Society of Cardiology*, 24(Suppl L), L20–L28. doi:10.1093/eurheartjsupp/suac124

Large randomized controlled trials (RCTs) have led to major changes in the treatment of patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction (HFREF) and these advances are included in the recent European Society of Cardiology (ESC) and the American College of Cardiology/American Heart Association/Heart Failure Society of America (ACC/AHA/HFSA) guidelines issued in 2021 and 2022, respectively. According to both guidelines, treatment of patients with HFREF is based on the administration of four classes of drugs that reduce the primary endpoint of cardiovascular death and HF hospitalizations in RCTs: angiotensin-converting enzyme or angiotensin receptor neprilysin inhibitors, beta-blockers, mineralocorticoid receptor antagonists, and sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors. Specific sequences of treatment are not recommended but emphasis is given to reaching treatment with all four drugs as early as possible. Further treatments are considered in selected patients including ivabradine, hydralazine nitrates, digoxin, and the new agent vericiguat. Specific treatments, mostly new, for cardiovascular and non-cardiovascular comorbidities are also given. The aim of this article is to compare the two recent guidelines issued by the ESC and ACC/AHA/HFSA and show the few differences and the many consistent recommendations, now more numerous given the evidence available for many new treatments.

Burton JO, Coats AJS, Kovesdy CP, Palmer BF, Piña IL, Rosano G, Sood MM, Zieroth S.

**An international Delphi consensus regarding best practice recommendations for hyperkalaemia across the cardiorenal spectrum.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(9), 1467–1477. doi:10.1002/ejhf.2612

**Aims:** Renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors (RAASi) are guideline-recommended therapy for individuals with cardiorenal disease. They are associated with increased risk of hyperkalaemia, a common and life-threatening disorder for this population. RAASi-induced hyperkalaemia often leads to dose reduction or discontinuation, reducing cardiorenal protection. Guideline recommendations differ between specialties for the clinical management of hyperkalaemia. Using a modified Delphi method, we developed consensus recommendations for optimal management of hyperkalaemia in adults with cardiorenal disease.

**Methods and results:** An international steering group of cardiologists and nephrologists developed 39 statements regarding hyperkalaemia care, including risk factors and risk stratification, prevention, correction, and cross-specialty coordination. Consensus was determined by agreement on an online questionnaire administered to cardiorenal specialists across Europe and North America. The threshold for consensus agreement was established a priori by the steering group at 67%. Across November 2021, 520 responses were received from Canada (n = 50), France (n = 50), Germany (n = 54), Italy (n = 58), Spain (n = 57), the UK (n = 49), and the US (n = 202); 268 from cardiologists and 252 from nephrologists. Twenty-nine statements attained very high agreement (≥90%) and 10 attained high agreement (≥67% &lt; 90%), with strong alignment between cardiologists and nephrologists.

**Conclusion:** A high degree of consensus regarding hyperkalaemia evaluation and management exists among healthcare professionals. Based on high levels of agreement, the steering group derived six key recommendations for hyperkalaemia prevention and management in people with cardiorenal disease. Future studies examining the quality of hyperkalaemia care delivery are required.

D'Amario D, Rodolico D, Rosano GMC, Dahlström U, Crea F, Lund LH, Savarese G.

**Association between dosing and combination use of medications and outcomes in heart failure with reduced ejection fraction: data from the Swedish Heart Failure Registry.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(5), 871–884. doi:10.1002/ejhf.2477

**Aims:** To assess the association between combination, dose and use of current guideline-recommended target doses (TD) of renin-angiotensin system inhibitors (RASi), angiotensin receptor-neprilysin inhibitors (ARNi) and  $\beta$ -blockers, and outcomes in a large and unselected contemporary cohort of patients with heart failure (HF) and reduced ejection fraction.

**Methods and results:** Overall, 17 809 outpatients registered in the Swedish Heart Failure Registry (SwedeHF) from May 2000 to December 2018, with ejection fraction <40% and duration of HF  $\geq$ 90 days were selected. Primary outcome was a composite of time to cardiovascular death and first HF hospitalization. Compared with no use of RASi or ARNi, the adjusted hazard ratio (HR) (95% confidence interval [CI]) was 0.83 (0.76-0.91) with <50% of TD, 0.78 (0.71-0.86) with 50%-99%, and 0.73 (0.67-0.80) with  $\geq$ 100% of TD. Compared with no use of  $\beta$ -blockers, the adjusted HR (95% CI) was 0.86 (0.76-0.91), 0.81 (0.74-0.89) and 0.74 (0.68-0.82) with <50%, 50%-99% and  $\geq$ 100% of TD, respectively. Patients receiving both an angiotensin-converting enzyme inhibitor (ACEi)/angiotensin receptor blocker (ARB)/ARNi and a  $\beta$ -blocker at 50%-99% of TD had a lower adjusted risk of the primary outcome compared with patients only receiving one drug, i.e. ACEi/ARB/ARNi or  $\beta$ -blocker, even if this was at  $\geq$ 100% of TD.

**Conclusion:** Heart failure with reduced ejection fraction patients using higher doses of RASi or ARNi and  $\beta$ -blockers had lower risk of cardiovascular death or HF hospitalization. Use of two drug classes at 50%-99% of TD dose was associated with lower risk than one drug class at 100% of TD.

Ferrannini G, Lund LH, Benson L, Rizzo M, Almahmeed W, Rosano GMC, Savarese G, Cosentino F.

**Association between use of novel glucose-lowering drugs and COVID-19 hospitalization and death in patients with type 2 diabetes: a nationwide registry analysis.**

*European Heart Journal. Cardiovascular Pharmacotherapy*, 9(1), 10–17. doi:10.1093/ehjcvp/pvac044

**Aims:** Type 2 diabetes (T2DM) in patients with coronavirus disease-19 (COVID-19) is associated with a worse prognosis. We separately investigated the associations between the use of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (SGLT2i), glucagon-like peptide-1 receptor agonists (GLP-1 RA), and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors (DPP-4i), and the risk of COVID-19 hospitalization and death.

**Methods and results:** Patients with T2DM registered in the Swedish National Patient Registry and alive on 1 February 2020 were included. 'Incident severe COVID-19' was defined as the first hospitalization and/or death from COVID-19. A modified Poisson regression approach was applied to a 1:1 propensity score-matched population receiving vs. not receiving SGLT2i, GLP-1 RA, and DPP-4i to analyse the associations between their use and (I) incident severe COVID-19 and (II) risk of 30-day mortality in patients hospitalized for COVID-19. Among 344 413 patients, 39 172 (11%) were treated with SGLT2i, 34 290 (10%) with GLP-1 RA, and 53 044 (15%) with DPP-4i; 9538 (2.8%) had incident severe COVID-19 by 15 May 2021. SGLT2i and DPP-4i were associated with a 10% and 11% higher risk of incident severe COVID-19, respectively, whereas there was no association for GLP-1 RA. DPP-4i was also associated with a 10% higher 30-day mortality in patients hospitalized for COVID-19, whereas there was no association for SGLT2i and GLP-1 RA.

**Conclusion:** SGLT2i and DPP-4i use were associated with a higher risk of incident severe COVID-19. DPP-4i use was associated with higher 30-day mortality in patients with COVID-19, whereas SGLT2i use was not. No increased risk for any outcome was observed with GLP-1 RA.

Padilla, N., Pacifici, F., Di Perna, P., Vitiello, L., ... Uccioli, L. (2022).

Infante M, Fabbri A, Padilla N, Pacifici F, Di Perna P, Vitiello L, Feraco A, Giuliano M, Passeri M, Caprio M, Ricordi C, Della-Morte D, Uccioli L.

**BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine does not impact the honeymoon phase in type 1 diabetes: A case report.**

*Vaccines*, 10(7), 1096. doi:10.3390/vaccines10071096

Type 1 diabetes (T1D), which is caused by the autoimmune destruction of insulin-secreting pancreatic beta cells, represents a high-risk category requiring COVID-19 vaccine prioritization. Although COVID-19 vaccination can lead to transient hyperglycemia (vaccination-induced hyperglycemia; ViHG), its influence on the course of the clinical remission phase of T1D (a.k.a. "honeymoon phase") is currently unknown. Recently, there has been an increasing concern that COVID-19 vaccination may trigger autoimmune phenomena. We describe the case of a 24-year-old young Italian man with T1D who received two doses of the BNT162b2 mRNA (Pfizer-BioNTech) COVID-19 vaccine during a prolonged honeymoon phase. He experienced a transient impairment in glucose control (as evidenced by continuous glucose monitoring) that was not associated with substantial changes in stimulated C-peptide levels and islet autoantibody titers. Nonetheless, large prospective studies are needed to confirm the safety and the immunometabolic impact of the BNT162b2 vaccine in T1D patients during the honeymoon phase. Thus far, T1D patients who are going to receive COVID-19 vaccination should be warned about the possible occurrence of transient ViHG and should undergo strict postvaccination surveillance.

Condorelli, R. A., Aversa, A., Basile, L., Cannarella, R., Mongioì, L. M., Cimino, L., ... La Vignera, S. (2022).

**Beneficial effects of the very-low-calorie ketogenic diet on the symptoms of male accessory gland inflammation.**

*Nutrients*, 14(5), 1081. doi:10.3390/nu14051081

Introduction. Obesity exposes individuals to the risk of chronic inflammation of the prostate gland. Aim and design of the study. A longitudinal clinical study was conducted on selected overweight/obese patients with male accessory gland inflammation (MAGI) to evaluate the effects of body weight loss on their urogenital symptoms. Materials and methods. One hundred patients were selected and assigned to two groups undergoing two different nutritional programs. The first group (n = 50) started a Mediterranean diet (MedDiet) and the second (n = 50) a very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD). Before and after three months on the diet, each patient was evaluated for body weight, waist circumference, and MAGI symptoms. The MAGI was assessed using the Structured Interview about MAGI (SI-MAGI), a questionnaire previously designed to assess the symptoms of MAGI. The questionnaire explores four domains, including urinary symptoms, ejaculatory pain or discomfort, sexual dysfunction, and impaired quality of life. Finally, in the two groups, the frequency of an  $\alpha$ -blocker used to treat urinary tract symptoms was also evaluated. Results. Patients on MedDiet experienced significant amelioration in urinary symptoms and quality of life. Patients under VLCKD reported not only significant improvement of the same parameters, but also in ejaculatory pain/discomfort and sexual dysfunction. Finally, the percentage of patients on VLCKD taking the  $\alpha$ -blocker decreased significantly. Moreover, patients under VLCKD showed a greater loss of body weight than those following the MedDiet. Discussion. The results of this study support the effectiveness of VLCKD in improving the symptoms of patients with MAGI. This improvement involved all of the domains of the SI-MAGI questionnaire and became manifest in a relatively short time. We suggest that a ketogenic nutritional approach can be used in overweight/obese patients with MAGI.

Seferović, P., Farmakis, D., Bayes-Genis, A., Ben Gal, T., Böhm, M., Chioncel, O., ... Coats, A. J. S. (2022).

**Biomarkers for the prediction of heart failure and cardiovascular events in patients with type 2 diabetes: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(7), 1162–1170. doi:10.1002/ejhf.2575

Knowledge on risk predictors of incident heart failure (HF) in patients with type 2 diabetes (T2D) is crucial given the frequent coexistence of the two conditions and the fact that T2D doubles the risk of incident HF. In addition, HF is increasingly being recognized as an important endpoint in trials in T2D. On the other hand, the diagnostic and prognostic performance of established cardiovascular biomarkers may be modified by the presence of T2D. The present position paper, derived by an expert panel

workshop organized by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, summarizes the current knowledge and gaps in evidence regarding the use of a series of different biomarkers, reflecting various pathogenic pathways, for the prediction of incident HF and cardiovascular events in patients with T2D and in those with established HF and T2D.

Bayes-Genis, A., Aimo, A., Jhund, P., Richards, M., de Boer, R. A., Arfsten, H., ... Januzzi, J. L. (2022).

**Biomarkers in heart failure clinical trials. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(10), 1767–1777. doi:10.1002/ejhf.2675

The approval of new heart failure (HF) therapies has slowed over the past two decades in part due to the high costs of conducting large randomized clinical trials that are needed to adequately power major clinical endpoint studies. Several biomarkers have been identified reflecting different elements of HF pathophysiology, with possible applications in diagnosis, risk stratification, treatment monitoring, and even in the design of clinical trials. Biomarkers could potentially be used to refine study inclusion criteria to enable enrolment of patients who are more likely to respond to a therapeutic intervention, despite being at sufficient risk to meet pre-determined study endpoint rates. When there is a close relationship between biomarker levels and clinical endpoints, changes in biomarker levels after a given treatment can act as a surrogate endpoint, potentially reducing the duration and cost of a clinical trial. Natriuretic peptides have been widely used in clinical trials with a variable amount of added value, which such variation being probably due to the absence of a close pathophysiological connection to the study drug. Notable exceptions to this include sacubitril/valsartan and vericiguat. Future studies should seek to adopt unbiased approaches for discovery of true companion diagnostics; with -omics-based tools, biomarkers might be more precisely selected for use in clinical trials to identify responses that closely reflect the biological effects of the drug under investigation. Finally, biomarkers associated with cardiac damage and remodelling, such as cardiac troponin, could be employed as safety endpoints provided that standardization between different assays is achieved.

González A, Richards AM, de Boer RA, Thum T, Arfsten H, Hülsmann M, Falcao-Pires I, Díez J, Foo RSY, Chan MY, Aimo A, Anene-Nzelu CG, Abdelhamid M, Adamopoulos S, Anker SD, Belenkov Y, Gal TB, Cohen-Solal AL, Böhm M, Chioncel O, Delgado V, Emdin M, Jankowska EA, Gustafsson F, Hill L, Jaarsma T, Januzzi JL, Jhund PS, Lopatin Y, Lund LH, Metra M, Milicic D, Moura B, Mueller C, Mullens W, Núñez J, Piepoli MF, Rakisheva A, Ristić AD, Rossignol P, Savarese G, Tocchetti CG, Van Linthout S, Volterrani M, Seferovic P, Rosano G, Coats AJS, Bayés-Genís.

**Cardiac remodelling - Part 1: From cells and tissues to circulating biomarkers. A review from the Study Group on Biomarkers of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(6), 927–943. doi:10.1002/ejhf.2493

Cardiac remodelling refers to changes in left ventricular structure and function over time, with a progressive deterioration that may lead to heart failure (HF) development (adverse remodelling) or vice versa a recovery (reverse remodelling) in response to HF treatment. Adverse remodelling predicts a worse outcome, whilst reverse remodelling predicts a better prognosis. The geometry, systolic and diastolic function and electric activity of the left ventricle are affected, as well as the left atrium and on the long term even right heart chambers. At a cellular and molecular level, remodelling involves all components of cardiac tissue: cardiomyocytes, fibroblasts, endothelial cells and leucocytes. The molecular, cellular and histological signatures of remodelling may differ according to the cause and severity of cardiac damage, and clearly to the global trend toward worsening or recovery. These processes cannot be routinely evaluated through endomyocardial biopsies, but may be reflected by circulating levels of several biomarkers. Different classes of biomarkers (e.g. proteins, non-coding RNAs,



metabolites and/or epigenetic modifications) and several biomarkers of each class might inform on some aspects on HF development, progression and long-term outcomes, but most have failed to enter clinical practice. This may be due to the biological complexity of remodelling, so that no single biomarker could provide great insight on remodelling when assessed alone. Another possible reason is a still incomplete understanding of the role of biomarkers in the pathophysiology of cardiac remodelling. Such role will be investigated in the first part of this review paper on biomarkers of cardiac remodelling.

Aimo, A., Vergaro, G., González, A., Barison, A., Lupón, J., Delgado, V., ... Bayes-Genis, A. (2022). Cardiac remodelling - Part 2: Clinical, imaging and laboratory findings.

**A review from the Study Group on Biomarkers of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(6), 944–958. doi:10.1002/ejhf.2522

Visco V, Lippi ME, Salerno G, Licata MVA, de Dominicis C, Antolino G, La Verde G, Santino I, Simmaco M, Sciacchitano S.

**Challenges in diagnosis and clinical management of COVID-19 in patient with B-cell chronic Lymphocytic leukemia (CLL): Report of one case.**

*Hematology Reports*, 14(1), 31–37. doi:10.3390/hematolrep14010006

We report here a case of a patient affected by B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) that developed COVID-19 during the actual SARS-CoV-2 outbreak. The coexistence of CLL and COVID-19 raises many questions regarding the possible increased risk of developing COVID-19 among patients with CLL, the problems in managing therapies for both diseases and, above all, the difficulties in diagnosing COVID-19 in patients affected by CLL. In our patient, an 84-year-old man, the recognition of COVID-19 was delayed because of its atypical clinical presentation and technical problems related to the methods used for the diagnosis. Based on the symptoms and the radiological aspect of the lung, the occurrence of COVID-19 was suspected. Repeated tests on oro/nasopharyngeal swabs gave negative results, causing a delay in the diagnosis. Moreover, different methods used to identify the SARS-CoV-2 antibodies in serum gave conflicting results, and only two tests were able to identify SARS-CoV-2 Abs of the IgG type. During the clinical course of unrecognized COVID-19, our patient developed severe complications and did not receive any specific treatment for the two diseases. Recognition of COVID-19 in patients with CLL is a challenging task and the most accurate methods are necessary to overcome the diagnostic difficulties encountered.

Barrea L, Caprio M, Camajani E, Verde L, Elce A, Frias-Toral E, Ceriani F, Cucalón G, Garcia-Velasquez E, El Ghoch M, Colao A, Savastano A, Muscogiuri G.

**Clinical and nutritional management of very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) in patients with psoriasis and obesity: a practical guide for the nutritionist.**

*Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17. doi:10.1080/10408398.2022.2083070

Psoriasis is an immune-mediated inflammatory skin disease associated with multiple comorbidities. Considered one of the most common inflammatory skin diseases among the general population, it not only affects the skin, but also negatively impacts other organs and joints. In addition, psoriasis has been associated with several chronic cardio-metabolic diseases such as obesity, which would seem to be (i) a risk factor for the onset of psoriasis and (ii) a worsening factor of the severity of the disease. Weight loss appears to improve severity in overweight patients. Recently proposed as an obesity management nutritional strategy, the very-low-calorie ketogenic diet (VLCKD) has demonstrated significant effects in reducing inflammatory processes. In the current review, we describe the evidence available on psoriasis and VLCKD, and provide a practical guide to the prescription of VLCKD in the different phases, evaluation and management of possible adverse events, and the importance of physical activity as a lifestyle modification to reduce psoriasis and associated comorbidities. Randomized control trials are, however, necessary to determine the most effective VLCKD protocol for patients with obesity and psoriasis,

optimal protocol duration, composition of micronutrients and macronutrients, choice of special supplements, and management of carbohydrate reintroduction.

Mollace R, Macrì R, Tavernese A, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, Fini M, Volterrani M, Mollace V.

**Comparative effect of bergamot polyphenolic fraction and red yeast rice extract in rats fed a hyperlipidemic diet: Role of antioxidant properties and PCSK9 expression.**

*Nutrients*, 14(3), 477. doi:10.3390/nu14030477

Elevated serum cholesterol levels, either associated or not with increased triglycerides, represent a risk of developing vascular injury, mostly leading to atherothrombosis-related diseases including myocardial infarction and stroke. Natural products have been investigated in the last few decades as they are seen to offer an alternative solution to counteract cardiometabolic risk, due to the occurrence of side effects with the use of statins, the leading drugs for treating hyperlipidemias. Red yeast rice (RYR), a monacolin K-rich natural extract, has been found to be effective in counteracting high cholesterol, being its use accompanied by consistent warnings by regulatory authorities based on the potential detrimental responses accompanying its statin-like chemical characteristics. Here we compared the effects of RYR with those produced by bergamot polyphenolic fraction (BPF), a well-known natural extract proven to be effective in lowering both serum cholesterol and triglycerides in animals fed a hyperlipidemic diet. In particular, BPF at doses of 10 mg/Kg given orally for 30 consecutive days, counteracted the elevation of both serum LDL cholesterol (LDL-C) and triglycerides induced by the hyperlipidemic diet, an effect which was accompanied by significant reductions of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase serum levels, two biomarkers of oxidative stress. Furthermore, the activity of BPF was associated to increased HDL cholesterol (HDL-C) levels and to strong reduction of Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) levels which were found increased in hyperlipidemic rats. In contrast, RYR at doses of 1 and 3 mg/Kg, produced only significant reduction of LDL-C with very poor effects on triglycerides, HDL-C, glutathione peroxidase, MDA and PCSK9 expression. This indicates that while BPF and RYR both produce serum cholesterol-lowering benefits, BPF produces additional effects on triglycerides and HDL cholesterol compared to RYR at the doses used throughout the study. These additional effects of BPF appear to be related to the reduction of PCSK9 expression and to the antioxidant properties of this extract compared to RYR, thereby suggesting a more complete protection from cardiometabolic risk.

Iellamo F, Perrone MA, Cimini A, Caminiti G, Chiaravalloti A, Parisi A, Schillaci O. (2022).

**Complementary role of combined indirect and direct cardiac sympathetic (hyper)activity assessment in patients with heart failure by spectral analysis of heart rate variability and nuclear imaging: Possible application in the evaluation of exercise training effects.**

*Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 9(6), 181. doi:10.3390/jcdd9060181

In chronic heart failure (CHF), abnormalities in cardiac autonomic control, characterized by sympathetic overactivity, contribute to the progression of the disease and are associated with an unfavorable prognosis. Assessing cardiac autonomic status is clinically important in the management of patients with CHF. To this aim, heart rate variability (HRV) analysis has been extensively used as a non-invasive tool for assessing cardiac autonomic regulation, and has been shown to predict the clinical outcome in patients with CHF. Adrenergic nerve activity has also been estimated using iodine-123 (I-123) metaiodobenzylguanidine (MIBG), a noradrenaline analogue. MIBG is an analogue of norepinephrine sharing the same cellular mechanism of uptake, storage, and release in presynaptic sympathetic neurons. As an innervation tracer, <sup>123</sup>I-MIBG allows for the evaluation of cardiac sympathetic neuronal function. Cardiac MIBG imaging has also been reported to predict a poor clinical outcome in CHF. MIBG provides direct information on the function of the presynaptic sympathetic nerve endings, whereas HRV, which depends on postsynaptic signal transduction, reflects the end-organ response of the sinus node. The aim of this brief review is to provide the reader with some basic concepts regarding the spectral analysis of HRV and MIBG, highlighting what is known about their respective roles in detecting cardiac

sympathetic hyperactivity in CHF and, in perspective, their possible combined use in assessing non-pharmacological treatments in patients with CHF and reduced ejection fraction, with a particular focus on the effects of exercise training.

Caminiti G, Iellamo F, Perrone MA, Marazzi G, Gismondi A, Cerrito, A., ... Volterrani, M. (2022). **Concurrent aerobic plus resistance training elicits different effects on short-term blood pressure variability of hypertensive patients in relation to their nocturnal blood pressure pattern.**

*Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(11), 1682. doi:10.3390/medicina58111682

**Background and Objectives:** The purpose of this study was to investigate the effects of a 12-week concurrent training (CT) (i.e., aerobic plus resistance exercise) on short-term blood pressure variability (BPV) and BP values in hypertensive patients with non-dipper BP nocturnal pattern and underlying coronary artery disease. **Material and Methods:** The study included 72 consecutive patients who were divided into two groups according to the nocturnal BP pattern: dipping pattern (33 pts) and non-dipping (39 pts). Before starting CT and at 12 weeks, patients underwent the six minute walk test, ergometric test, assessment of 1-repetition maximum (1 RM), and 24/h BP monitoring (24-h ABPM). **Results:** After CT, exercise capacity increased in both groups in a similar fashion. Twenty-four/h systolic BPV and daytime systolic BPV decreased significantly in the dipping group while they were unchanged in the non-dipping group (between groups changes:  $-1.0 \pm 0.4$  mmHg and  $-1.3 \pm 0.9$  mmHg;  $p = 0.02$  and  $p = 0.006$ , respectively). Twenty-four/h systolic BP and daytime systolic BP decreased significantly in the dipping group while they were unchanged in the non-dipping group (between groups changes:  $-7.1 \pm 2.6$  mmHg and  $-7.8 \pm 2.4$  mmHg;  $p = 0.004$  and  $p = 0.002$ , respectively). Nighttime systolic BP and BPV was unchanged in both groups. Twenty-four/h diastolic BP presented small but not significant changes in both groups. **Conclusions:** The effects of CT on BPV and BP were blunted in hypertensive subjects with a non-dipping BP pattern.

Núñez J, de la Espriella R, Rossignol P, Voors AA, Mullens W, Metra M, Chioncel O, Januzzi JL, Mueller C, Richards AM, de Boer RA, Thum T, Arfsten H, González A, Abdelhamid M, Adamopoulos S, Anker SD, Gal TB, Biegus J, Cohen-Solal A, Böhm M, Emdin M, Jankowska EA, Gustafsson F, Hill L, Jaarsma T, Jhund PS, Lopatin Y, Lund LH, Milicic D, Moura B, Piepoli MF, Ponikowski P, Rakisheva A, Ristic A, Savarese G, Tocchetti CG, Van Linthout S, Volterrani M, Seferovic P, Rosano G, Coats AJS, Bayes-Genis A.

**Congestion in heart failure: a circulating biomarker-based perspective. A review from the Biomarkers Working Group of the Heart Failure Association, European Society of Cardiology.** *European Journal of Heart Failure*, 24(10), 1751–1766. doi:10.1002/ejhf.2664

Congestion is a cardinal sign of heart failure (HF). In the past, it was seen as a homogeneous epiphenomenon that identified patients with advanced HF. However, current evidence shows that congestion in HF varies in quantity and distribution. This updated view advocates for a congestive-driven classification of HF according to onset (acute vs. chronic), regional distribution (systemic vs. pulmonary), compartment of distribution (intravascular vs. extravascular), and clinical vs. subclinical. Thus, this review will focus on the utility of circulating biomarkers for assessing and managing the different fluid overload phenotypes. This discussion focused on the clinical utility of the natriuretic peptides, carbohydrate antigen 125 (also called mucin 16), bio-adrenomedullin and mid-regional pro-adrenomedullin, ST2 (also known as interleukin-1 receptor-like 1), cluster of differentiation 146, troponin, C-terminal pro-endothelin-1, and parameters of haemoconcentration. The utility of circulation biomarkers on top of clinical evaluation, haemodynamics, and imaging needs to be better determined by dedicated studies. Some multiparametric frameworks in which these tools contribute to management are proposed.

Barrea L, Caprio M, Watanabe M, Cammarata G, Feraco A, Muscogiuri G, Verde L, Colao A, Savastano S.

**Could very low-calorie ketogenic diets turn off low grade inflammation in obesity? Emerging evidence.**

*Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–17. doi:10.1080/10408398.2022.2054935

Obesity is an emerging non-communicable disease associated with chronic low-grade inflammation and oxidative stress, compounded by the development of many obesity-related diseases, such as cardiovascular disease, type 2 diabetes mellitus, and a range of cancers. Originally developed for the treatment of epilepsy in drug non-responder children, the ketogenic diet (KD) is being increasingly used in the treatment of many diseases, including obesity and obesity-related conditions. The KD is a dietary pattern characterized by high fat intake, moderate to low protein consumption, and very low carbohydrate intake (<50 g) that has proved to be an effective and weight-loss tool. In addition, it also appears to be a dietary intervention capable of improving the inflammatory state and oxidative stress in individuals with obesity by means of several mechanisms. The main activity of the KD has been linked to improving mitochondrial function and decreasing oxidative stress.  $\beta$ -hydroxybutyrate, the most studied ketone body, has been shown to reduce the production of reactive oxygen species, improving mitochondrial respiration. In addition, KDs exert anti-inflammatory activity through several mechanisms, e.g., by inhibiting activation of the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, and the inflammatory nucleotide-binding, leucine-rich-containing family, pyrin domain-containing-3, and inhibiting histone deacetylases. Given the rising interest in the topic, this review looks at the underlying anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of KDs and their possible recruitment in the treatment of obesity and obesity-related disorders.

Aktaa, S, Batra, G, Cleland JGF, Coats A, Lund LH, McDonagh, T, Rosano G, Seferovic P, Vasko P, Wallentin L, Maggioni AP, Casadei B, Gale CP; Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.

**Data standards for heart failure: the European Unified Registries for Heart Care Evaluation and Randomized Trials (EuroHeart).**

*European Heart Journal*, 43(23), 2185–2195. doi:10.1093/eurheartj/ehac151

Standardized data definitions are essential for assessing the quality of care and patient outcomes in observational studies and randomized controlled trials. The European Unified Registries for Heart Care Evaluation and Randomized Trials (EuroHeart) project of the European Society of Cardiology (ESC) aims to create contemporary pan-European data standards for cardiovascular diseases, including heart failure (HF). We followed the EuroHeart methodology for cardiovascular data standard development. A Working Group including experts in HF registries, representatives from the Heart Failure Association of the ESC, and the EuroHeart was formed. Using Embase and Medline (2016-21), we conducted a systematic review of the literature on data standards, registries, and trials to identify variables pertinent to HF. A modified Delphi method was used to reach a consensus on the final set of variables. For each variable, the Working Group developed data definitions and agreed on whether it was mandatory (Level 1) or additional (Level 2). In total, 84 Level 1 and 79 Level 2 variables were selected for nine domains of HF care. These variables were reviewed by an international Reference Group with the Level 1 variables providing the dataset for registration of patients with HF on the EuroHeart IT platform. By means of a structured process and interaction with international stakeholders, harmonized data standards for HF have been developed. In the context of the EuroHeart, this will facilitate quality improvement, international observational research, registry-based randomized trials, and post-marketing surveillance of devices and pharmacotherapies across Europe.

Infante M, Padilla N, Alejandro R, Caprio M, Della-Morte D, Fabbri A, Ricordi, C.

**Diabetes-modifying antirheumatic drugs: The roles of DMARDs as glucose-lowering agents.** *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 58(5), 571. doi:10.3390/medicina58050571

Systemic inflammation represents a shared pathophysiological mechanism which underlies the frequent clinical associations among chronic inflammatory rheumatic diseases (CIRDs), insulin resistance, type 2 diabetes (T2D), and chronic diabetes complications, including cardiovascular disease. Therefore, targeted anti-inflammatory therapies are attractive and highly desirable interventions to concomitantly reduce rheumatic disease activity and to improve glucose control in patients with CIRDs and comorbid T2D. Therapeutic approaches targeting inflammation may also play a role in the prevention of prediabetes and diabetes in patients with CIRDs, particularly in those with traditional risk factors and/or on high-dose corticosteroid therapy. Recently, several studies have shown that different disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) used for the treatment of CIRDs exert antihyperglycemic properties by virtue of their anti-inflammatory, insulin-sensitizing, and/or insulinotropic effects. In this view, DMARDs are promising drug candidates that may potentially reduce rheumatic disease activity, ameliorate glucose control, and at the same time, prevent the development of diabetes-associated cardiovascular complications and metabolic dysfunctions. In light of their substantial antidiabetic actions, some DMARDs (such as hydroxychloroquine and anakinra) could be alternatively termed "diabetes-modifying antirheumatic drugs", since they may be repurposed for co-treatment of rheumatic diseases and comorbid T2D. However, there is a need for future randomized controlled trials to confirm the beneficial metabolic and cardiovascular effects as well as the safety profile of distinct DMARDs in the long term. This narrative review aims to discuss the current knowledge about the mechanisms behind the antihyperglycemic properties exerted by a variety of DMARDs (including synthetic and biologic DMARDs) and the potential use of these agents as antidiabetic medications in clinical settings.

Kapelios CJ, Lund LH, Benson L, Dahlström U, Rosano GMC, Hauptman PJ, Savarese G.

**Digoxin use in contemporary heart failure with reduced ejection fraction: an analysis from the Swedish Heart Failure Registry. *European Heart Journal*.**

*Cardiovascular Pharmacotherapy*, 8(8), 756–767. doi:10.1093/ehjcvp/pvab079

**Aims:** Digoxin is included in some heart failure (HF) guidelines but controversy persists about the true role for and impact of treatment with this drug, particularly in the absence of atrial fibrillation (AF). The aim of this study was to assess the association between clinical characteristics and digoxin use and between digoxin use and mortality/morbidity in a large, contemporary cohort of patients with HF with reduced ejection fraction (HFrEF) stratified by history of AF.

**Methods and results:** Patients with HFrEF (EF < 40%) enrolled in the Swedish HF registry between 2005 and 2018 were analysed. The independent association between digoxin use and patient characteristics was assessed by logistic regression, and between digoxin use and outcomes [composite of all-cause mortality or HF hospitalization (HFH), all-cause mortality, and HFH] by Cox regressions in a 1:1 propensity score matched population. Digoxin use was analysed at baseline and as a time-dependent variable. Of 42 456 patients with HFrEF, 16% received digoxin, 29% in the AF group and 2.8% in the non-AF group. The main independent predictors of use were advanced HF, higher heart rate, history of AF, preserved renal function, and concomitant use of beta blockers. Digoxin use was associated with lower risk of all-cause death/HFH [hazard ratio (HR): 0.95; 95% confidence interval (CI): 0.91-0.99] in AF, but with higher risk in non-AF (HR: 1.24; 95% CI: 1.09-1.43). Consistent results were observed when digoxin use was analysed as a time-dependent variable.

**Conclusion:** The great majority of digoxin users had a history of AF. Digoxin use was associated with lower mortality/morbidity in patients with AF, but with higher mortality/morbidity in patients without AF.

Hryciw DH, Stocker CJ, Morris MJ, Caprio M.

**Editorial: Leptin, obesity and diet at a glance.**

*Frontiers in Endocrinology*, 13, 1073850. doi:10.3389/fendo.2022.1073850

Mullens W, Coats A, Seferovic P, Metra M, Mebazaa A, Ruschitzka F, Filippatos G, Volterrani M, Ponikowski P, Jankowska EA, Chioncel O, McDonagh TA, Piepoli MF, Milicic D, Thum T, Hill L,

Abdelhamid M, Adamopoulos S, Belenkov Y, Ben Gal TB, Böhm M, Cohen-Solal AC, Gustafsson F, Jaarsma T, Moura B, Rakisheva A, Ristic A, Bayes-Genis A, Van Linthout S, Anker SD, Tocchetti CG, Lopatin Y, Lund L, Savarese G, Čelutkienė J, Cowie M, Lambrinou E, Ray R, Lainscak M, Skouri H, Wallner M, Rosano GMC.

**Education and certification on heart failure of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(2), 249–253. doi:10.1002/ejhf.2430

Mancin L, Amatori S, Caprio M, Sattin E, Bertoldi L, Cenci L, Sisti D, Bianco A, Paoli A.

**Effect of 30 days of ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts on athletes' gut microbiome composition.**

*Frontiers in Nutrition*, 9, 979651. doi:10.3389/fnut.2022.979651

Background: Recent research suggest that gut microbiome may play a fundamental role in athlete's health and performance. Interestingly, nutrition can affect athletic performance by influencing the gut microbiome composition. Among different dietary patterns, ketogenic diet represents an efficient nutritional approach to get adequate body composition in athletes, however, some concerns have been raised about its potential detrimental effect on gut microbiome. To the best of our knowledge, only one study investigated the effect of ketogenic diet on the gut microbiome in athletes (elite race walkers), whilst no studies are available in a model of mixed endurance/power sport such as soccer. This study aimed to investigate the influence of a ketogenic Mediterranean diet with phytoextracts (KEMEPHY) diet on gut microbiome composition in a cohort of semi-professional soccer players.

Methods: 16 male soccer players were randomly assigned to KEMEPHY diet (KDP n = 8) or western diet (WD n = 8). Body composition, performance measurements and gut microbiome composition were measured before and after 30 days of intervention by 16S rRNA amplicon sequencing. Alpha-diversity measures and PERMANOVA was used to investigate pre-post differences in the relative abundance of all taxonomic levels (from phylum to genus) and Spearman's correlations was used to investigate associations between microbial composition and macronutrient intake. Linear discriminant analysis was also performed at the different taxonomic levels on the post-intervention data.

Results: No differences were found between pre and post- dietary intervention for microbial community diversity: no significant effects of time ( $p = 0.056$ ,  $ES = 0.486$  and  $p = 0.129$ ,  $ES = 0.388$ , respectively for OTUs number and Shannon's ENS), group ( $p = 0.317$ ,  $ES = 0.180$  and  $p = 0.809$ ,  $ES = 0.047$ ) or time  $\times$  group ( $p = 0.999$ ,  $ES = 0.01$  and  $p = 0.230$ ,  $ES = 0.315$ ). Post-hoc paired Wilcoxon test showed a significant time  $\times$  group effect for Actinobacteriota ( $p = 0.021$ ,  $ES = 0.578$ ), which increased in the WD group (median pre: 1.7%; median post: 2.3%) and decreased in the KEMEPHY group (median pre: 4.3%; median post: 1.7%). At genus level, the linear discriminant analysis in the post intervention differentiated the two groups for Bifidobacterium genus (pertaining to the Actinobacteria phylum), Butyricoccus and Acidaminococcus genera, all more abundant in the WD group, and for Clostridia UCG-014 (order, family, and genus), Butyricimonas, Odoribacterter genera (pertaining to the Marinifilaceae family), and Ruminococcus genus, all more abundant in the KEMEPHY group.

Conclusions: Our results demonstrate that 30 days of KEMEPHY intervention, in contrast with previous research on ketogenic diet and gut microbiome, do not modify the overall composition of gut microbiome in a cohort of athletes. KEMEPHY dietary pattern may represent an alternative and safety tool for maintaining and/or regulating the composition of gut microbiome in athletes practicing regular exercise. Due to the fact that not all ketogenic diets are equal, we hypothesized that each version of ketogenic diet, with different kind of nutrients or macronutrients partitioning, may differently affect the human gut microbiome.

Mollace A, Macrì R, Mollace R, Tavernese A, Gliozzi M, Musolino V, Carresi C, Maiuolo J, Nicita M, Caminiti R, Paone S, Barillà F, Volterrani M, Mollace V.

**Effect of ferric carboxymaltose supplementation in patients with heart failure with preserved ejection fraction: Role of attenuated oxidative stress and improved endothelial function.**  
*Nutrients*, 14(23), 5057. doi:10.3390/nu14235057

Both clinical and experimental evidence shows that iron deficiency (ID) correlates with an increased incidence of heart failure (HF). Moreover, data on iron supplementation demonstrating a beneficial effect in subjects with HF have mostly been collected in patients undergoing HF with reduced ejection fraction (HFrEF). Relatively poor data, however, exist on the potential of iron supplementation in patients with HF with preserved ejection fraction (HFpEF). Here, we report on data emerging from a multicentric, double-blind, randomized, placebo-controlled study investigating the effect of IV supplementation with a placebo or ferric carboxymaltose (FCM) on 64 subjects with HFpEF. ID was detected by the measurement of ferritin levels. These data were correlated with cardiac performance measurements derived from a 6 min walking test (6MWT) and with echocardiographic determinations of diastolic function. Moreover, an EndoPAT analysis was performed to correlate cardiac functionality with endothelial dysfunction. Finally, the determination of serum malondialdehyde (MDA) was performed to study oxidative stress biomarkers. These measurements were carried out before and 8 weeks after starting treatment with a placebo (100 mL of saline given i.v. in 10 min; n = 32) or FCM at a dose of 500 mg IV infusion (n = 32), which was given at time 0 and repeated after 4 weeks. Our data showed that a condition of ID was more frequently associated with impaired diastolic function, worse 6MWT and endothelial dysfunction, an effect that was accompanied by elevated MDA serum levels. Treatment with FCM, compared to the placebo, improved ferritin levels being associated with an improved 6MWT, enhanced cardiac diastolic function and endothelial reactivity associated with a significant reduction in MDA levels. In conclusion, this study confirmed that ID is a frequent comorbidity in patients with HFpEF and is associated with reduced exercise capacity and oxidative stress-related endothelial dysfunction. Supplementation with FCM determines a significant improvement in diastolic function and the exercise capacity of patients with HFpEF and is associated with an enhanced endothelial function and a reduced production of oxygen radical species.

Caminiti G, Perrone MA, Volterrani M, Iellamo F, Marazzi G, Selli S, Franchini A, Padua E.  
**Effects of concurrent aerobic plus resistance training on blood pressure variability and blood pressure values in patients with hypertension and coronary artery disease: Gender-related differences.**

*Journal of Cardiovascular Development and Disease*, 9(6). doi:10.3390/jcdd9060172

The purpose of this study was to compare changes in blood pressure variability (BPV) and blood pressure (BP) values occurring in response to concurrent training (CT) between the two genders. A total of 35 males and 20 women aged 55-80 years, with hypertension and coronary artery disease, were included. They underwent a 12-week CT program. The aerobic component of CT was performed according to the rate of perceived exertion while the intensity of the resistance component was set at 60% of 1 repetition maximum for the first 4 weeks and then increased to 80%. BP and BPV were evaluated at baseline and at the end of the CT program through 24 h ambulatory blood pressure monitoring. After 12-weeks, 24 h and daytime systolic BPV decreased in both men and women without significant between-groups differences. Twenty-four-hour daytime and nighttime diastolic BPV decreased in both genders with a significantly greater decrease in women compared to men. Twenty-four-hour daytime systolic and 24 h diastolic BP decreased in men while they were unchanged in women. In conclusion, CT induced similar reductions of systolic BPV in men and women and a greater decrease in diastolic BPV in women. Conversely, CT decreased BP values in males but not in females. CT appears to be an effective intervention for reducing BPV in both genders.

Volpe M, Gallo G, Rubattu S.

**Endocrine functions of the heart: from bench to bedside.**

*European Heart Journal*, 44(8), 643–655. doi:10.1093/eurheartj/ehac759

Heart has a recognized endocrine function as it produces several biologically active substances with hormonal properties. Among these hormones, the natriuretic peptide (NP) system has been extensively characterized and represents a prominent expression of the endocrine function of the heart. Over the years, knowledge about the mechanisms governing their synthesis, secretion, processing, and receptors interaction of NPs has been intensively investigated. Their main physiological endocrine and paracrine effects on cardiovascular and renal systems are mostly mediated through guanylate cyclase-A coupled receptors. The potential role of NPs in the pathophysiology of heart failure and particularly their counterbalancing action opposing the overactivation of renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems has been described. In addition, NPs are used today as key biomarkers in cardiovascular diseases with both diagnostic and prognostic significance. On these premises, multiple therapeutic strategies based on the biological properties of NPs have been attempted to develop new cardiovascular therapies. Apart from the introduction of the class of angiotensin receptor/neprilysin inhibitors in the current management of heart failure, novel promising molecules, including M-atrial natriuretic peptide (a novel atrial NP-based compound), have been tested for the treatment of human hypertension. The development of new drugs is currently underway, and we are probably only at the dawn of novel NPs-based therapeutic strategies. The present article also provides an updated overview of the regulation of NPs synthesis and secretion by microRNAs and epigenetics as well as interactions of cardiac hormones with other endocrine systems.

Tamargo J, Kjeldsen KP, Delpón E, Semb AG, Cerbai E, Dobrev D, Savarese G, Sulzgruber P, Rosano G, Borghi C, Wassmann S, Torp-Pedersen CT, Agewall S, Drexel H, Baumgartner I, Lewis B, Ceconi C, Kaski JC, Niessner A.

**Facing the challenge of polypharmacy when prescribing for older people with cardiovascular disease. A review by the European Society of Cardiology Working Group on Cardiovascular Pharmacotherapy.**

*European Heart Journal Cardiovascular Pharmacotherapy*, 8(4), 406–419. doi:10.1093/ehjcvp/pvac005

Population ageing has resulted in an increasing number of older people living with chronic diseases (multimorbidity) requiring five or more medications daily (polypharmacy). Ageing produces important changes in the cardiovascular system and represents the most potent single cardiovascular risk factor. Cardiovascular diseases (CVDs) constitute the greatest burden for older people, their caregivers, and healthcare systems. Cardiovascular pharmacotherapy in older people is complex because age-related changes in body composition, organ function, homeostatic mechanisms, and comorbidities modify the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of many commonly used cardiovascular and non-cardiovascular drugs. Additionally, polypharmacy increases the risk of adverse drug reactions and drug interactions, which in turn can lead to increased morbi-mortality and healthcare costs. Unfortunately, evidence of drug efficacy and safety in older people with multimorbidity and polypharmacy is limited because these individuals are frequently underrepresented/excluded from clinical trials. Moreover, clinical guidelines are largely written with a single-disease focus and only occasionally address the issue of coordination of care, when and how to discontinue treatments, if required, or how to prioritize recommendations for patients with multimorbidity and polypharmacy. This review analyses the main challenges confronting healthcare professionals when prescribing in older people with CVD, multimorbidity, and polypharmacy. Our goal is to provide information that can contribute to improving drug prescribing, efficacy, and safety, as well as drug adherence and clinical outcomes.

Barrea L, Vetrani C, Caprio M, Cataldi M, Ghoch ME, Elce A,

**From the ketogenic diet to the Mediterranean diet: The potential dietary therapy in patients with obesity after COVID-19 infection (post COVID syndrome).**

*Current Obesity Reports*, 11(3), 144–165. doi:10.1007/s13679-022-00475-z



Purpose of review: This review primarily examines the evidence for areas of consensus and on-going uncertainty or controversy about diet and physical exercise approaches for in the post-CoVID. We propose an ideal dietary and physical activity approach that the patient with obesity should follow after CoVID-19 infection in order to reduce the clinical conditions associated with post-CoVID syndrome.

Recent findings: The CoVID-19 disease pandemic, caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus-2, has spread all over the globe, infecting hundreds of millions of individuals and causing millions of death. It is also known to be associated with several medical and psychological complications, especially in patients with obesity and weight-related disorders who in general pose a significant global public health problem, and in specific affected individuals are on a greater risk of developing poorer CoVID-19 clinical outcomes and experience a higher rate of mortality. Little is still known about the best nutritional approach to be adopted in this disease especially in the patients post-CoVID syndrome. To the best of our knowledge, no specific nutritional recommendations exist to manage in the patients post-CoVID syndrome. We report a presentation of nutritional therapeutic approach based on a ketogenic diet protocol followed by a transition to the Mediterranean diet in patients post-infection by CoVID, combined to a physical activity program to address conditions associated with post-CoVID syndrome.

Savarese G, Becher PM, Lund LH, Seferovic P, Rosano GMC, Coats AJS.

**Global burden of heart failure: a comprehensive and updated review of epidemiology.** *Cardiovascular Research*, 118(17), 3272–3287. doi:10.1093/cvr/cvac013

Heart Failure (HF) is a multi-faceted and life-threatening syndrome characterized by significant morbidity and mortality, poor functional capacity and quality of life, and high costs. HF affects more than 64 million people worldwide. Therefore, attempts to decrease its social and economic burden have become a major global public health priority. While the incidence of HF has stabilized and seems to be declining in industrialized countries, the prevalence is increasing due to the ageing of the population, improved treatment of and survival with ischaemic heart disease, and the availability of effective evidence-based therapies prolonging life in patients with HF. There are geographical variations in HF epidemiology. There is substantial lack of data from developing countries, where HF exhibits different features compared with that observed in the Western world. In this review, we provide a contemporary overview on the global burden of HF, providing updated estimates on prevalence, incidence, outcomes, and costs worldwide.

Bayés-Genís, A, Aimo A, Metra M, Anker S, Seferovic P, Rapezzi, C., Castiglione V, J, Emdin M, Rosano G, Coats AJ.

**Head-to-head comparison between recommendations by the ESC and ACC/AHA/HFSA heart failure guidelines.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(6), 916–926. doi:10.1002/ejhf.2542

Recommendations represent the core messages of guidelines, and are particularly important when the body of scientific evidence is rapidly growing, as in the case of heart failure (HF). The main messages from two latest major HF guidelines, endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the American College of Cardiology/American Heart Association/Heart Failure Society of America (ACC/AHA/HFSA), are partially overlapping, starting from the four pillars of treatment for HF with reduced ejection fraction. Some notable differences exist, in part related to the timing of recent publications (most notably, the Universal Definition of HF paper and the EMPEROR-Preserved trial), and in part reflecting differing views of the natural history of HF (with a clear differentiation between stages A and B HF in the ACC/AHA/HFSA guidelines). Different approaches are proposed to specific issues such as risk stratification and implantable cardioverter defibrillator use for primary prevention in HFrEF patients with non-ischaemic aetiology. The ACC/AHA/HFSA guidelines put a greater emphasis on some issues that are particularly relevant to the US setting, such as the cost-effectiveness of therapies and the impact of health disparities on HF care. A comparison between guideline recommendations may give readers a deeper understanding of the ESC and ACC/AHA/HFSA guidelines, and help them apply sensible

approaches to their own practice, wherever that may be in the world. A comparison may possibly also help further harmonization of recommendations between future guidelines, by identifying why some areas have led to conflicting recommendation, even when ostensibly reviewing the same published evidence.

Butler J, Khan MS, Friede T, Jankowska EA, Fabien V, Goehring UM, Dorigotti F, Metra M, Piña IL, Coats AJS, Rosano G, Comin-Colet J, J Van Veldhuisen D, Filippatos JS, Anker SD, Ponikowski P.

**Health status improvement with ferric carboxymaltose in heart failure with reduced ejection fraction and iron deficiency.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(5), 821–832. doi:10.1002/ejhf.2478

Aim: Intravenous ferric carboxymaltose (FCM) has been shown to improve overall quality of life in iron-deficient heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) patients at a trial population level. This FAIR-HF and CONFIRM-HF pooled analysis explored the likelihood of individual improvement or deterioration in Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire (KCCQ) domains with FCM versus placebo and evaluated the stability of this response over time.

Methods and results: Changes versus baseline in KCCQ overall summary score (OSS), clinical summary score (CSS) and total symptom score (TSS) were assessed at weeks 12 and 24 in FCM and placebo groups. Mean between-group differences were estimated and individual responder analyses and analyses of response stability were performed. Overall, 760 (FCM, n = 454) patients were studied. At week 12, the mean improvement in KCCQ OSS was 10.6 points with FCM versus 4.8 points with placebo (least-square mean difference [95% confidence interval, CI] 4.36 [2.14; 6.59] points). A higher proportion of patients on FCM versus placebo experienced a KCCQ OSS improvement of  $\geq 5$  (58.3% vs. 43.5%; odds ratio [95% CI] 1.81 [1.30; 2.51]),  $\geq 10$  (42.4% vs. 29.3%; 1.73 [1.23; 2.43]) or  $\geq 15$  (32.1% vs. 22.6%; 1.46 [1.02; 2.11]) points. Differences were similar at week 24 and for CSS and TSS domains. Of FCM patients with a  $\geq 5$ -,  $\geq 10$ - or  $\geq 15$ -point improvement in KCCQ OSS at week 12, >75% sustained this improvement at week 24.

Conclusion: Treatment of iron-deficient HFrEF patients with intravenous FCM conveyed clinically relevant improvements in health status at an individual-patient level; benefits were sustained over time in most patients.

Seferović PM, Rosano GMC, Vardas P, Milinković I, Polovina M, Timmis A, Coats AJS.

**Heart Failure Association/European Society of Cardiology Atlas second edition: new insights into understanding the burden of heart failure.**

*European Heart Journal*, 43(48), 4973–4975. doi:10.1093/eurheartj/ehac513

Riccardi M, Sammartino AM, Piepoli M, Adamo M, Pagnesi M, Rosano G, Metra M, von Haehling S, Tomasoni D.

**Heart failure: an update from the last years and a look at the near future.**

*ESC Heart Failure*, 9(6), 3667–3693. doi:10.1002/ehf2.14257

In the last years, major progress occurred in heart failure (HF) management. Quadruple therapy is now mandatory for all the patients with HF with reduced ejection fraction. Whilst vercuat is becoming available across several countries, omecamtiv mecarbil is waiting to be released for clinical use. Concurrent use of potassium-lowering agents may counteract hyperkalaemia and facilitate renin-angiotensin-aldosterone system inhibitor implementations. The results of the EMPagliflozin outcome tRial in Patients With chrOnic heaRt Failure With Preserved Ejection Fraction (EMPEROR-Preserved) trial were confirmed by the Dapagliflozin in Heart Failure with Mildly Reduced or Preserved Ejection Fraction (DELIVER) trial, and we now have, for the first time, evidence for treatment of also patients with HF with preserved ejection fraction. In a pre-specified meta-analysis of major randomized controlled trials,

sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors reduced all-cause mortality, cardiovascular (CV) mortality, and HF hospitalization in the patients with HF regardless of left ventricular ejection fraction. Other steps forward have occurred in the treatment of decompensated HF. Acetazolamide in Acute Decompensated Heart Failure with Volume Overload (ADVOR) trial showed that the addition of intravenous acetazolamide to loop diuretics leads to greater decongestion vs. placebo. The addition of hydrochlorothiazide to loop diuretics was evaluated in the CLOROTIC trial. Torasemide did not change outcomes, compared with furosemide, in TRANSFORM-HF. Ferric derisomaltose had an effect on the primary outcome of CV mortality or HF rehospitalizations in IRONMAN (rate ratio 0.82; 95% confidence interval 0.66-1.02; P = 0.070). Further options for the treatment of HF, including device therapies, cardiac contractility modulation, and percutaneous treatment of valvulopathies, are summarized in this article.

Gentile S, Satta E, Strollo F, Guarino G, Romano C, Della Corte T, Alfarone C, Study Group AMD-OSDI on Injection Technique, and Nefrocenter Research & Nyx Start-up. (2021).

**Insulin-induced skin lipohypertrophies: A neglected cause of hypoglycemia in dialysed individuals with diabetes.**

*Diabetes & Metabolic Syndrome, 15(4), 102145. doi:10.1016/j.dsx.2021.05.018*

Background: Diabetes mellitus (DM) is the leading cause of end-stage renal disease and 50% of dialysis patients are insulin-treated.

Aim: to search for unexplained hypoglycemia (HYPO).

Methods: identify a possible cause of HYPO due to altered insulin absorption.

Results: insulin injected into subcutaneous lipo-hypertrophy (LH) nodules leads to unpredictable HYPOS.

Conclusion: looking for LH systematically and training patients to the best injection technique are new challenges for nephrologists to reduce HYPO and emergency hospitalization rates, thus sparing healthcare resources and improving the quality of life of insulin-treated dialysis patients.

Pradhan A, Tiwari A, Caminiti G, Salimei C, Muscoli S, Sethi R, Perrone M. A.

**Ideal P2Y12 inhibitor in acute coronary syndrome: A review and current status.**

*International Journal of Environmental Research and Public Health, 19(15), 8977. doi:10.3390/ijerph19158977*

Dual antiplatelet therapy (DAPT) has remained the cornerstone for management of acute coronary syndrome (ACS) over the years. Clopidogrel has been the quintessential P2Y12 receptor (platelet receptor for Adenosine 5' diphosphate) inhibitor for the past two decades. With the demonstration of unequivocal superior efficacy of prasugrel/ticagrelor over clopidogrel, guidelines now recommend these agents in priority over clopidogrel in current management of ACS. Cangrelor has revived the interest in injectable antiplatelet therapy too. Albeit the increased efficacy of these newer agents comes at the cost of increased bleeding and this becomes more of a concern when combined with aspirin. Which P2Y12i is superior over another has been intensely debated over last few years after the ISAR-REACT 5 study with inconclusive data. Three novel antiplatelet agents are already in the pipeline for ACS with all of them succeeding in phase II studies. The search for an ideal antiplatelet remains a need of the hour for optimal reduction of ischemic events in ACS.

Rosano GMC, Seferovic P, Savarese G, Spoletini I, Lopatin Y, Gustafsson F, Bayes-Genis A, Jaarsma T, Abdelhamid M, Gonzalez Miqueo A, Piepoli M, Tocchetti CG, Ristić AD, Jankowska E, Moura B, Hill L, Filippatos G, Metra M, Milicic D, Thum T, Chioncel O, Ben Gal T, Lund LH, Farmakis D, Mullens V, Adamopoulos S, Bohm M, Norhammar A, Bollmann A, Banerjee A, Maggioni AP, Voors A, Cohen Solal A, Coats AJS.

**Impact analysis of heart failure across European countries: an ESC-HFA position paper.**

*ESC Heart Failure, 9(5), 2767–2778. doi:10.1002/ehf2.14076*

Heart failure (HF) is a long-term clinical syndrome, with increasing prevalence and considerable healthcare costs that are further expected to increase dramatically. Despite significant advances in therapy and prevention, mortality and morbidity remain high and quality of life poor. Epidemiological data, that is, prevalence, incidence, mortality, and morbidity, show geographical variations across the European countries, depending on differences in aetiology, clinical characteristics, and treatment. However, data on the prevalence of the disease are scarce, as are those on quality of life. For these reasons, the ESC-HFA has developed a position paper to comprehensively assess our understanding of the burden of HF in Europe, in order to guide future policies for this syndrome. This manuscript will discuss the available epidemiological data on HF prevalence, outcomes, and human costs-in terms of quality of life-in European countries.

Metra M, Jankowska EA, Pagnesi M, Anker SD, Butler J, Dorigotti F, Fabien V, Filippatos G, Kirwan BA, Macdougall IC, Rosano G, Ruschitzka F, Tomasoni D, van der Meer P, Ponikowski P; AFFIRM-AHF Investigators.

**Impact of ischaemic aetiology on the efficacy of intravenous ferric carboxymaltose in patients with iron deficiency and acute heart failure: insights from the AFFIRM-AHF trial.**

*European Journal of Heart Failure, 24(10), 1928–1939. doi:10.1002/ejhf.2630*

**Aims:** In AFFIRM-AHF, intravenous ferric carboxymaltose (FCM) reduced heart failure (HF) hospitalisations and improved quality of life versus placebo in iron-deficient patients stabilised after an acute HF episode. This analysis explored the effects of FCM versus placebo in patients with ischaemic and non-ischaemic HF aetiology.

**Methods and results:** We included 1082 patients from AFFIRM-AHF: 590 with ischaemic HF (defined as investigator-reported ischaemic HF aetiology and/or prior acute myocardial infarction and/or prior coronary revascularisation) and 492 with non-ischaemic HF. The prevalences of male sex, comorbidities, and history of HF were higher in the ischaemic versus non-ischaemic HF subgroup. Annualised event rates for the primary composite outcome of total HF hospitalisations and cardiovascular death with FCM versus placebo were 65.3 versus 100.6 per 100 patient-years in the ischaemic HF subgroup (rate ratio [RR] 0.65, 95% confidence interval [CI] 0.47-0.89,  $p = 0.007$ ) and 58.3 versus 52.5 in the non-ischaemic HF subgroup (RR 1.11, 95% CI 0.75-1.66,  $p = 0.60$ ) (pinteraction = 0.039). An interaction between HF aetiology and treatment effect was also observed for the secondary outcome of total HF hospitalisations (pinteraction = 0.038). A nominal increase in quality of life, assessed using the 12-item Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire, was observed with FCM versus placebo, within each subgroup.

**Conclusions:** Heart failure hospitalisations and cardiovascular deaths occurred at a higher rate in patients with ischaemic versus those with non-ischaemic HF and were reduced by FCM versus placebo only in ischaemic patients. Further studies are needed to assess the role of aetiology in FCM efficacy.

Rosano GMC, Celant S, Olimpieri PP, Colatrella A, Onder G, Di Lenarda A, Ambrosio G, Reboldi G, Gensini GF, Colivicchi F, Russo P.

**Impact of the COVID-19 pandemic on prescription of sacubitril/valsartan in Italy.**

*European Journal of Heart Failure, 24(5), 855–860. doi:10.1002/ejhf.2490*

**Aims:** The present study sought to examine the effect of the COVID-19 pandemic and lockdown measures on the prescription of sacubitril/valsartan in patients with heart failure (HF) in Italy.

**Methods and results:** Data from Italian Medicines Agency (AIFA) monitoring registries were analysed. The sacubitril/valsartan monitoring registry is based on 6-month prescriptions. A monthly aggregation on new activations throughout the observational period was computed. From March to December 2020, the initiation of new HF patients on sacubitril/valsartan decreased by nearly 40% with prescriptions dropping to values similar to 2018 when the registry was still operated off-line. A slight increase in prescriptions was observed after the lockdown measures were lifted, but prescriptions remained constantly below the pre-lockdown period.

**Conclusion:** A marked and worrisome decline during the COVID-19 pandemic in the activation of a life-saving treatment such as sacubitril/valsartan was observed. This decline was clearly linked to the

lockdown measures instated to counteract the COVID-19 pandemic. Upcoming studies should analyse the occurrence of new cases of HF as well as the severity of patients admitted to hospitals and their mortality compared to pre-pandemic levels.

Lombardo M, Feraco A, Bellia C, Prisco L, D'Ippolito I, Padua E, Storz MA, Lauro D, Caprio M, Bellia A.

**Influence of nutritional status and physical exercise on immune response in metabolic Syndrome.**

*Nutriets. 2022 May 13;14(10):2054. doi: 10.3390/nu14102054.*

Metabolic Syndrome (MetS) is a cluster of metabolic alterations mostly related to visceral adiposity, which in turn promotes glucose intolerance and a chronic systemic inflammatory state, characterized by immune cell infiltration. Such immune system activation increases the risk of severe disease subsequent to viral infections. Strong correlations between elevated body mass index (BMI), type-2-diabetes and increased risk of hospitalization after pandemic influenza H1N1 infection have been described. Similarly, a correlation between elevated blood glucose level and SARS-CoV-2 infection severity and mortality has been described, indicating MetS as an important predictor of clinical outcomes in patients with COVID-19. Adipose secretome, including two of the most abundant and well-studied adipokines, leptin and interleukin-6, is involved in the regulation of energy metabolism and obesity-related low-grade inflammation. Similarly, skeletal muscle hormones-called myokines-released in response to physical exercise affect both metabolic homeostasis and immune system function. Of note, several circulating hormones originate from both adipose tissue and skeletal muscle and display different functions, depending on the metabolic context. This review aims to summarize recent data in the field of exercise immunology, investigating the acute and chronic effects of exercise on myokines release and immune system function.

De Giorgi A, Marra AM, Iacoviello M, Triggiani V, Rengo G, Cacciatore F, Maiello C, Limongelli G, Masarone D, Perticone F, Perrone Filardi P, Paolillo S, Mancini A, Volterrani M, Vriz O, Castello R, Passantino A, Campo M, Modesti PA, Salzano A, D'Assante R, Arcopinto m, Raparelli V, Fabbian F, Sciacqua A, Colao A, Suzuki T, Bossone E, Cittadini A; T.O.S.CA. Investigators

**Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) as predictor of cardiovascular mortality in heart failure patients: data from the T.O.S.CA. registry.**

*Internal and Emergency Medicine, 17(6), 1651–1660. doi:10.1007/s11739-022-02980-4*

**Introduction:** Data from the "Trattamento Ormonale nello Scopenso CARDiaco" (T.O.S.CA) registry showed that heart failure (HF) represents a complex clinical syndrome with different hormonal alterations. Renal failure represents a frequent complication in HF. We evaluated the relationship between renal function and insuline-like growth factor-1 (IGF-1) deficiency and its impact on cardiovascular mortality (CVM) in patients enrolled in the T.O.S.CA. registry.

**Methods:** At the enrolment, all subjects underwent chemistry examinations, including circulating hormones and cardiovascular functional tests. COX regression analysis was used to evaluate factors related to CVM during the follow-up period in all populations, in high-risk patients and in the young-adult population. Also, we evaluate the effects of renal function on the CVM.

**Results:** 337 patients (41 deceased) were analyzed. CVM was related to severe renal dysfunction (HR stages IV-V = 4.86), high-risk conditions (HR 2.25), serum IGF-1 (HR 0.42), and HF etiology (HR 5.85 and HR 1.63 for valvular and ischemic etiology, respectively). In high-risk patients, CVM was related to IGF-1 levels, severe renal dysfunction and valvular etiology, whereas in young patients CMV was related to the high-risk pattern and serum IGF-1 levels.

**Conclusions:** Our study showed the clinical and prognostic utility of the IGF-1 assay in patients with HF.

Mone P, Izzo R, Marazzi G, Manzi M V, Gallo P, Campolongo G, Cacciotti L, Tartaglia D, Caminiti G, Varzideh F, Santulli G, Trimarco V.

**L-arginine enhances the effects of cardiac rehabilitation on physical performance: New insights for managing cardiovascular patients during the COVID-19 pandemic.**

*The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 381(3), 197–203.  
doi:10.1124/jpet.122.001149

Cardiac rehabilitation (CR) following acute myocardial infarction (AMI) improves physical capacities and decreases hospitalizations and cardiovascular mortality. L-arginine is the substrate used by nitric oxide (NO) synthase to generate NO and it has been shown to exert its beneficial effects on endothelium driving vasodilatation, reducing inflammation, and ameliorating physical function. We hypothesized that L-arginine could enhance physical capacities in patients who underwent CR after AMI. We designed a study aimed to assess the effects of L-arginine administration on the physical capacity of patients who underwent coronary revascularization after AMI. The trial was carried out amid the COVID-19 pandemic. Patients were assigned, with a 2:1 ratio, to add to their standard therapy one bottle containing 1.66 g of L-arginine or one bottle of identical aspect apart from not containing L-arginine, twice a day orally for 3 weeks. Patients performed a 6-minute walking test (6MWT), and their Borg modified 0-10 rating of perceived exertion (BRPE) was assessed before starting and at the end of the treatment. Seventy-five patients receiving L-arginine, and 35 receiving placebo successfully completed the study. The 6MWT distance increased significantly in the L-arginine group compared with both baseline and placebo ( $P < 0.0001$ ). Additionally, we observed a significant improvement in the BRPE in patients treated with L-arginine but not in the placebo group. Taken together, our data indicate that L-arginine potentiates the response to CR independently of age, sex, baseline functional capacity, and comorbid conditions. SIGNIFICANCE STATEMENT: This study shows for the first time that oral supplementation of L-arginine potentiates the response to cardiac rehabilitation after myocardial infarction and cardiac revascularization. Indeed, we observed a significant improvement in two fundamental parameters, namely, the 6-minute walking test and the Borg modified 0-10 rating of perceived exertion. Strikingly, the beneficial effects of L-arginine were independent of age, sex, comorbid conditions, and baseline functional capacity.

Heidecker B, Dagan N, Balicer, R., Eriksson, U., Rosano, G., Coats, A., Carsten Tschöpe 7 , Sebastian Kelle 7 , Gregory A Poland 8 , Andrea Frustaci 9 10 , Karin Klingel 11 , Pilar Martin 12 , Joshua M Hare 13 , Leslie T Cooper 14 , Antonis Pantazis 15 , Massimo Imazio 16 , Sanjay Prasad 15 , Thomas F Lüscher 15 17

**Myocarditis following COVID-19 vaccine: incidence, presentation, diagnosis, pathophysiology, therapy, and outcomes put into perspective. A clinical consensus document supported by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (ESC) and the ESC Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(11), 2000–2018. doi:10.1002/ejhf.2669

Over 10 million doses of COVID-19 vaccines based on RNA technology, viral vectors, recombinant protein, and inactivated virus have been administered worldwide. Although generally very safe, post-vaccine myocarditis can result from adaptive humoral and cellular, cardiac-specific inflammation within days and weeks of vaccination. Rates of vaccine-associated myocarditis vary by age and sex with the highest rates in males between 12 and 39 years. The clinical course is generally mild with rare cases of left ventricular dysfunction, heart failure and arrhythmias. Mild cases are likely underdiagnosed as cardiac magnetic resonance imaging (CMR) is not commonly performed even in suspected cases and not at all in asymptomatic and mildly symptomatic patients. Hospitalization of symptomatic patients with electrocardiographic changes and increased plasma troponin levels is considered necessary in the acute phase to monitor for arrhythmias and potential decline in left ventricular function. In addition to evaluation for symptoms, electrocardiographic changes and elevated troponin levels, CMR is the best non-invasive diagnostic tool with endomyocardial biopsy being restricted to severe cases with heart failure and/or arrhythmias. The management beyond guideline-directed treatment of heart failure and arrhythmias includes non-specific measures to control pain. Anti-inflammatory drugs such as non-

steroidal anti-inflammatory drugs, and corticosteroids have been used in more severe cases, with only anecdotal evidence for their effectiveness. In all age groups studied, the overall risks of SARS-CoV-2 infection-related hospitalization and death are hugely greater than the risks from post-vaccine myocarditis. This consensus statement serves as a practical resource for physicians in their clinical practice, to understand, diagnose, and manage affected patients. Furthermore, it is intended to stimulate research in this area.

Armani A, Feraco A, Camajani E, Gorini S, Lombardo M, Caprio M.

**Nutraceuticals in brown adipose tissue activation.**

*Cells (Basel, Switzerland)*, 11(24), 3996. doi:10.3390/cells11243996

Obesity and its associated comorbidities have become pandemic, and challenge the global healthcare system. Lifestyle changes, nutritional interventions and pharmaceuticals should be differently combined in a personalized strategy to tackle such a public health burden. Altered brown adipose tissue (BAT) function contributes to the pathophysiology of obesity and glucose metabolism dysfunctions. BAT thermogenic activity burns glucose and fatty acids to produce heat through uncoupled respiration, and can dissipate the excessive calorie intake, reduce glycemia and circulate fatty acids released from white adipose tissue. Thus, BAT activity is expected to contribute to whole body energy homeostasis and protect against obesity, diabetes and alterations in lipid profile. To date, pharmacological therapies aimed at activating brown fat have failed in clinical trials, due to cardiovascular side effects or scarce efficacy. On the other hand, several studies have identified plant-derived chemical compounds capable of stimulating BAT thermogenesis in animal models, suggesting the translational applications of dietary supplements to fight adipose tissue dysfunctions. This review describes several nutraceuticals with thermogenic properties and provides indications, at a molecular level, of the regulation of the adipocyte thermogenesis by the mentioned phytochemicals.

Rosano GMC, Rodriguez-Martinez MA, Spoletini I, Regidor PA.

**Obesity and contraceptive use: impact on cardiovascular risk.**

*ESC Heart Failure*, 9(6), 3761–3767. doi:10.1002/ehf2.14104

Obesity and oestrogen containing contraceptive products are well-known independent cardiovascular risk factors. However, a significant number of obese women continue to receive prescriptions of hormonal products that contain oestrogens for their contraception. We have conducted a narrative review to discuss the latest evidence, ongoing research, and controversial issues on the synergistic effect of obesity and contraceptive use, in terms of cardiovascular risk. There is compelling evidence of an interplay between obesity and contraception in increasing cardiovascular risk. Women who present both obesity and use of combined oral contraceptives (COCs) have a greater risk (between 12 and 24 times) to develop venous thromboembolism than non-obese non-COC users. Data here discussed offer new insights to increase clinicians' awareness on the cardiovascular risk in the clinical management of obese women. The synergistic effect of obesity and COCs on deep venous thrombosis risk must be considered when prescribing hormonal contraception. Progestin-only products are a safer alternative to COCs in patients with overweight or obesity. Obese women taking contraceptives should be viewed as an 'at risk' population, and as such, they should receive advice to change their lifestyle, avoiding other cardiovascular risk factors, as a form of primary prevention. This indication should be extended to young women, as data show that COCs should be avoided in obese women of any age.

Lindberg F, Lund LH, Benson L, Schrage B, Edner M, Dahlström U, Linde C, Rosano G, Savarese G.

**Patient profile and outcomes associated with follow-up in specialty vs. primary care in heart failure.**

*ESC Heart Failure*, 9(2), 822–833. doi:10.1002/ehf2.13848

**Aims:** Factors influencing follow-up referral decisions and their prognostic implications are poorly investigated in patients with heart failure (HF) with reduced (HFrEF), mildly reduced (HFmrEF), and preserved (HFpEF) ejection fraction (EF). We assessed (i) the proportion of, (ii) independent predictors of, and (iii) outcomes associated with follow-up in specialty vs. primary care across the EF spectrum.

**Methods and results:** We analysed 75 518 patients from the large and nationwide Swedish HF registry between 2000-2018. Multivariable logistic regression models were fitted to identify the independent predictors of planned follow-up in specialty vs. primary care, and multivariable Cox models to assess the association between follow-up type and outcomes. In this nationwide registry, 48 115 (64%) patients were planned for follow-up in specialty and 27 403 (36%) in primary care. The median age was 76 [interquartile range (IQR) 67-83] years and 27 546 (36.5%) patients were female. Key independent predictors of planned follow-up in specialty care included optimized HF care, that is follow-up in a nurse-led HF clinic [odds ratio (OR) 4.60, 95% confidence interval (95% CI) 4.41-4.79], use of HF devices (OR 3.99, 95% CI 3.62-4.40), beta-blockers (OR 1.39, 95% CI 1.32-1.47), renin-angiotensin system/angiotensin-receptor-neprilysin inhibitors (OR 1.21, 95% CI 1.15-1.27), and mineralocorticoid receptor antagonists (OR 1.31, 95% CI 1.26-1.37); and more severe HF, that is higher NT-proBNP (OR 1.13, 95% CI 1.06-1.20) and NYHA class (OR 1.13, 95% CI 1.08-1.19). Factors associated with lower likelihood of follow-up in specialty care included older age (OR 0.29, 95% CI 0.28-0.30), female sex (OR 0.89, 95% CI 0.86-0.93), lower income (OR 0.79, 95% CI 0.76-0.82) and educational level (OR 0.77, 95% CI 0.73-0.81), higher EF [HFmrEF (OR 0.65, 95% CI 0.62-0.68) and HFpEF (OR 0.56, 95% CI 0.53-0.58) vs. HFrEF], and higher comorbidity burden, such as presence of kidney disease (OR 0.91, 95% CI 0.87-0.95), atrial fibrillation (OR 0.85, 95% CI 0.81-0.89), and diabetes mellitus (OR 0.92, 95% CI 0.88-0.96). A planned follow-up in specialty care was independently associated with lower risk of all-cause [hazard ratio (HR) 0.78, 95% CI 0.76-0.80] and cardiovascular death (HR 0.76, 95% CI 0.73-0.78) across the EF spectrum, but not of HF hospitalization (HR 1.06, 95% CI 1.03-1.10).

**Conclusions:** In a large nationwide HF population, referral to specialty care was linked with male sex, younger age, lower EF, lower comorbidity burden, better socioeconomic environment and optimized HF care, and associated with better survival across the EF spectrum. Our findings highlight the need for greater and more equal access to HF specialty care and improved quality of primary care.

Piepoli MF, Adamo M, Barison A, Bestetti RB, Biegus J, Böhm M, Butler J, Carapetis J, Ceconi C, Chioncel O, Coats A, Crespo-Leiro MG, de Simone G, Drexel H, Emdin M, Farmakis D, Halle M, Heymans S, Jaarsma T, Jankowska E, Lainscak M, Lam CSP, Løchen ML, Lopatin Y, Maggioni A, Matrone B, Metra M, Noonan K, Pina I, Prescott E, Rosano G, Seferovic PM, Sliwa K, Stewart S, Uijl A, Vaartjes I, Vermeulen R, Verschuren WM, Volterrani M, Von Haehling S, Hoes A.

**Preventing heart failure: a position paper of the Heart Failure Association in collaboration with the European Association of Preventive Cardiology.**

*European Journal of Preventive Cardiology*, 29(1), 275–300. doi:10.1093/eurjpc/zwab147

The heart failure epidemic is growing and its prevention, in order to reduce associated hospital readmission rates and its clinical and economic burden, is a key issue in modern cardiovascular medicine. The present consensus document aims to provide practical evidence-based information to support the implementation of effective preventive measures. After reviewing the most common risk factors, an overview of the population attributable risks in different continents is presented, to identify potentially effective opportunities for prevention and to inform preventive strategies. Finally, potential interventions that have been proposed and have been shown to be effective in preventing HF are listed.

Piepoli MF, Adamo M, Barison A, Bestetti RB, Biegus J, Böhm M, Butler J, Carapetis J, Ceconi C, Chioncel O, Coats A, Crespo-Leiro MG, de Simone G, Drexel H, Emdin M, Farmakis D, Halle M, Heymans S, Jaarsma T, Jankowska E, Lainscak M, Lam CSP, Løchen ML, Lopatin Y, Maggioni A, Matrone B, Metra M, Noonan K, Pina I, Prescott E, Rosano G, Seferovic PM, Sliwa K, Stewart S, Uijl A, Vaartjes I, Vermeulen R, Verschuren WM, Volterrani M, Von Haehling S, Hoes A.

**Preventing heart failure: a position paper of the Heart Failure Association in collaboration with the European Association of Preventive Cardiology.**



The heart failure epidemic is growing and its prevention, in order to reduce associated hospital readmission rates and its clinical and economic burden, is a key issue in modern cardiovascular medicine. The present position paper aims to provide practical evidence-based information to support the implementation of effective preventive measures. After reviewing the most common risk factors, an overview of the population attributable risks in different continents is presented, to identify potentially effective opportunities for prevention and to inform preventive strategies. Finally, potential interventions that have been proposed and have been shown to be effective in preventing heart failure are listed.

Ruilope L M, Ortiz A, Lucia A, Miranda B, Alvarez-Llamas G, Barderas MG, Volpe M, Ruiz-Hurtado G, Pitt B.

**Prevention of cardiorenal damage: importance of albuminuria.**

*European Heart Journal*, 44(13), 1112–1123. doi:10.1093/eurheartj/ehac683

Chronic kidney disease (CKD) is projected to become a leading global cause of death by 2040, and its early detection is critical for effective and timely management. The current definition of CKD identifies only advanced stages, when kidney injury has already destroyed >50% of functioning kidney mass as reflected by an estimated glomerular filtration rate <60 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> or a urinary albumin/creatinine ratio >six-fold higher than physiological levels (i.e. > 30 mg/g). An elevated urinary albumin-excretion rate is a known early predictor of future cardiovascular events. There is thus a 'blind spot' in the detection of CKD, when kidney injury is present but is undetectable by current diagnostic criteria, and no intervention is made before renal and cardiovascular damage occurs. The present review discusses the CKD 'blind spot' concept and how it may facilitate a holistic approach to CKD and cardiovascular disease prevention and implement the call for albuminuria screening implicit in current guidelines. Cardiorenal risk associated with albuminuria in the high-normal range, novel genetic and biochemical markers of elevated cardiorenal risk, and the role of heart and kidney protective drugs evaluated in recent clinical trials are also discussed. As albuminuria is a major risk factor for cardiovascular and renal disease, starting from levels not yet considered in the definition of CKD, the implementation of opportunistic or systematic albuminuria screening and therapy, possibly complemented with novel early biomarkers, has the potential to improve cardiorenal outcomes and mitigate the dismal 2040 projections for CKD and related cardiovascular burden.

Salzano A, D'Assante R, Iacoviello M, Triggiani V, Rengo G, Cacciatore F, T.O.S.CA. Investigators. (2022).

**Progressive right ventricular dysfunction and exercise impairment in patients with heart failure and diabetes mellitus: insights from the T.O.S.CA. Registry.**

*Cardiovascular Diabetology*, 21(1), 108. doi:10.1186/s12933-022-01543-3

Marcolongo F, Scarlata S, Tomino C, De Dominicis C, Giacconi R, Malavolta M, Bonassi S, Russo P, Prinzi G.

**Psycho-cognitive assessment and quality of life in older adults with chronic obstructive pulmonary disease-carrying the rs4713916 gene polymorphism (G/A) of gene FKBP5 and response to pulmonary rehabilitation: a proof of concept study.**

*Psychiatric Genetics*, 32(3), 116–124. doi:10.1097/YPG.000000000000308

Purpose: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by pulmonary and extra-pulmonary multi-morbidity including depression, anxiety and cognitive disorders. Several studies investigated the association of the FKBP5 gene polymorphisms with susceptibility to anxiety, depression, and behavioral disorders. The FKBP5 gene codifies the FKBP51 protein which modulates the glucocorticoid receptor in the adaptive stress response. Genetic variants of the FKBP5 gene have been associated to a higher risk of developing mental disorders. We analyzed the association of genetic

variants and stress exposure investigating the susceptibility to psychological distress and the impact on cognitive balance and quality of life (QoL) of COPD patients carrying the rs4713916 polymorphism (G/A) and we examined its association, with COPD rehabilitative outcomes.

Materials and methods: A pilot study evaluated cognitive, psychological, clinical alterations/disorders, QoL, and coping strategies in 70 older adults with COPD, undergoing pulmonary rehabilitation, stratified according to the FKBP5 rs4713916 genotype (GG or GA).

Results: Carriers of rs4713916 polymorphisms (G/A) show better cognitive performances, a higher degree of independence in the daily living activities, better QoL, no presence of depressive mood and anxiety symptoms, no family history of psychiatric disorders, more ability to cope with stressors by avoiding emotions but demanding emotional support, and lesser use of anti-anxiety, anti-depressant, anti-psychotic, hypnotic-sedative drugs. No difference was found in the number of comorbidities.

Conclusion: These results offer valuable insights into the role of FKBP5 in the complex network of mechanisms associated to clinical, psychological and behavioral features of COPD patients.

Anker SD, Ponikowski P, Khan MS, Friede T, Jankowska EA, Fabien V, Goehring UM, Metra M, Piña IL, Coats AJS, Rosano G, Dorigotti F, Comin-Colet J, Van Veldhuisen DJ, Filippatos GS, Butler J.

**Responder analysis for improvement in 6-min walk test with ferric carboxymaltose in patients with heart failure with reduced ejection fraction and iron deficiency.**

*European Journal of Heart Failure, 24(5), 833–842. doi:10.1002/ejhf.2491*

Aim: Improving functional capacity is a key goal in heart failure (HF). This pooled analysis of FAIR-HF and CONFIRM-HF assessed the likelihood of improvement or deterioration in 6-min walk test (6MWT) among iron-deficient patients with chronic HF with reduced ejection fraction (HFrEF) receiving ferric carboxymaltose (FCM).

Methods and results: Data for 760 patients (FCM: n = 454; placebo: n = 306) were analysed. The proportions of patients receiving FCM or placebo who had  $\geq 20$ ,  $\geq 30$ , and  $\geq 40$  m improvements or  $\geq 10$  m deterioration in 6MWT at 12 and 24 weeks were assessed. Patients receiving FCM experienced a mean (standard deviation) 31.1 (62.3) m improvement in 6MWT versus 0.1 (77.1) m improvement for placebo at week 12 (difference in mean changes 26.8 [16.6-37.0]). At week 12, the odds [95% confidence interval] of 6MWT improvements of  $\geq 20$  m (odds ratio 2.16 [1.57-2.96];  $p < 0.0001$ ),  $\geq 30$  m (2.00 [1.44-2.78];  $p < 0.0001$ ), and  $\geq 40$  m (2.29 [1.60-3.27];  $p < 0.0001$ ) were greater with FCM versus placebo, while the odds of a deterioration  $\geq 10$  m were reduced with FCM versus placebo (0.55 [0.38-0.80];  $p = 0.0019$ ). Among patients who experienced 6MWT improvements of  $\geq 20$ ,  $\geq 30$ , or  $\geq 40$  m with FCM at week 12, more than 80% sustained this improvement at week 24.

Conclusion: Ferric carboxymaltose resulted in a significantly higher likelihood of improvement and a reduced likelihood of deterioration in 6MWT versus placebo among iron-deficient patients with HF. Of the patients experiencing clinically significant improvements at week 12, the majority sustained this improvement at week 24. These results are supportive of FCM to improve exercise capacity in HF.

Casasco, M., Iellamo, F., Scorcu, M., Parisi, A., Tavcar, I., Brugin, E., Martini B, Fossati C, Pigozzi F.

**Return to play after SARS-CoV-2 infection in competitive athletes of distinct sport disciplines in Italy: A FMSI (Italian Federation of Sports Medicine) study.**

*Journal of Cardiovascular Development and Disease, 9(2), 59. doi:10.3390/jcdd9020059*

Background: SARS-CoV-2 can lead to several systemic complications, including myocardial injuries; these might be worsened by heavy physical activity. The optimal approach to cardiac risk stratification following SARS-CoV-2 infection in athletes for a safe return to play (RTP) still needs defining. The aim of this study was to assess the prevalence of abnormal RTP test results, according to the protocol of Italian Federation of Sport Medicine (FMSI), which was endorsed by the Italian Ministry of Health, potentially representing COVID-19-associated cardiac injuries.

**Methods:** This was a prospective, multicenter, observational study. All consecutive competitive athletes who underwent COVID-19 RTP testing protocol from 1 May to 31 July 2021, across 60 Italian Centers of Sports Medicine, were enrolled in the study. Athletes were tested at least 30 days after negativization of the nasopharyngeal swab (or immediately after negativization in professional athletes or Probable Olympians). A 12-lead electrocardiography at rest and during maximal incremental exercise test with continuous O<sub>2</sub> saturation monitoring and an echocardiographic examination were part of the protocol. In athletes with "moderate" disease (NHI classification), 24 h ECG monitoring (to be performed on a training day) and Magnetic Resonance Imaging (MRI) were also performed.

**Results:** A total of 4143 athletes (67.8% males and 32.2% females) (53% > 18 years, 20% 18-35 years and 16% > 35 years), from more than 40 different sport disciplines, were included in the study. The mean age was 22.5 ± 13.3 years, with ages ranging from 8 to 80 years. Of these athletes, 52.3% were asymptomatic, 46.4% manifested mild symptoms, 1.1% and 0.14% had moderate or severe symptoms, respectively, while critical illness was evident in one athlete. Abnormal echocardiographic findings were detected in 80 cases (1.9%), and pericarditis in 7 cases (0.2%); all were from mildly symptomatic athletes. Arrhythmic events were recorded in 239 athletes, with 224 (5.4%) in the exercise test and 15 (0.4%) during 24 h ECG monitoring. Ventricular arrhythmias were observed in 101 (2.4%) athletes from the total population (mostly isolated or couples of premature ventricular beats): 91 in the exercise test and 10 during 24 h ECG monitoring. Cardiac magnetic resonance was performed in 34 athletes; the presence of myocarditis was confirmed in 5 athletes (0.12% of the total population, 14.7% of athletes in which MRI was performed).

**Conclusions:** According to our results, cardiac complications from SARS-CoV-2 in asymptomatic or mildly symptomatic competitive athletes are rare, and an RTP assessment based on symptoms and ECG-monitored exercise test would ensure a safe RTP in these athletes.

Rosano GMC, Vitale C, Adamo M, Metra M.

**Roadmap for the management of heart failure patients during the vulnerable phase after heart failure hospitalizations: how to implement excellence in clinical practice.**

*Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown, Md.), 23(3), 149–156. doi:10.2459/JCM.0000000000001221*

Patients discharged after an episode of acute heart failure have an increased risk of hospitalizations and deaths within the subsequent 3 months. This phase is commonly called the 'vulnerable period' and it represents a window of opportunity of intervention in order to improve longer term outcomes. Prompt identification of signs of residual haemodynamic congestion is a priority in planning for the out-of-hospital management strategies. Patients will also need to be screened for frailty and have a prioritization of the management of their comorbidities. Life-saving medications should be started together or in a short time and up-titrated (when needed) according to blood pressure, heart rate and concomitant comorbidities. Ideally, patients should be assessed by their general practitioner within 1 week of discharge and have a hospital/clinic follow-up within 4 weeks of discharge. Patients should progressively resume physical activities and adhere to an educational programme with appropriate lifestyle adjustments best implemented during a cardiac rehabilitation programme.

Fauvel C, Bonnet G, Mullens W, Giraldo CIS, Mežnar AZ, Barasa A, Mewton N, Tokmakova M, Shchendrygina A, Moscoso Costa F, Mapelli M, Zemrak F, Tops LF, Jakus L, Sultan A, Bahouth F, Hadjseyd CE, Salvat M, Anselmino M, Messroghli D, Weberndörfer V, Giverts I, Bochaton T, Courand PY, Berthelot E, Legallois D, Beauvais F, Bauer F, Lamblin N, Damy T, Girerd N, Sebbag L, Pezel T, Cohen-Solal A, Rosano G, Roubille F, Mewton N.

**Sequencing and titrating approach of therapy in heart failure with reduced ejection fraction following the 2021 European Society of Cardiology guidelines: an international cardiology survey.**

*European Journal of Heart Failure, 25(2), 213–222. doi:10.1002/ejhf.2743*

**Aims:** In symptomatic patients with heart failure and reduced ejection fraction (HFrEF), recent international guidelines recommend initiating four major therapeutic classes rather than sequential initiation. It remains unclear how this change in guidelines is perceived by practicing cardiologists versus heart failure (HF) specialists.

**Methods and results:** An independent academic web-based survey was designed by a group of HF specialists and posted by email and through various social networks to a broad community of cardiologists worldwide 1 year after the publication of the latest European HF guidelines. Overall, 615 cardiologists (38 [32-47] years old, 63% male) completed the survey, of which 58% were working in a university hospital and 26% were HF specialists. The threshold to define HFrEF was  $\leq 40\%$  for 61% of the physicians. Preferred drug prescription for the sequential approach was angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor-neprilysin inhibitors first (74%), beta-blockers second (55%), mineralocorticoid receptor antagonists third (52%), and sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors (53%) fourth. Eighty-four percent of participants felt that starting all four classes was feasible within the initial hospitalization, and 58% felt that titration is less important than introducing a new class. Age, status in training, and specialization in HF field were the principal characteristics that significantly impacted the answers.

**Conclusion:** In a broad international cardiology community, the 'historical approach' to HFrEF therapies remains the preferred sequencing approach. However, accelerated introduction and uptitration are also major treatment goals. Strategy trials in treatment guidance are needed to further change practices.

Vukadinović D, Abdin A, Anker SD, Rosano GMC, Mahfoud F, Packer M, Butler J, Böhm M.

**Side effects and treatment initiation barriers of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in heart failure: a systematic review and meta-analysis.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(9), 1625–1632. doi:10.1002/ejhf.2584

**Aims:** Physicians are sometimes reluctant to initiate guideline-directed therapy in patients with heart failure and reduced ejection fraction (HFrEF) due to concerns of adverse events. We explored the risk of hypotension, volume depletion, and acute kidney injury (AKI) on sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitors in HFrEF populations.

**Methods and results:** We determined summary risk ratios (RRs) by conducting a meta-analysis on reported aforementioned adverse events on SGLT2 inhibitors from randomized controlled trials. We explored robustness of meta-analyses by computing fragility and/or reverse fragility index (FI or RFI) and its corresponding fragility quotient (FQ or RFQ) for each outcome. A total of 10 050 patients with HFrEF entered the final meta-analysis. Hypotension was reported in 4.5% (219/4836) on SGLT2 inhibitors and in 4.1% (202/4846) on placebo (RR 1.09, 95% confidence interval [CI] 0.91-1.31,  $p = 0.36$ ). An RFI of 21 and RFQ of 0.002 suggest robust findings for hypotension. Volume depletion occurred in 9.4% (473/5019) on SGLT2 inhibitors and in 8.7% (438/5031) on placebo (RR 1.07, 95% CI 0.95-1.21,  $p = 0.25$ ), respectively. RFI of 19 and RFQ of 0.001 suggest moderately robust findings for volume depletion. AKI was reported in fewer patients (1.9% [95/4888]) on SGLT2 inhibitors than on placebo (2.8% [140/4899]) providing lower incidence of AKI (RR 0.69, 95% CI 0.51-0.93,  $p = 0.02$ ). FI of 14 and RFQ of 0.001 suggest moderately robust findings for AKI.

**Conclusion:** Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor therapy is not associated with a clinically relevant risk of hypotension and volume depletion. Its use reduces the risk of AKI. This analysis supports current guideline recommendations on early use of SGLT2 inhibitors.

Tomasoni D, Fonarow GC, Adamo M, Anker SD, Butler J, Coats AJS, Filippatos G, Greene SJ, McDonagh TA, Ponikowski P, Rosano G, Seferovic P, Vaduganathan P, Voors AA, Metra M.

**Sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors as an early, first-line therapy in patients with heart failure and reduced ejection fraction.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(3), 431–441. doi:10.1002/ejhf.2397

Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT2) inhibitors have recently been recommended as a foundational therapy for patients with heart failure (HF) and reduced ejection fraction (HFrEF) because of their

favourable effects on mortality, clinical events and quality of life. While clinical practice guidelines have recommended dapagliflozin or empagliflozin in all patients with HFrEF, or sotagliflozin in those with HFrEF and concomitant diabetes, the timing and practical integration of these drugs in clinical practice is less well defined. We propose that these drugs are candidates for early, upfront administration to patients with newly diagnosed HFrEF and for patients hospitalized with HF. Growing evidence has established early benefits, with clinically meaningful reductions in clinical events that reach statistical significance within days to weeks, following dapagliflozin, empagliflozin or, in diabetic patients, sotagliflozin initiation. Secondly, although major clinical trials have tested these drugs in patients already receiving background HF therapy, secondary analyses showed that their efficacy is independent of that. Third, SGLT2 inhibitors are generally safe and well tolerated, with clinical trial data reporting minimal effects on blood pressure, glycaemia-related adverse events, and no excess in acute kidney injury. Rather, they exert renal protective effects and reduce risk of hyperkalaemia, properties that favour initiation, tolerance and persistence of renin-angiotensin system inhibitors and mineralocorticoid receptor antagonists. This review supports the early initiation of dapagliflozin and empagliflozin (or sotagliflozin limited to patients with diabetes) to rapidly improve clinical outcome and quality of life of HFrEF patients.

Butler J, Usman MS, Anstrom KJ, Blaustein RO, Bonaca MP, Ezekowitz JA, Freitas C, Lam CSP, Lewis EF, Lindenfeld J, McMullan CJ, Mentz RJ, O'Connor C, Rosano GMC, Saldarriaga CI, Senni M, Udelson J, Voors AA, Zannad F.

**Soluble guanylate cyclase stimulators in patients with heart failure with reduced ejection fraction across the risk spectrum.**

*European Journal of Heart Failure*, 24(11), 2029–2036. doi:10.1002/ejhf.2720

Patients with heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) have a high residual risk of adverse outcomes, even when treated with optimal guideline-directed medical therapy and in a clinically stable state. Soluble guanylate cyclase (sGC) stimulators have the potential to lower this risk by modifying the nitric oxide-sGC-cyclic guanosine monophosphate cascade - a pathophysiological pathway that has been targeted with limited success in HFrEF previously. Vericiguat, an sGC stimulator, was shown to improve outcomes in patients with HFrEF in the VICTORIA (Vericiguat Global Study in Subjects with Heart Failure with Reduced Ejection Fraction) trial. However, this trial included patients with recently worsening disease. In this brief review, we discuss the rationale of evaluating sGC stimulators in lower-risk HFrEF patients. First, all key HFrEF medications have been evaluated in both higher- and lower-risk populations, and the treatment effect is not always consistent across the risk spectrum. Second, pre-clinical studies and post-hoc studies of the VICTORIA trial have suggested that sGC stimulators may have cardioprotective effects - these effects may be more apparent when the medication is initiated earlier in the disease process. Third, the effect of vericiguat on cardiovascular mortality remains uncertain and a trial with a longer follow-up in a lower-risk population may allow better assessment of its effect on cardiovascular mortality. Therefore, there is a pertinent need to investigate the effects of vericiguat in optimally treated, low-risk HFrEF patients (i.e. those without recently worsening heart failure).

Strollo F, Gentile S, Pipicelli AMV, Mambro A, Monici M, Magni P.

**Space flight-promoted insulin resistance as a possible disruptor of wound healing.**

*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 868999. doi:10.3389/fbioe.2022.868999

During space flight, especially when prolonged, exposure to microgravity results in a number of pathophysiological changes such as bone loss, muscle atrophy, cardiovascular and metabolic changes and impaired wound healing, among others. Interestingly, chronic low-grade inflammation and insulin resistance appear to be pivotal events linking many of them. Interestingly, real and experimental microgravity is also associated to altered wound repair, a process that is becoming increasingly important in view of prolonged space flights. The association of insulin resistance and wound healing impairment may be hypothesized from some dysmetabolic conditions, like the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus and abdominal/visceral obesity, where derangement of glucose and lipid

metabolism, greater low-grade inflammation, altered adipokine secretion and adipocyte dysfunction converge to produce systemic effects that also negatively involve wound healing. Indeed, wound healing impairment after traumatic events and surgery in space remains a relevant concern for space agencies. Further studies are required to clarify the molecular connection between insulin resistance and wound healing during space flight, addressing the ability of physical, endocrine/metabolic, and pharmacological countermeasures, as well as nutritional strategies to prevent long-term detrimental effects on tissue repair linked to insulin resistance. Based on these considerations, this paper discusses the pathophysiological links between microgravity-associated insulin resistance and impaired wound healing.

Seferović PM, Polovina M, Seferović J, Rosano G.

**Strength in synergy: Cardiometabolic effects of sacubitril/valsartan in heart failure and diabetes.**

*International Journal of Cardiology*, 371, 293–294. doi:10.1016/j.ijcard.2022.09.019

Marra AM, D'Assante R, Salzano A, Iacoviello M, Triggiani V, Rengo G, Limongelli G, Masarone D, Perticone M, Cimellaro A, Perrone Filardi P, Paolillo S, Gargiulo P, Mancini A, Volterrani M, Vriz O, Castello R, Passantino A, Campo M, Modesti PA, De Giorgi A, Arcopinto M, D'Agostino A, Raparelli V, Isidori AM, Valente V, Giardino F, Crisci G, Sciacqua A, Savoia M, Suzuki T, Bossone E, Cittadini A, T.O.S.CA. Investigators

**Testosterone deficiency independently predicts mortality in women with HF<sub>r</sub>EF: insights from the T.O.S.CA. registry.**

*ESC Heart Failure*, 10(1), 159–166. doi:10.1002/ehf2.14117

**Aims:** Testosterone deficiency (TD) is associated with increased morbidity and mortality in heart failure with reduced ejection fraction (HF<sub>r</sub>EF). However, data in women are scanty. The aim of this study was to investigate the prognostic impact of TD on women with HF<sub>r</sub>EF.

**Methods:** Among 480 patients prospectively enrolled in the T.O.S.CA. (Terapia Ormonale Scopenso Cardiaco) registry, a prospective, multicentre, nationwide, observational study, 94 women were included in the current analysis. The TD was defined as serum testosterone levels lower than 25 ng/dl. Data regarding clinical status, echocardiography, exercise performance, cardiovascular hospitalization, and survival after an average follow-up of 36 months were analysed.

**Results:** Thirty patients (31.9%) displayed TD. TD was associated with lower tricuspid annular plane excursion (TAPSE) to pulmonary arterial systolic pressure PASP ratio (TAPSE/PASP) (P = 0.008), peak oxygen consumption (VO<sub>2</sub> peak) (P = 0.03) and estimated glomerular filtration rate (P < 0.001). TD was an independent predictor of the combined endpoint of all-cause mortality/cardiovascular hospitalization (HR: 10.45; 95% CI: 3.54-17.01; P = 0.001), all-cause mortality (HR: 8.33; 95%: 5.36-15.11; P = 0.039), and cardiovascular hospitalization (HR: 2.41; 95% CI: 1.13-4.50; P = 0.02).

**Conclusions:** One-third of women with HF<sub>r</sub>EF displays TD that impacts remarkably on their morbidity and mortality. TD is associated with a worse clinical profile including exercise capacity, right ventricular-pulmonary arterial coupling, and renal function. These findings lend support to an accurate profiling of women with HF, a problem often overlooked in clinical trials.

Maiuolo J, Carresi C, Gliozzi M, Mollace R, Scarano F, Scicchitano M, Macrì R, Nucera S, Bosco F, Oppedisano F, Ruga S, Coppoletta AR, Guarnieri L, Cardamone A, Bava I, Musolino V, Paone S, Palma E, Mollace V. **The contribution of gut Microbiota and endothelial dysfunction in the development of arterial hypertension in animal models and in humans.**

*International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3698. doi:10.3390/ijms23073698

The maintenance of the physiological values of blood pressure is closely related to unchangeable factors (genetic predisposition or pathological alterations) but also to modifiable factors (dietary fat and salt, sedentary lifestyle, overweight, inappropriate combinations of drugs, alcohol abuse, smoking and use of

psychogenic substances). Hypertension is usually characterized by the presence of a chronic increase in systemic blood pressure above the threshold value and is an important risk factor for cardiovascular disease, including myocardial infarction, stroke, micro- and macro-vascular diseases. Hypertension is closely related to functional changes in the endothelium, such as an altered production of vasoconstrictive and vasodilator substances, which lead to an increase in vascular resistance. These alterations make the endothelial tissue unresponsive to autocrine and paracrine stimuli, initially determining an adaptive response, which over time lead to an increase in risk or disease. The gut microbiota is composed of a highly diverse bacterial population of approximately 10<sup>14</sup> bacteria. A balanced intestinal microbiota preserves the digestive and absorbent functions of the intestine, protecting from pathogens and toxic metabolites in the circulation and reducing the onset of various diseases. The gut microbiota has been shown to produce unique metabolites potentially important in the generation of hypertension and endothelial dysfunction. This review highlights the close connection between hypertension, endothelial dysfunction and gut microbiota.

Gentile S, Guarino G, Della Corte T, Marino G, Satta E, Pasquarella M, Romano C, Alfrone C, Giordano L, Loiacono F, Capece M, Lamberti M, Strollo F; Nefrocenter and Nyx Start-up, AMDOSDI Study Group on Injection Techniques, and ANIAD

**The economic burden of insulin injection-induced lipohypertrophy. Role of education: The ISTERP-3 study.**

*Advances in Therapy*, 39(5), 2192–2207. doi:10.1007/s12325-022-02105-5

**Introduction:** The history of insulin-induced skin lipohypertrophy (LH) runs parallel to that of insulin's 100 years, and an average of 47% of insulin-treated patients still suffer from it today. The metabolic and economic effects of LH are significant, with hypoglycemia being the most striking. The objective of the study was to perform a 52-week follow-up of 713 insulin-treated patients with type 2 diabetes (T2DM) and LH to detect any differences in the occurrence of hypoglycemic events (HYPOs) and related healthcare costs as well as in LH rates and injection habits between an intensive education intervention group (IG) and control group (CG) provided with a single educational session at the starting point.

**Methods:** All participants were trained in accurately self-monitoring blood glucose and recording all HYPOs for 6 months, which allowed baseline recordings before they were randomized into the IG, comprising 395 insulin-treated subjects undergoing repeated, structured multimodal education on correct injection techniques as a longstanding behavioral rehabilitation strategy, and the CG, comprising 318 subjects receiving the same structured, multimodal educational session, but only initially.

**Results:** Changes in LH rate and size and in performance were large in the IG and only slight and transient in the CG. A striking difference in the rate of decrease of HYPOs was also apparent between groups. Indeed, estimated costs of health interventions for severe and symptomatic HYPOs, which were on the order of €70,000 and €9300, respectively, in the two groups at baseline decreased by 5.9 times and 13.7 times, respectively, at the end of follow-up in the IG and by only approximately half in the CG. Full details of the changes occurring as a result of intensive education are provided in the text.

**Conclusions:** The effect of only initial education in the CG was not significant, thus providing evidence of the virtual worthlessness of a single training session on injection techniques, typical of worldwide daily clinical practice, and easily explaining the extremely high prevalence of LH in insulin-treated patients. Conversely, highly positive effects on LH prevalence and size as well as costs expected from decreased HYPO rate were obtained in the IG. To our knowledge, ours is the first 18-month randomized trial in the field. If our experimental model were to be used as an effective, longstanding behavioral rehabilitation strategy and therefore adapted to real-world settings universally, LH prevalence and costs related to their clinical consequences would be drastically reduced. However, only with a strong, relentless commitment of universities, scientific societies, and patient associations can we achieve this ambitious goal, which would provide great institutional savings and improved quality of life for people with diabetes.

Lombardo M, Feraco A, Ottaviani M, Rizzo G, Camajani E, Caprio M, & Armani A.

## **The efficacy of vitamin D supplementation in the treatment of fibromyalgia syndrome and chronic musculoskeletal pain.**

*Nutrients*, 14(15), 3010. doi:10.3390/nu14153010

Fibromyalgia syndrome (FMS) and chronic widespread musculoskeletal pain (CMP) are diffuse suffering syndromes that interfere with normal activities. Controversy exists over the role of vitamin D in the treatment of these diseases. We carried out a systematic literature review of randomized controlled trials (RCT) to establish whether vitamin D (25OHD) deficiency is more prevalent in CMP patients and to assess the effects of vitamin D supplementation in pain management in these individuals. We searched PubMed, Physiotherapy Evidence Database (PEDro), and the Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL) for RCTs published in English from 1 January 1990 to 10 July 2022. A total of 434 studies were accessed, of which 14 satisfied the eligibility criteria. In our review three studies, of which two had the best-quality evidence, a correlation between diffuse muscle pain and 25OHD deficiency was confirmed. Six studies, of which four had the best-quality evidence, demonstrated that appropriate supplementation may have beneficial effects in patients with established blood 25OHD deficiency. Eight studies, of which six had the best-quality evidence, demonstrated that 25OHD supplementation results in pain reduction. Our results suggest a possible role of vitamin D supplementation in alleviating the pain associated with FMS and CMP, especially in vitamin D-deficient individuals.

Voors AA, Angermann CE, Teerlink JR, Collins SP, Kosiborod M, Biegus J, Ferreira JP, Nassif ME, Psotka MA, Tromp J, Borleffs CJW, Ma C, Comin-Colet J, Fu M, Janssens SP, Kiss RG, Mentz RJ, Sakata Y, Schirmer H, Schou M, Schulze PC, Spinarova L, Volterrani M, Wranicz JK, Zeymer U, Zieroth S, Brueckmann M, Blatchford JP, Salsali A, Ponikowski P.

## **The SGLT2 inhibitor empagliflozin in patients hospitalized for acute heart failure: a multinational randomized trial.**

*Nature Medicine*, 28(3), 568–574. doi:10.1038/s41591-021-01659-1

The sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor empagliflozin reduces the risk of cardiovascular death or heart failure hospitalization in patients with chronic heart failure, but whether empagliflozin also improves clinical outcomes when initiated in patients who are hospitalized for acute heart failure is unknown. In this double-blind trial (EMPULSE; NCT04157751), 530 patients with a primary diagnosis of acute de novo or decompensated chronic heart failure regardless of left ventricular ejection fraction were randomly assigned to receive empagliflozin 10 mg once daily or placebo. Patients were randomized in-hospital when clinically stable (median time from hospital admission to randomization, 3 days) and were treated for up to 90 days. The primary outcome of the trial was clinical benefit, defined as a hierarchical composite of death from any cause, number of heart failure events and time to first heart failure event, or a 5 point or greater difference in change from baseline in the Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire Total Symptom Score at 90 days, as assessed using a win ratio. More patients treated with empagliflozin had clinical benefit compared with placebo (stratified win ratio, 1.36; 95% confidence interval, 1.09-1.68;  $P = 0.0054$ ), meeting the primary endpoint. Clinical benefit was observed for both acute de novo and decompensated chronic heart failure and was observed regardless of ejection fraction or the presence or absence of diabetes. Empagliflozin was well tolerated; serious adverse events were reported in 32.3% and 43.6% of the empagliflozin- and placebo-treated patients, respectively. These findings indicate that initiation of empagliflozin in patients hospitalized for acute heart failure is well tolerated and results in significant clinical benefit in the 90 days after starting treatment.

Cowie MR, Mourilhe-Rocha R, Chang HY, Volterrani M, Ban HN, Campos de Albuquerque D, Chung E, Fonseca C, Lopatin Y, Magaña Serrano JA, Mircheva L, Moncada-Paz GA, Pagava Z, Reyes EB, Saldarriaga C, Schwartzmann P, Sim Kheng Leng D, Trivi M, Yotov YT, Zieroth S; OPTIMIZE Heart Failure Care program coordinators. **The impact of the COVID-19 pandemic on heart failure management: Global experience of the OPTIMIZE Heart Failure Care network.**



During the COVID-19 pandemic, reductions in heart failure (HF) hospitalizations have been widely reported, and there is an urgent need to understand how HF care has been reorganized in countries with different infection levels, vaccination rates and healthcare services. The OPTIMIZE Heart Failure Care program has a global network of investigators in 42 countries, with first-hand experience of the impact of the pandemic on HF management in different care settings. The national coordinators were surveyed to assess: 1) the challenges of the COVID-19 pandemic for continuity of HF care, from both a hospital and patient perspective; 2) the organizational changes enacted to ensure continued HF care; and 3) lessons learned for the future of HF care. Contributions were obtained from 37 national coordinators in 29 countries. We summarize their input, highlighting the issues raised and using the example of three very different settings (Italy, Brazil, and Taiwan) to illustrate the similarities and differences across the OPTIMIZE program.

Rizzo G, Feraco A, Storz MA, Lombardo M.

**The role of soy and soy isoflavones on women's fertility and related outcomes: an update.**  
*Journal of Nutritional Science*, 11(e17), e17. doi:10.1017/jns.2022.15

Rosano GMC, Metra M, Volterrani M.

**The strategic vision of the 2022-2024 mandate - greater involvement of members, young specialists for an HFA community without borders.**  
*European Journal of Heart Failure*, 24(9), 1458–1459. doi:10.1002/ejhf.2702

Lindberg, F., Lund, L. H., Benson, L., Dahlström, U., Karlström, P., Linde, C., ... Savarese, G.

**Trajectories in New York Heart Association functional class in heart failure across the ejection fraction spectrum: data from the Swedish Heart Failure Registry.**  
*European Journal of Heart Failure*, 24(11), 2093–2104. doi:10.1002/ejhf.2644

**Aims:** To investigate incidence, predictors and prognostic implications of longitudinal New York Heart Association (NYHA) class changes (i.e. improving or worsening vs. stable NYHA class) in heart failure (HF) across the ejection fraction (EF) spectrum.

**Methods and results:** From the Swedish HF Registry, 13 535 patients with EF and  $\geq 2$  NYHA class assessments were considered. Multivariable multinomial regressions were fitted to identify the independent predictors of NYHA change. Over a 1-year follow-up, 69% of patients had stable, 17% improved, and 14% worsened NYHA class. Follow-up in specialty care predicted improving NYHA class, whereas an in-hospital patient registration, lower EF, renal disease, lower mean arterial pressure, older age, and longer HF duration predicted worsening. The association between NYHA change and subsequent outcomes was assessed with multivariable Cox models. When adjusting for the NYHA class at baseline, improving NYHA class was independently associated with lower while worsening with higher risk of all-cause and cardiovascular mortality, and first HF hospitalization. After adjustment for the NYHA class at follow-up, NYHA class change did not predict morbidity/mortality. NYHA class assessment at baseline and follow-up predicted morbidity/mortality on top of the changes. Results were consistent across the EF spectrum.

**Conclusion:** In a large real-world HF population, NYHA class trajectories predicted morbidity/mortality after extensive adjustments. However, the prognostic role was entirely explained by the resulting NYHA class, i.e. the follow-up value. Our results highlight that considering one-time NYHA class assessment, rather than trajectories, might be the preferable approach in clinical practice and for clinical trial design.

Camajani E, Feraco A, Basciani S, Gnessi L, Barrea L, Armani A, Caprio M.

**VLCKD in combination with physical exercise preserves skeletal muscle mass in sarcopenic obesity after severe COVID-19 disease: A case report.**  
*Healthcare (Basel, Switzerland)*, 10(3), 573. doi:10.3390/healthcare10030573

The prevalence of sarcopenic obesity is increasing worldwide, with a strong impact on public health and the national health care system. Sarcopenic obesity consists of fat depot expansion and associated systemic low-grade inflammation, exacerbating the decline in skeletal muscle mass and strength. Dietary approach and physical exercise represent essential tools for reducing body weight and preserving muscle mass and function in subjects with sarcopenic obesity. This case report describes the effects of a dietary intervention, based on a Very-Low-Calorie Ketogenic Diet (VLCKD) combined with physical exercise, on body composition, cardiometabolic risk factors, and muscle strength in a woman with sarcopenic obesity, two weeks after hospitalization for bilateral interstitial pneumonia due to COVID-19. To our knowledge, this is the first case report to describe the efficacy of a combined approach intervention including VLCKD along with physical exercise, in reducing fat mass, improving metabolic profile, and preserving skeletal muscle performance in a patient with obesity, soon after severe COVID-19 disease.

Camajani E, Feraco A, Proietti S, Basciani S, Barrea L, Armani A, Lombardo M, Gnessi L, Caprio M.

**Corrigendum: Very low calorie ketogenic diet combined with physical interval training for preserving muscle mass during weight loss in sarcopenic obesity: A pilot study.**

*Frontiers in Nutrition*, 9, 1076667. doi:10.3389/fnut.2022.1076667

Camajani E, Persichetti A, Watanabe M, Contini S, Vari M, Di Bernardo S, Faro M, Carla Lubrano C, Gnessi L, Caprio M, Basciani S.

**Whey protein, L-leucine and vitamin D supplementation for preserving lean mass during a low-calorie diet in sarcopenic obese women.**

*Nutrients*, 14(9), 1884. doi:10.3390/nu14091884

In sarcopenic obese subjects it is essential to reduce body weight and preserve lean mass, in order to avoid a worsening of muscle function. Several studies have shown that leucine supplementation can be useful to improve skeletal muscle mass in sarcopenic patients. The aim of our study was to evaluate the effectiveness of a short-term low-calorie diet (LCD) combined with supplementation with whey protein and leucine on weight loss, lean mass and muscle strength in sarcopenic, obese, hyperinsulinemic and post-menopausal women. Sixteen females with a mean age of 60 years (range: 50-70 years), BMI 37.6 kg/m<sup>2</sup> (range: 31.7-44.1 Kg/m<sup>2</sup>), HOMA-index  $\geq$  2.5 (range: 2.9-12) were assigned to an LCD regimen (1000 kcal/day) with supplementation of 18 g whey proteins which 4.1 g of leucine for 45 days. Anthropometric indexes, blood and urine chemistry, body composition by DEXA, muscle strength by handgrip test and Short Physical Performance Battery (SPPB) were assessed at baseline and at the end of the treatment. A significant reduction in BMI (37.6 vs. 35.7 Kg/m<sup>2</sup>), waist circumference (107 vs. 102.4 cm), HOMA index (4.8 vs. 2.3) and fasting insulin (17.4 vs. 10.4  $\mu$ U/mL) was observed in all patients. Women preserved total lean body mass (55 vs. 5%) and significantly improved their muscle strength, as measured by handgrip (15.3 vs. 20.1 Kg), and their muscle function, as measured by SPPB (7.5 vs. 8.9). A significant increase in BUN was also observed (36.1 vs. 46.3). We conclude that LCD with adequate protein intake and supplementation with whey protein and leucine should be promoted to maintain muscle mass and improve muscle strength in post-menopausal women with sarcopenic obesity.

Gentile S, Guarino G, Della Corte T, Marino G, Satta E, Pasquarella M, Romano C, Alfarone C, Giordano L, Loiacono F, Capece M, Lamberti R, Strollo F; Nefrocenter, Nyx Start-up, AMD-OSDI Study Group on Injection Techniques, ANIAD.

**Why do so many people with type 2 diabetes who take insulin have lipohypertrophy? Fate or educational deficiencies?**

*Diabetes Therapy: Research, Treatment and Education of Diabetes and Related Disorders*, 14(1), 179–191. doi:10.1007/s13300-022-01341-w

Introduction: Cutaneous lipohypertrophy (LH) is a thickened, "rubbery" lesion in the subcutaneous tissue following multiple injections performed at the same site, i.e., an incorrect injection technique. It is widespread, averaging 47% of insulin patients worldwide, and has severe direct and indirect consequences. Direct consequences consist mainly of poor metabolic control and frequent hypoglycemic events (HYPOs), and indirect ones of markedly increased healthcare costs related to hospital access due to acute events and long-term disease complications. This observation also holds for Italy, despite the National Health System organization expecting every patient with diabetes to undergo a series of visits by different care team members, each performing a specific treatment/education task. Indeed, the recent literature points to poor awareness of LH relevance and metabolic consequences among doctors from general and diabetic hospital wards, with educational deficiencies on correct injection practice in nurses too. The aim was to establish if, to what extent, and by whom they had received training on correct insulin injection techniques, and how many initially received notions had persisted over time.

Methods: We investigated the possible causes of such a failure from the point of view of 1160 insulin-requiring subjects with type 2 diabetes (T2DM), reporting for the first time to specialized diabetic structures through a validated questionnaire and, in the same patients, we searched for LH by inspection/palpation according to international guidelines, further confirmed by ultrasound scans. We then analyzed differences in education and injecting behavior between subjects classified as LH+ or LH- depending on the presence or absence of LH lesions.

Results: We documented significant educational gaps, with 50% of patients failing to refer to healthcare professionals and relying on their peers with diabetes, thought to be more experienced in 15% of the cases. Seventy-five percent of LH- patients received education from healthcare providers, while 90% of LH+ learned from another patient or could not remember how they knew, and 68% of LH+ versus 52% of LH- ( $p < 0.01$ ) patients had failed to receive training on injection techniques by healthcare providers. All of this enabled the most disabling features of diabetes from the very beginning of the disease history.

Conclusions: This study documents, from the patients' point of view, that educational gaps are significant and that, even in initially trained subjects, education on correct injection techniques has a fleeting effect if not regularly recalled. Therefore, to rehabilitate LH+ patients as soon as possible and prevent LH- patients from inadvertently slipping into the other group, there is an urgent need to educate doctors and nurses repeatedly on the importance of correctly injecting insulin to improve patients' knowledge and skills.

Metra M, Tomasoni D, Adamo M, Bayes-Genis A, Filippatos G, Abdelhamid M, Adamopoulos S, Anker SD, Antohi L, Böhm M, Braunschweig F, Ben Gal T, Butler J, Cleland JGF, Cohen-Solal A, Damman K, Gustafsson F, Hill L, Jankowska EA, Lainscak M, Lund LH, McDonagh T, Mebazaa A, Moura B, Mullens W, Piepoli M, Ponikowski P, Rakisheva A, Ristic A, Savarese G, Seferovic P, Sharma R, Tocchetti CG, Yilmaz MB, Vitale C, Volterrani M, von Haehling S, Chioncel O, Coats AJS, Rosano G.

**Worsening of chronic heart failure: definition, epidemiology, management and prevention. A clinical consensus statement by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.**

*European Journal of Heart Failure*, 25(6), 776–791. doi:10.1002/ejhf.2874

Episodes of worsening symptoms and signs characterize the clinical course of patients with chronic heart failure (HF). These events are associated with poorer quality of life, increased risks of hospitalization and death and are a major burden on healthcare resources. They usually require diuretic therapy, either administered intravenously or by escalation of oral doses or with combinations of different diuretic classes. Additional treatments may also have a major role, including initiation of guideline-recommended medical therapy (GRMT). Hospital admission is often necessary but treatment in the emergency service or in outpatient clinics or by primary care physicians has become increasingly used. Prevention of first and recurring episodes of worsening HF is an essential component of HF treatment and this may be achieved through early and rapid administration of GRMT. The aim of the

present clinical consensus statement by the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology is to provide an update on the definition, clinical characteristics, management and prevention of worsening HF in clinical practice.

Ornello R, Baraldi C, Guerzoni S, Lambro G, Andreou AP, Raffaelli B, Sacco S, Gendolla A, Barbanti P, Aurilia C, Egeo G, Cevoli S, Favoni F, Vernieri F, Altamura C, Russo A, Silvestro M, Dalla Valle E, Manciola A, Ranieri A, Alfieri G, Latysheva N, Filatova E, Talbot J, Cheng S, Holle D, Scheffler A, Nežádal T, Čtrnáctá D, Šípková J, Matoušová Z, Casalena A, Maddestra M, Viola S, Affaitati G, Giamberardino MA, Pistoia F, Reuter U, Sacco S.

**Comparing the relative and absolute effect of erenumab: is a 50% response enough? Results from the ESTEEMen study.**

*The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 38. doi:10.1186/s10194-022-01408-w

**Background:** Monoclonal antibodies acting on the calcitonin gene-related peptide (CGRP) or its receptor have changed migraine preventive treatment. Those treatments have led to reconsidering the outcomes of migraine prevention. Available data mostly considered benefits in terms of relative efficacy (percent or absolute decrease in monthly migraine days [MMDs] or headache days compared with baseline). However, not enough attention has been paid to residual MMDs and/or migraine-related disability in treated patients. In the present study, we aimed at comparing the relative and absolute efficacy of erenumab.

**Methods:** ESTEEMen was a collaborative project among 16 European headache centers which already performed real-life data collections on patients treated with erenumab for at least 12 weeks. For the present study, we performed a subgroup analysis on patients with complete data on MMDs at baseline and at weeks 9-12 of treatment. Starting from efficacy thresholds proposed by previous literature, we classified patients into 0-29%, 30-49%, 50-74%, and  $\geq 75\%$  responders according to MMD decrease from baseline to weeks 9-12 of treatment. For each response category, we reported the median MMDs and Headache Impact test-6 (HIT-6) scores at baseline and at weeks 9-12. We categorized the number of residual MMDs at weeks 9-12 as follows: 0-3, 4-7, 8-14,  $\geq 15$ . We classified HIT-6 score into four categories:  $\leq 49$ , 50-55, 56-59, and  $\geq 60$ . To keep in line with the original scope of the ESTEEMen study, calculations were performed in men and women.

**Results:** Out of 1215 patients, at weeks 9-12, 381 (31.4%) had a 0-29% response, 186 (15.3%) a 30-49% response, 396 (32.6%) a 50-74% response, and 252 (20.7%) a  $\geq 75\%$  response; 246 patients (20.2%) had 0-3 residual MMDs, 443 (36.5%) had 4-7 MMDs, 299 (24.6%) had 8-14 MMDs, and 227 (18.7%) had  $\geq 15$  MMDs. Among patients with 50-74% response, 246 (62.1%) had 4-7 and 94 (23.7%) 8-14 residual MMDs, while among patients with  $\geq 75\%$  response 187 (74.2%) had 0-3 and 65 (25.8%) had 4-7 residual MMDs.

**Conclusions:** The present study shows that even patients with good relative response to erenumab may have a clinically non-negligible residual migraine burden. Relative measures of efficacy cannot be enough to thoroughly consider the efficacy of migraine prevention.

Piccardi L, Palmiero M, Cofini V, Verde P, Boccia M, Palermo L, Guariglia C, Nori R.

**'Where am I?' A snapshot of the developmental topographical disorientation among young Italian adults.**

*PloS One*, 17(7), e0271334. doi:10.1371/journal.pone.0271334

In the last decade, several cases affected by Developmental Topographical Disorientation (DTD) have been described. DTD consists of a neurodevelopmental disorder affecting the ability to orient in the environment despite well-preserved cognitive functions, and in the absence of a brain lesion or other neurological or psychiatric conditions. Described cases showed different impairments in navigational skills ranging from topographic memory deficits to landmark agnosia. All cases lacked a mental representation of the environment that would allow them to use high-order spatial orientation strategies. In addition to the single case studies, a group study performed in Canada showed that the disorder is more widespread than imagined. The present work intends to investigate the occurrence of

the disorder in 1,698 young Italian participants. The sample is deliberately composed of individuals aged between 18 and 35 years to exclude people who could manifest the loss of the ability to navigate as a result of an onset of cognitive decline. The sample was collected between 2016 and 2019 using the Qualtrics platform, by which the Familiarity and Spatial Cognitive Style Scale and anamnestic interview were administered. The data showed that the disorder is present in 3% of the sample and that the sense of direction is closely related to town knowledge, navigational strategies adopted, and gender. In general, males use more complex navigational strategies than females, although DTD is more prevalent in males than in females, in line with the already described cases. Finally, the paper discusses which protective factors can reduce DTD onset and which intervention measures should be implemented to prevent the spread of navigational disorders, which severely impact individuals' autonomy and social relationships.

Stocchi F, Peckham EL, De Pandis MF, Sciarappa K, Kleiman R, Agbo F, Olanow CW, Blum D, Navia B.

**A randomized thorough QT study of apomorphine sublingual film in patients with Parkinson's disease.**

*Clinical Pharmacology in Drug Development*, 11(9), 1068–1077. doi:10.1002/cpdd.1147

A randomized thorough QT study was conducted to assess the effects of apomorphine sublingual film (SL-APO) on corrected QT interval (QTc) and other cardiac conduction parameters in patients with Parkinson's disease (PD) and "OFF" episodes. Patients were titrated to an SL-APO dose that resulted in FULL "ON," followed by up to two additional doses (maximum 60 mg), then randomized at the highest tolerated dose to a treatment sequence of SL-APO, placebo, and moxifloxacin (400 mg, positive control) in a three-way crossover design. Changes from baseline in time-matched, placebo-adjusted Fridericia-corrected QTc interval ( $\Delta\Delta\text{QTcF}$ ) and Bazett-corrected QTc interval ( $\Delta\Delta\text{QTcB}$ ) were analyzed from postdose electrocardiograms. Forty patients were randomized and received single doses of study treatments. Upper limits of 90% confidence intervals (CIs) for  $\Delta\Delta\text{QTcF}$  of SL-APO were below the 10-millisecond regulatory threshold at all prespecified timepoints, demonstrating no clinically significant effect on QTcF. Lower limits of 90% CIs for  $\Delta\Delta\text{QTcF}$  of moxifloxacin exceeded the 5-millisecond regulatory threshold at all timepoints up to 3 hours, confirming assay sensitivity. SL-APO had no clinically meaningful effects on QTcB, PR/QRS intervals, heart rate, or electrocardiogram-derived morphology (EudraCT identifier: 2016-001762-29; ClinicalTrials.gov identifier: NCT03187301).

Mariani L, Cilfone A, Nicastrì M, Pipitone LL, Stella F, de Vincentiis M, Greco A, Mancini P, Longo L, Ruoppolo G.

**Accuracy of Dysphagia Standard Assessment (DSA®) bedside screening test: a flowchart for patient eligibility.**

*Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 43(9), 5411–5419. doi:10.1007/s10072-022-06175-9

Background: Oropharyngeal dysphagia (OD) screening tests have improved patient management; however, the complex applicability and high percentage of false negatives do not allow these tests to be considered completely reliable if not supported by an instrumental investigation. The aim of the present study is to evaluate an OD screening test, the Dysphagia Standard Assessment (DSA®) with different volumes and viscosities.

Materials and methods: Prospective study of 72 patients evaluated for suspected OD through a double-blind methodology conducted by two operators. All patients underwent fiberoptic endoscopic evaluation of swallowing (FEES) as a reference test and a separate DSA® test. DSA® was performed by administering boluses with different viscosities, with the signal of interruption of the test being: onset of the cough reflex, wet voice after swallowing, and/or desaturation of O<sub>2</sub>  $\geq$  5%. The Penetration-Aspiration Scale (PAS) was evaluated by FEES. The cut-off identified to diagnose OD was PAS  $\geq$  3.

Results: The test showed an accuracy of 82%, a sensitivity of 0.93 (95% C.I. 0.84-0.97), and a specificity of 0.78 (95% C.I. 0.67-0.87); positive predictive value 0.55 (95% C.I. 0.43-0.67); negative predictive value

0.97 (95% C.I. 0.90-0.99), positive likelihood ratio 4.37 (95% C.I. 3.6-5.2); likelihood negative ratio 0.08 (95% C.I. 0.06-0.09).

Conclusions: According to the preliminary results, the test showed good outcomes in determining the presence or absence of OD with a wide spectrum of applicability with some limitations that could be overcome by the selection of a target population. For this reason, a flowchart to address patient eligibility was developed.

Babiloni C, Noce G, Di Bonaventura C, Lizio R, Eldellaa A, Tucci F, Salamone EM, Ferri R, Soricelli A, Nobili F, Famà F, Arnaldi D, Palma E, Cifelli P, Marizzoni M, Stocchi F, Bruno G, Di Gennaro G, Frisoni GB, Del Percio C.

**Alzheimer's disease with epileptiform EEG activity: Abnormal cortical sources of resting state delta rhythms in patients with amnesic mild cognitive impairment.**

*Journal of Alzheimer's Disease: JAD, 88(3), 903–931. doi:10.3233/JAD-220442*

Background: Patients with amnesic mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease (ADMCI) typically show a "slowing" of cortical resting-state eyes-closed electroencephalographic (rsEEG) rhythms. Some of them also show subclinical, non-convulsive, and epileptiform EEG activity (EEA) with an unclear relationship with that "slowing."

Objective: Here we tested the hypothesis that the "slowing" of rsEEG rhythms is related to EEA in ADMCI patients.

Methods: Clinical and instrumental datasets in 62 ADMCI patients and 38 normal elderly (Nold) subjects were available in a national archive. No participant had received a clinical diagnosis of epilepsy. The eLORETA freeware estimated rsEEG cortical sources. The area under the receiver operating characteristic curve (AUROCC) indexed the accuracy of eLORETA solutions in the classification between ADMCI-EEA and ADMCI-noEEA individuals.

Results: EEA was observed in 15% (N = 8) of the ADMCI patients. The ADMCI-EEA group showed: 1) more abnormal A $\beta$ 42 levels in the cerebrospinal fluid as compared to the ADMCI-noEEA group and 2) higher temporal and occipital delta (<4 Hz) rsEEG source activities as compared to the ADMCI-noEEA and Nold groups. Those source activities showed moderate accuracy (AUROCC = 0.70-0.75) in the discrimination between ADMCI-noEEA versus ADMCI-EEA individuals.

Conclusion: It can be speculated that in ADMCI-EEA patients, AD-related amyloid neuropathology may be related to an over-excitation in neurophysiological low-frequency (delta) oscillatory mechanisms underpinning cortical arousal and quiet vigilance.

Bini C, Mennini F., Marcellusi A, Paoletti M, Tomino C.

**Analisi di impatto di budget di un nuovo sistema di cura in pazienti affetti da malattia di Parkinson.**

*Global & Regional Health Technology Assessment 2022 Sep 19:9:91-98. doi: 10.33393/grhta.2022.2413. eCollection 2022 Jan-Dec.*

Objective: To estimate the economic impact of the introduction of a new care system based on apomorphine and Patient Support Program for motor fluctuations ("on-off" phenomena) in patients with Parkinson's disease which are not sufficiently controlled by oral anti-Parkinson medication in Italy.

Method: A Budget Impact model was developed to evaluate the new care system in patients with Parkinson's disease over a 3-years' time horizon. The comparator treatments included in the analysis were treatments based on apomorphine and levodopa + carbidopa. The analysis was conducted from a National Health Service (NHS) perspective. Costs included in the analysis were acquisition costs and device costs. A deterministic sensitivity analysis was carried out to evaluate the uncertainty of the parameters used. A break-even analysis was conducted to identify the minimum number of subjects that would need to be treated with the new care system to obtain a positive Budget Impact (World With – World Without = 0).

Results: The analysis shows that the introduction of the new care system based on apomorphine could generate a cost saving incurred by the NHS of over € 5.7 million in 3 years. Break-even analysis shows that if it were possible to intercept with the new treatment at least 9 patients treated with apomorphine, there would not be an increase in costs for the NHS.

Conclusion: The new care system would respond to the unmet needs of patients with Parkinson's disease by generating a reduction in the expenditure incurred by NHS.

Ferrario C, Condoluci C, Tarabini M, Galli M.

**Corrigendum to 'Energy analysis of gait in patients with down syndrome'** [Heliyon 8 (11) (November 2022) Article e11702].

*Heliyon*, 9(4), e14382. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e14382

Mostile G, Geroi C, Erro R, Luca A, Marcuzzo E, Barone P, Ceravolo R, Mazzucchi S, Pilotto A, Padovani A, Michele Romito L, Eleopra R, Dallochio C, Arbasino C, Bono F, Bruno PA, Demartini B, Gambini O, Modugno N, Olivola E, Bonanni L, Albanese A, Ferrazzano G, De Micco R, Zibetti M, Calandra-Buonaura G, Petracca M, Morgante F, Esposito M, Pisani A, Manganotti P, Stocchi F, Coletti Moja M, Di Vico IA, Tesolin L, De Bertoldi F, Ercoli T, Defazio G, Zappia M, Nicoletti A, Tinazzi M.

**Data-driven clustering of combined Functional Motor Disorders based on the Italian registry.**

*Frontiers in Neurology*, 13, 987593. doi:10.3389/fneur.2022.987593

Introduction: Functional Motor Disorders (FMDs) represent nosological entities with no clear phenotypic characterization, especially in patients with multiple (combined FMDs) motor manifestations. A data-driven approach using cluster analysis of clinical data has been proposed as an analytic method to obtain non-hierarchical unbiased classifications. The study aimed to identify clinical subtypes of combined FMDs using a data-driven approach to overcome possible limits related to "a priori" classifications and clinical overlapping.

Methods: Data were obtained by the Italian Registry of Functional Motor Disorders. Patients identified with multiple or "combined" FMDs by standardized clinical assessments were selected to be analyzed. Non-hierarchical cluster analysis was performed based on FMDs phenomenology. Multivariate analysis was then performed after adjustment for principal confounding variables.

Results: From a study population of n = 410 subjects with FMDs, we selected n = 188 subjects [women: 133 (70.7%); age: 47.9 ± 14.4 years; disease duration: 6.4 ± 7.7 years] presenting combined FMDs to be analyzed. Based on motor phenotype, two independent clusters were identified: Cluster C1 (n = 82; 43.6%) and Cluster C2 (n = 106; 56.4%). Cluster C1 was characterized by functional tremor plus parkinsonism as the main clinical phenotype. Cluster C2 mainly included subjects with functional weakness. Cluster C1 included older subjects suffering from anxiety who were more treated with botulinum toxin and antiepileptics. Cluster C2 included younger subjects referring to different associated symptoms, such as pain, headache, and visual disturbances, who were more treated with antidepressants.

Conclusion: Using a data-driven approach of clinical data from the Italian registry, we differentiated clinical subtypes among combined FMDs to be validated by prospective studies.

Di Vita A, Vecchione F, Boccia M, Bocchi A, Cinelli MC, Mirino P, Teghil A, D'Antonio F, de Lena C, Piccardi L, Giannini AM, Guariglia C.

**DiaNe: A new first-level computerized tool assessing memory, attention, and visuospatial processing to detect early pathological cognitive decline.**

*Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 86(2), 891–904. doi:10.3233/JAD-215294

Background: Detecting the beginning of cognitive decay is crucial to guarantee good management and the possible prevention of dementia progression. The present study arises from observations collected during an educational event to promote mental and physical health in which incidental

neuropsychological data gathered on 290 citizens showed the importance of routine neuropsychological examination in detecting early signs of cognitive decay, since many individuals were unaware of the decrease in their cognitive efficiency. Accordingly, the availability of a screening tool that is computerized, portable, self-administrable, and sensitive to the main neurocognitive changes testifying the progression towards pathological aging is critical.

**Objective:** To this aim, we developed a computerized battery for the early, preclinical Diagnosis of Neurocognitive disease (DiaNe), that can be self-administered and performed autonomously by using a tablet.

**Methods:** DiaNe includes tests expected to evaluate the main cognitive domains involved in neurodegenerative diseases (memory, attention, executive functions) with a detailed assessment of visuospatial memory in particular.

**Results:** DiaNe is not just the translation of standard tests into telematics, rather it is a new tool that provides both accuracy and response time measurements, aimed to screen cognitive profile and monitor it over time, being able to detect changes in still normal performances that may be suggestive of an ongoing onset of neurocognitive disorders.

**Conclusion:** Here we present an investigation of DiaNe concurrent validity showing that its results are comparable to those obtained by existing paper-and-pencil neuropsychological tests, and propose that DiaNe could be a useful, quick, and economical instrument for the monitoring of cognitive aging.

Kantor D, Farlow M, Ludolph A, Montaner J, Sankar R, Sawyer RN, Jr, Stocchi F, Lara A, Clark S, Deschet K, Ouyahia L, Hadjiat Y.

**Digital scientific platform for independent content in neurology: Rigorous quality guideline development and implementation.**

*Interactive Journal of Medical Research, 11(1), e35698. doi:10.2196/35698*

**Background:** Digital communication has emerged as a major source of scientific and medical information for health care professionals. There is a need to set up an effective and reliable methodology to assess and monitor the quality of content that is published on the internet.

**Objective:** The aim of this project was to develop content quality guidelines for Neurodiem, an independent scientific information platform dedicated to neurology for health care professionals and neuroscientists. These content quality guidelines are intended to be used by (1) content providers as a framework to meet content quality standards and (2) reviewers as a tool for analyzing and scoring quality of content.

**Methods:** Specific scientific criteria were designed using a 5-point scale to measure the quality of curated and original content published on the website: for Summaries, (1) source reliability and topic relevance for neurologists, (2) structure, and (3) scientific and didactic value; for Congress highlights, (1) relevance of congress selection, (2) congress coverage based on the original program, and (3) scientific and didactic value of individual abstracts; for Expert points of view and talks, (1) credibility (authorship) and topic relevance for neurologists, (2) scientific and didactic value, and (3) reliability (references) and format. The criteria were utilized on a monthly basis and endorsed by an independent scientific committee of widely recognized medical experts in neurology.

**Results:** Summary content quality for the 3 domains (reliability and relevance, structure, and scientific and didactic value) increased in the second month after the implementation of the guidelines. The domain scientific and didactic value had a mean score of 8.20/10. Scores for the domains reliability and relevance (8-9/10) and structure (45-55/60) showed that the maintenance of these 2 quality items over time was more challenging. Talks (either in the format of interviews or slide deck-supported scientific presentations) and expert point of view demonstrated high quality after the implementation of the content quality guidelines that was maintained over time (15-25/25).

**Conclusions:** Our findings support that content quality guidelines provide both (1) a reliable framework for generating independent high-quality content that addresses the educational needs of neurologists and (2) are an objective evaluation tool for improving and maintaining scientific quality level. The use of these criteria and this scoring system could serve as a standard and reference to build an editorial strategy and review process for any medical news or platforms.



Giancola M, Palmiero M, Bocchi A, Piccardi L, Nori R, D'Amico S.

**Divergent thinking in Italian elementary school children: the key role of probabilistic reasoning style.**

*Cognitive Processing*, 23(4), 637–645. doi:10.1007/s10339-022-01104-2

Divergent thinking is widely recognised as an individual creative potential and an essential factor in fostering creativity since the early stages of life. Albeit previous research revealed that creativity could be pursued through controlled mental processes (e.g. reasoning), the debate about the impact of children's reasoning on divergent thinking and, ultimately, creativity is still open. The present study sought to deepen the relationships between probabilistic reasoning and divergent thinking in a sample of 106 Italian children (mean age = 8.64, SD age = 1.34; 58 F). The Beads Task was used to evaluate probabilistic reasoning, whereas the Alternative Uses Task was administered to assess divergent thinking. Results revealed that analytical, slow, and effortful forms of thought underpinned by high probabilistic competencies predict children's divergent production. These findings suggest that a higher score for divergence of thinking depends on a high involvement of reasoning style, which in this study relies on the ability to make probabilistic decisions in ambiguous situations. Future research directions were discussed.

Ercoli T, Tinazzi M, Geroin C, Marcuzzo E, Erro R, Cuoco S, Ceravolo R, Mazzucchi S, Pilotto A, Padovani A, Romito LM, Eleopra R, Zappia M, Nicoletti A, Dallochio C, Arbasino C, Bono F, Spano G, Demartini B, Gambini O, Modugno N, Olivola E, Bonanni L, Albanese A, Ferrazzano G, Tessitore A, Lopiano L, Calandra-Buonaura G, Petracca M, Morgante F, Esposito M, Pisani A, Manganotti P, Tesolin L, Teatini F, Stocchi F, Defazio G.

**Do demographic and clinical features and comorbidities affect the risk of spread to an additional body site in functional motor disorders?**

*Journal of Neural Transmission (Vienna)*, 129(10), 1271–1276. doi:10.1007/s00702-022-02537-x

The aim of this study is to assess changes in the body distribution and the semeiology of functional motor disorder (FMD) in patients who reported only one or more than one body site affected at FMD onset. Data were obtained from the Italian Registry of Functional Motor Disorders, which included patients with a diagnosis of clinically definite FMDs. The relationship between FMD features and spread to other body sites was estimated by multivariate Cox regression analysis. We identified 201 (49%) patients who reported only one body site affected at FMD onset and 209 (51%) who reported multiple body sites affected at onset. FMD spread from the initial site to another site in 43/201 (21.4%) patients over  $5.7 \pm 7.1$  years in those with only one site affected at FMD onset; FMD spread to another body site in 29/209 (13.8%) over  $5.5 \pm 6.5$  years. The spread of FMD was associated with non-motor functional symptoms and psychiatric comorbidities only in the patients with one body site affected at FMD onset. Our findings provide novel insight into the natural history of FMD. The number of body sites affected at onset does not seem to have a consistent influence on the risk of spread. Furthermore, our findings suggest that psychiatric comorbidities and non-motor functional symptoms may predict the spread of FMD symptoms, at least in patients with one body site affected at onset.

Ferreira JJ, Poewe W, Rascol O, Stocchi F, Antonini A, Moreira J, ... Soares-da-Silva, P. (2022).

**Effect of opicapone on levodopa pharmacokinetics in patients with fluctuating Parkinson's disease.**

*Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 37(11), 2272–2283. doi:10.1002/mds.29193

Background: Inhibiting catechol-O-methyltransferase extends the plasma half-life of levodopa, potentially allowing physicians to optimize the levodopa regimen in patients with Parkinson's disease (PD) experiencing motor fluctuations.

**Objectives:** To evaluate the effects of once-daily opicapone on levodopa plasma pharmacokinetics and motor response when added to two different levodopa dosing regimens.

**Methods:** A total of 24 patients with PD and motor fluctuations were enrolled in an exploratory, open-label, modified cross-over trial. Participants first received levodopa/carbidopa 500/125 mg (five intakes) for 2 weeks and were then randomly assigned (1:1) to levodopa/carbidopa 400/100 mg given over either four or five daily intakes plus opicapone 50 mg for an additional 2 weeks. Levodopa 12-hour pharmacokinetics was the primary outcome (ie, excluding the effect of last/evening levodopa/carbidopa intake), with motor complications evaluated as secondary outcomes.

**Results:** Over 12-hour pharmacokinetics and compared with five-intake levodopa/carbidopa 500/125 mg without opicapone, maximal levodopa concentrations were similar or nonsignificantly higher on both levodopa/carbidopa 400/100 mg regimens plus opicapone. Despite a 100 mg lower total levodopa/carbidopa daily dose, adding opicapone 50 mg at least doubled the levodopa plasma half-life and minimal concentrations, with a significant  $\approx 30\%$  increase in total exposure. The levodopa fluctuation index was only significantly lower for the five intakes plus opicapone regimen (difference of  $-71.8\%$ ;  $P < 0.0001$ ). Modifications to levodopa pharmacokinetics were associated with decreased off time and increased on time.

**Conclusions:** Combining opicapone 50 mg with a 100 mg lower daily dose of levodopa provides higher levodopa bioavailability with avoidance of trough levels. Despite the lower levodopa dose, modifying the levodopa pharmacokinetic profile with opicapone was associated with decreased off time and increased on time. © 2022 The Authors. Movement Disorders published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society.

Padovani A, Antonini A, Barone P, Bellelli G, Fagiolini A, Ferini Strambi L, Sorbi S, tocchi F.

**Exploring depression in Alzheimer's disease: an Italian Delphi Consensus on phenomenology, diagnosis, and management.**

*Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology.* doi:10.1007/s10072-023-06891-w

**Background:** In Alzheimer's disease (AD), the progressive cognitive impairment is often combined with a variety of neuropsychiatric symptoms, firstly depression. Nevertheless, its diagnosis and management is difficult, since specific diagnostic criteria and guidelines for treatment are still lacking. The aim of this Delphi study is to reach a shared point of view among different Italian specialists on depression in AD.

**Methods:** An online Delphi survey with 30 questions regarding epidemiology, diagnosis, clinical features, and treatment of depression in AD was administered anonymously to a panel of 53 expert clinicians.

**Results:** Consensus was achieved in most cases (86%). In the 80% of statements, a positive consensus was reached, while in 6% a negative consensus was achieved. No consensus was obtained in 14%. Among the most relevant findings, the link between depression and AD is believed to be strong and concerns etiopathogenesis and phenomenology. Further, depression in AD seems to have specific features compared to major depressive disorder (MDD). Regarding diagnosis, the DSM 5 diagnostic criteria for MDD seems to be not able to detect the specific aspects of depression in AD. Concerning treatment, antidepressant drugs are generally considered the main option for depression in dementia, according to previous guidelines. In order to limit side effects, multimodal and SSRI antidepressant are preferred by clinicians. In particular, the procognitive effect of vortioxetine seems to be appealing for the treatment of depression in AD.

**Conclusions:** This study highlights some crucial aspects of depression in AD, but more investigations and specific recommendations are needed.

Isaacson SH, Bowling A, Zhang I, Pappert E, Stocchi F, CTH-300 and CTH-301 Study Investigators. (2023).

**Motor response with apomorphine sublingual film and levodopa in patients with OFF episodes.**

*Neurodegenerative Disease Management*, 13(2), 75–84. doi:10.2217/nmt-2022-0038

Aim: Evaluate timing of motor improvement with carbidopa/levodopa (CD/LD) and apomorphine sublingual film (SL-APO) in patients with Parkinson's disease and OFF episodes. Methods: A post hoc pooled analysis from two studies assessed Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III (MDS-UPDRS-III) scores and investigator-rated FULL ON. Results: At 15 and 30 min following the prescribed first daily CD/LD dose, mean improvements in MDS-UPDRS-III scores were -6.7 and -16.3, respectively, and FULL ON was achieved by 6.5 and 41.8% of patients. Following an optimized SL-APO dose, mean improvements in MDS-UPDRS-III scores were -13.9 and -22.9, and FULL ON was achieved by 34.7 and 81.0% of patients. Conclusion: Concomitant administration of SL-APO with carbidopa/levodopa may be useful for delayed ON.

Ferreira JJ, Poewe W, Rascol O, Stocchi F, Antonini A, Moreira J, Pereira A, Rocha JF, Soares-da-Silva, P. (2022).

**Opicapone as an add-on to levodopa in patients with Parkinson's disease without motor fluctuations: Rationale and design of the phase III, double-blind, randomised, placebo-controlled EPSILON trial.**

*Neurology and Therapy, 11(3), 1409–1425. doi:10.1007/s40120-022-00371-7*

Introduction: Levodopa remains the cornerstone treatment for Parkinson's disease (PD) but its use is associated with the development of 'wearing-off' fluctuations and other motor and non-motor complications over time. Adding a catechol-O-methyltransferase (COMT) inhibitor to levodopa/dopa decarboxylase (DDC) inhibitor therapy reduces fluctuations in the profile of plasma levodopa levels following oral dosing, and can therefore be beneficial for the management of motor complications. The objective of the EPSILON study is to investigate the efficacy of opicapone (OPC; a third-generation, once-daily COMT inhibitor) in enhancing the clinical benefit of levodopa in patients in earlier stages of PD, without end-of-dose motor fluctuations.

Methods: EPSILON is a phase III, double-blind, randomised, placebo-controlled and parallel-group study, designed to evaluate the efficacy and safety of OPC as add-on to levodopa/DDC inhibitor therapy in patients with early PD who do not exhibit signs of motor complications. Eligible patients will be randomised (1:1) to receive OPC 50 mg or placebo, in addition to their existing levodopa/DDC inhibitor therapy, over a 24-week, double-blind treatment period, after which they will have the option of entering an additional 1-year, open-label extension period, during which all patients will receive OPC 50 mg.

Planned outcomes: The primary efficacy endpoints are change in Movement Disorders Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) Part III total score from baseline to the end of the double-blind period (double-blind phase) and change in MDS-UPDRS Part IV total score from open-label baseline to the end of the open-label period (open-label phase). Secondary outcomes during the double-blind phase will include other measures of PD symptoms, including quality of life, non-motor symptoms, and development of motor fluctuations. Safety assessments will include evaluation of treatment-emergent adverse events, laboratory safety parameters, suicidality and impulse control disorders.

Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Lopez S, Pennica A, Roma P, Correr V, Cucciolla F, Toma G, Soricelli A, Di Campli F, Aceti A, Teti E, Sarmati L, Crocetti G, Ferri R, Lorenzo I, Galli M, Negri C, Angarano G, Saracino A, Lepore L, Di Pietro M, Fusco FM, Vullo V, D'Ettore G, Pagliano P, Di Flumeri G, Celesia BM, Gentilini Cacciola E, Di Perri G, Calcagno A, Stocchi F, Ferracuti S, Onorati p, Andreoni M, Noce G.

**Parietal intrahemispheric source connectivity of resting-state electroencephalographic alpha rhythms is abnormal in Naïve HIV patients.**

*Brain Research Bulletin, 181, 129–143. doi:10.1016/j.brainresbull.2022.01.015*

Previous evidence showed abnormal parietal sources of resting-state electroencephalographic (EEG) delta (< 4 Hz) and alpha (8-12 Hz) rhythms in treatment-Naïve HIV (Naïve HIV) subjects, as cortical neural synchronization markers in quiet wakefulness. Here, we tested the hypothesis that these local

abnormalities may be related to functional cortical dysconnectivity as an oscillatory brain network disorder. The present EEG database regarded 128 Naïve HIV and 60 Healthy subjects. The eLORETA freeware estimated lagged linear EEG source connectivity (LLC). The area under receiver operating characteristic (AUROC) curve indexed the accuracy in the classification between Healthy and HIV individuals. Parietal intrahemispheric LLC solutions in alpha sources were abnormally lower in the Naïve HIV than in the control group. Furthermore, those abnormalities were greater in the Naïve HIV subgroup with executive and visuospatial deficits than the Naïve HIV subgroup with normal cognition. AUROC curves of those LLC solutions exhibited moderate/good accuracies (0.75-0.88) in the discrimination between the Naïve HIV individuals with executive and visuospatial deficits vs. Naïve HIV individuals with normal cognition and control individuals. In quiet wakefulness, Naïve HIV subjects showed clinically relevant abnormalities in parietal alpha source connectivity. HIV may alter a parietal "hub" oscillating at the alpha frequency in quiet wakefulness as a brain network disorder.

Babiloni C, Lorenzo I, Lizio R, Lopez S, Tucci F, Ferri R, Soricelli A, Nobili F, Arnaldi D, Famà F, Buttinelli C, Giubilei F, Cipollini V, Onofrij M, Stocchi F, Vacca L, Fuhr P, Gschwandtner U, Ransmayr G, Aarsland D, Parnetti L, Marizzoni M, D'Antonio F, De Lena C, Güntekin B, Yıldırım E, Hanoğlu L, Yener G, Hünerli Gündüz D, Taylor JP, Schumacher J, McKeith I, Frisoni GB, De Pandis MF, Bonanni L, Del Percio C, Noce G.

**Reactivity of posterior cortical electroencephalographic alpha rhythms during eyes opening in cognitively intact older adults and patients with dementia due to Alzheimer's and Lewy body diseases.**

*Neurobiology of Aging*, 115, 88–108. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2022.04.001

Please modify the Abstract as follows: Here we tested if the reactivity of posterior resting-state electroencephalographic (rsEEG) alpha rhythms from the eye-closed to the eyes-open condition may differ in patients with dementia due to Lewy Bodies (DLB) and Alzheimer's disease (ADD) as a functional probe of the dominant neural synchronization mechanisms regulating the vigilance in posterior visual systems. We used clinical, demographical, and rsEEG datasets in 28 older adults (Healthy), 42 DLB, and 48 ADD participants. The eLORETA freeware was used to estimate cortical rsEEG sources. Results showed a substantial (> -10%) reduction in the posterior alpha activities during the eyes-open condition in 24 Healthy, 26 ADD, and 22 DLB subjects. There were lower reductions in the posterior alpha activities in the ADD and DLB groups than in the Healthy group. That reduction in the occipital region was lower in the DLB than in the ADD group. These results suggest that DLB patients may suffer from a greater alteration in the neural synchronization mechanisms regulating vigilance in occipital cortical systems compared to ADD patients.

Stocchi F, Antonini A, Berg D, Bergmans B, Jost W, Katzenschlager R, Kulisevsky J, Odin P, Valldeoriola F, Chaudhuri KR.

**Safinamide in the treatment pathway of Parkinson's Disease: a European Delphi Consensus.**

*NPJ Parkinson's Disease*, 8(1), 17. doi:10.1038/s41531-022-00277-z

Safinamide is a highly selective, reversible MAO B-inhibitor recently marketed in European and North American countries. To better define clinical indications regarding motor and non-motor symptoms, targeted population and safety of this compound, ten movement disorders specialists, experts in their field, convened and developed a panel of statements on: the role of glutamate in Parkinson's disease, introduction to fluctuations, efficacy of safinamide on motor symptoms, motor complications and non-motor symptoms, quality of life, safety of safinamide and target population for use. Strong consensus was reached for all the statements on the efficacy of safinamide on motor symptoms, motor fluctuations, quality of life and safety. Among non-motor symptoms, a positive consensus was reached for the symptoms sleep/fatigue, mood, and pain while there was a lack of consensus for the statements regarding the efficacy of safinamide in improving cognition, urinary and sexual functions. The statement on orthostatic hypotension obtained a negative consensus. The consistent and large agreement reached

in this Delphi panel perfectly reflects the perception of efficacy, safety and tolerability of safinamide as evident from pivotal trials and clinical practice and shows how these findings may guide movement disorders specialists in their clinical therapeutic approach. The impact of non-motor symptoms in PD is considerable, and management remains an unmet need. In this context, the ability of safinamide to impact some non-motor symptoms may represent the most promising and distinctive feature of this compound and deserves further investigations.

Nicastri, M., Giallini, I., Inguscio, B. M. S., Turchetta, R., Guerzoni, L., Cuda, D., ... Mancini, P. (2023).

**The influence of auditory selective attention on linguistic outcomes in deaf and hard of hearing children with cochlear implants.**

*Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2023 Jan;280(1):115-124. doi: 10.1007/s00405-022-07463-y. Epub 2022 Jul 13.

**Purpose:** Auditory selective attention (ASA) is crucial to focus on significant auditory stimuli without being distracted by irrelevant auditory signals and plays an important role in language development. The present study aimed to investigate the unique contribution of ASA to the linguistic levels achieved by a group of cochlear implanted (CI) children.

**Methods:** Thirty-four CI children with a median age of 10.05 years were tested using both the "Batteria per la Valutazione dell'Attenzione Uditiva e della Memoria di Lavoro Fonologica nell'età evolutiva-VAUM-ELF" to assess their ASA skills, and two Italian standardized tests to measure lexical and morphosyntactic skills. A regression analysis, including demographic and audiological variables, was conducted to assess the unique contribution of ASA to language skills.

**Results:** The percentages of CI children with adequate ASA performances ranged from 50 to 29.4%. Bilateral CI children performed better than their monolateral peers. ASA skills contributed significantly to linguistic skills, accounting alone for the 25% of the observed variance.

**Conclusions:** The present findings are clinically relevant as they highlight the importance to assess ASA skills as early as possible, reflecting their important role in language development. Using simple clinical tools, ASA skills could be studied at early developmental stages. This may provide additional information to outcomes from traditional auditory tests and may allow us to implement specific training programs that could positively contribute to the development of neural mechanisms of ASA and, consequently, induce improvements in language skills.

LeWitt PA, Stocchi F, Arkadir D, Caraco Y, Adar L, Perlstein I, Case R, Giladi N.

**The pharmacokinetics of continuous subcutaneous levodopa/carbidopa infusion: Findings from the ND0612 clinical development program.**

*Frontiers in Neurology*, 13, 1036068. doi:10.3389/fneur.2022.1036068

**Background:** While treatment with levodopa remains the cornerstone of Parkinson's disease (PD) management, chronic oral therapy is often associated with the development of motor complications, that correlate to fluctuating levodopa plasma concentrations, limiting its clinical utility. Continuous infusion is considered to be the optimal delivery route for treating PD patients with motor fluctuations, but current infusion systems require invasive surgery. Subcutaneous infusion of (SC) levodopa has the potential to provide a better tolerated and more convenient route of continuous levodopa delivery. ND0612 is in development as a combination product providing continuous levodopa/carbidopa via a minimally invasive, subcutaneous delivery system for PD patients experiencing motor response fluctuations. We present pharmacokinetic results from a series of studies that analyzed plasma concentrations after SC levodopa delivery with ND0612 to inform the clinical development program.

**Methods:** We performed a series of six Phase I and II studies to characterize the pharmacokinetics of levodopa and carbidopa derived from ND0612 infusion with/without adjunct oral therapy of the same ingredients. These studies were conducted in healthy volunteers and in PD patients experiencing motor response fluctuations while on their current levodopa therapy regimen.

Results: Taken together, the results demonstrate dose-proportionality dependent on rate of subcutaneous levodopa infusion leading to stable and sustained plasma concentrations of levodopa. Subcutaneous infusion of ND0612 administered with oral levodopa/carbidopa maintained near-constant, therapeutic levodopa plasma concentrations, thereby avoiding the troughs in levodopa plasma concentrations that are associated with OFF time in PD. The data generated in this series of studies also confirmed that a levodopa/carbidopa dose ratio of 8:1 would be the most reasonable choice for ND0612 development.

Conclusions: This series of clinical pharmacokinetic studies have demonstrated that ND0612, administered continuously with a levodopa concentration of 60 mg/ml combined with carbidopa 7.5 mg/ml, and complemented with oral levodopa/carbidopa, is suitable for 24 h continuous administration in patients with PD. The stable plasma concentrations of levodopa achieved predict utility of ND0612 as a parenteral formulation for achieving clinically useful delivery of levodopa for PD patients.

Rocha J-F, Ebersbach G, Lees A, Tolosa E, Ferreira JJ, Poewe W, Rascol O, Stocchi F, Antonini A, Magalhães D, Gama H, Soares-da-Silva P.

**The safety/tolerability of opicapone when used early in Parkinson's disease patients with levodopa-induced motor fluctuations: A post-hoc analysis of BIPARK-I and II.**

*Frontiers in Neurology, 13, 994114. doi:10.3389/fneur.2022.994114*

Introduction: Post-hoc analyses of the BIPARK-I and II trials previously demonstrated that opicapone (OPC) 50 mg was efficacious over the whole trajectory of motor fluctuation evolution in patients with Parkinson's disease (PD) and end-of-dose motor fluctuations, with enhanced efficacy in patients who were earlier vs. later in their disease course and levodopa treatment pathway. Complementary post-hoc analyses were performed to evaluate the safety/tolerability of OPC following the same pre-defined segmentation of the wide spectrum of duration of both PD and levodopa therapy, as well as of motor fluctuation history, in this patient population.

Materials and methods: Data from matching treatment arms in BIPARK-I and II were combined for the placebo (PLC) and OPC 50 mg groups and exploratory post-hoc analyses were performed to investigate the safety/tolerability of OPC 50 mg and PLC in 22 subgroups of patients who were in "earlier" vs. "later" stages of both their disease course (e.g., duration of PD <6 years vs. ≥6 years) and levodopa treatment pathway (e.g., levodopa treatment duration <4 vs. ≥4 years). Safety/tolerability assessments included evaluation of treatment-emergent adverse events (TEAEs).

Results: The Safety Set included 522 patients (PLC, n = 257; OPC 50 mg, n = 265). For OPC 50 mg, incidences of TEAEs, related TEAEs, related serious TEAEs, and related TEAEs leading to discontinuation were lower for patients in earlier vs. later stages of their disease course and levodopa treatment pathway in 86.4, 86.4, 63.6, and 68.2% of the 22 pairwise comparisons conducted, respectively (compared with 63.6, 77.3, 18.2, and 45.5%, respectively, in the 22 corresponding PLC comparisons).

Conclusion: OPC 50 mg was generally well-tolerated when used to treat patients with PD with end-of-dose fluctuations, with an even more favorable tolerability profile in patients who were earlier, as opposed to later, in their disease course and levodopa treatment pathway, further supporting its use as an early adjunct to levodopa in PD

Yener G, Hünerli-Gündüz D, Yıldırım E, Aktürk T, Başar-Eroğlu C, Bonanni L, Del Percio C, Farina F, Ferri R, Güntekin B, Hajós M, Ibáñez A, Jiang Y, Lizio R, Lopez S, Noce G, Parra MA, Randall F, Stocchi F, Babiloni

**Treatment effects on event-related EEG potentials and oscillations in Alzheimer's disease.**

*International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology, 177, 179–201. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.05.008*

Alzheimer's disease dementia (ADD) is the most diffuse neurodegenerative disorder belonging to mild cognitive impairment (MCI) and dementia in old persons. This disease is provoked by an abnormal accumulation of amyloid-beta and tauopathy proteins in the brain. Very recently, the first disease-modifying drug has been licensed with reserve (i.e., Aducanumab). Therefore, there is a need to identify

and use biomarkers probing the neurophysiological underpinnings of human cognitive functions to test the clinical efficacy of that drug. In this regard, event-related electroencephalographic potentials (ERPs) and oscillations (EROs) are promising candidates. Here, an Expert Panel from the Electrophysiology Professional Interest Area of the Alzheimer's Association and Global Brain Consortium reviewed the field literature on the effects of the most used symptomatic drug against ADD (i.e., Acetylcholinesterase inhibitors) on ERPs and EROs in ADD patients with MCI and dementia at the group level. The most convincing results were found in ADD patients. In those patients, Acetylcholinesterase inhibitors partially normalized ERP P300 peak latency and amplitude in oddball paradigms using visual stimuli. In these same paradigms, those drugs partially normalize ERO phase-locking at the theta band (4-7 Hz) and spectral coherence between electrode pairs at the gamma (around 40 Hz) band. These results are of great interest and may motivate multicentric, double-blind, randomized, and placebo-controlled clinical trials in MCI and ADD patients for final cross-validation.

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.**

*The New England Journal of Medicine*, 387(5), 408–420. doi:10.1056/NEJMoa2203395

**Background:** Aggregated  $\alpha$ -synuclein plays an important role in Parkinson's disease pathogenesis. Cinpanemab, a human-derived monoclonal antibody that binds to  $\alpha$ -synuclein, is being evaluated as a disease-modifying treatment for Parkinson's disease.

**Methods:** In a 52-week, multicenter, double-blind, phase 2 trial, we randomly assigned, in a 2:1:2:2 ratio, participants with early Parkinson's disease to receive intravenous infusions of placebo (control) or cinpanemab at a dose of 250 mg, 1250 mg, or 3500 mg every 4 weeks, followed by an active-treatment dose-blinded extension period for up to 112 weeks. The primary end points were the changes from baseline in the Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) total score (range, 0 to 236, with higher scores indicating worse performance) at weeks 52 and 72. Secondary end points included MDS-UPDRS subscale scores and striatal binding as assessed on dopamine transporter single-photon-emission computed tomography (DaT-SPECT).

**Results:** Of the 357 enrolled participants, 100 were assigned to the control group, 55 to the 250-mg cinpanemab group, 102 to the 1250-mg group, and 100 to the 3500-mg group. The trial was stopped after the week 72 interim analysis owing to lack of efficacy. The change to week 52 in the MDS-UPDRS score was 10.8 points in the control group, 10.5 points in the 250-mg group, 11.3 points in the 1250-mg group, and 10.9 points in the 3500-mg group (adjusted mean difference vs. control, -0.3 points [95% confidence interval {CI}, -4.9 to 4.3],  $P = 0.90$ ; 0.5 points [95% CI, -3.3 to 4.3],  $P = 0.80$ ; and 0.1 point [95% CI, -3.8 to 4.0],  $P = 0.97$ , respectively). The adjusted mean difference at 72 weeks between participants who received cinpanemab through 72 weeks and the pooled group of those who started cinpanemab at 52 weeks was -0.9 points (95% CI, -5.6 to 3.8) for the 250-mg dose, 0.6 points (95% CI, -3.3 to 4.4) for the 1250-mg dose, and -0.8 points (95% CI, -4.6 to 3.0) for the 3500-mg dose. Results for secondary end points were similar to those for the primary end points. DaT-SPECT imaging at week 52 showed no differences between the control group and any cinpanemab group. The most common adverse events with cinpanemab were headache, nasopharyngitis, and falls.

**Conclusions:** In participants with early Parkinson's disease, the effects of cinpanemab on clinical measures of disease progression and changes in DaT-SPECT imaging did not differ from those of placebo over a 52-week period. (Funded by Biogen; SPARK ClinicalTrials.gov number, NCT03318523.).

Pagano G, Taylor KI, Anzures-Cabrera J, Marchesi M, Simuni T, Marek K, Postuma RB, Pavese N, Stocchi F, Azulay JP, Mollenhauer B, López-Manzanares L, Russell DS, Boyd JT, Nicholas AP, Luquin MR, Hauser RA, Gasser T, Poewe W, Ricci B, Boulay A, Vogt A, Boess FG, Dukart J, D'Urso G, Finch R, Zanigni S, Monnet A, Pross N, Hahn A, Svoboda H, Britschgi M, Lipsmeier F, Volkova-Volkmar E, Lindemann M, Dziadek S, Holiga Š, Rukina D, Kustermann T, Kerchner GA, Fontoura

P, Umbricht D, Doody R, Nikolcheva T, Bonni A; PASADENA Investigators; Prasinezumab Study Group.

**Trial of prasinezumab in early-stage Parkinson's disease.**

*The New England Journal of Medicine*, 387(5), 421–432. doi:10.1056/NEJMoa2202867

**Background:** Aggregated  $\alpha$ -synuclein plays an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease. The monoclonal antibody prasinezumab, directed at aggregated  $\alpha$ -synuclein, is being studied for its effect on Parkinson's disease.

**Methods:** In this phase 2 trial, we randomly assigned participants with early-stage Parkinson's disease in a 1:1:1 ratio to receive intravenous placebo or prasinezumab at a dose of 1500 mg or 4500 mg every 4 weeks for 52 weeks. The primary end point was the change from baseline to week 52 in the sum of scores on parts I, II, and III of the Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS; range, 0 to 236, with higher scores indicating greater impairment). Secondary end points included the dopamine transporter levels in the putamen of the hemisphere ipsilateral to the clinically more affected side of the body, as measured by 123I-ioflupane single-photon-emission computed tomography (SPECT).

**Results:** A total of 316 participants were enrolled; 105 were assigned to receive placebo, 105 to receive 1500 mg of prasinezumab, and 106 to receive 4500 mg of prasinezumab. The baseline mean MDS-UPDRS scores were 32.0 in the placebo group, 31.5 in the 1500-mg group, and 30.8 in the 4500-mg group, and mean ( $\pm$ SE) changes from baseline to 52 weeks were  $9.4\pm 1.2$  in the placebo group,  $7.4\pm 1.2$  in the 1500-mg group (difference vs. placebo,  $-2.0$ ; 80% confidence interval [CI],  $-4.2$  to  $0.2$ ;  $P = 0.24$ ), and  $8.8\pm 1.2$  in the 4500-mg group (difference vs. placebo,  $-0.6$ ; 80% CI,  $-2.8$  to  $1.6$ ;  $P = 0.72$ ). There was no substantial difference between the active-treatment groups and the placebo group in dopamine transporter levels on SPECT. The results for most clinical secondary end points were similar in the active-treatment groups and the placebo group. Serious adverse events occurred in 6.7% of the participants in the 1500-mg group and in 7.5% of those in the 4500-mg group; infusion reactions occurred in 19.0% and 34.0%, respectively.

**Conclusions:** Prasinezumab therapy had no meaningful effect on global or imaging measures of Parkinson's disease progression as compared with placebo and was associated with infusion reactions. (Funded by F. Hoffmann-La Roche and Prothena Biosciences; PASADENA ClinicalTrials.gov number, NCT03100149.).

D'Antonio F, Boccia M, Di Vita A, Suppa A, Fabbrini A, Canevelli M, Caramia F, Fiorelli M, Guariglia C, Ferracuti S, de Lena C, Aarsland D, Ffytche D.

**Visual hallucinations in Lewy body disease: pathophysiological insights from phenomenology.**

*Journal of Neurology*, 269(7), 3636–3652. doi:10.1007/s00415-022-10983-6

Visual hallucinations (VH) in Lewy body disease (LBD) have a heterogeneous phenomenology classified into minor phenomena (MVH) and complex hallucinations (CVH). Mechanisms underpinning VH and their temporal aspects are largely unknown. According to the hodotopic model, we investigated whether changes in distinct cognitive domains and neural networks in the hallucination trait underpin temporal aspects of MVH and CVH in the hallucination state. 35 LBD patients with VH underwent a complete neuropsychological evaluation and resting-state fMRI. North-East-Visual-Hallucinations-Interview was used to assess their typical VH content, duration, and frequency. We found that MVH was not associated with cognitive impairment, while CVH was associated with impairments in visuo-perceptual processes, attention and visual abstract reasoning. In seed-to-seed functional connectivity (FC) analysis we identified functional couplings associated with MVH and CVH temporal severity (duration  $\times$  frequency), duration and frequency. MVH severity was negatively associated with FC between early visual areas (EVA) and ventral-visual-stream regions, and negatively associated with FC between brainstem and EVA, which may be linked to LBD brainstem neuropathology. CVH duration was positively associated with FC between ventral-visual stream and salience network (SN). CVH frequency was negatively associated with FC between DMN and SN. Functional alterations in distinct visual and attentional networks and their dynamic interaction in trait LBD hallucinators are linked to both the



phenomenology of state content and its temporal characteristics. Within a network, VH frequency and duration may be linked to different types of functional alterations: increased connectivity leading to sustained activity prolonging VH (duration) and decreased connectivity increasing dysregulated, spontaneous activity (frequency). These findings support the hodotopic hypothesis of VH and may reflect a link between VH phenomenology, LBD neuropathological progression and the involvement of specific neurotransmitter systems.

Del Percio C, Noce G, Lopez S, Tucci F, Carlin G, Lizio R, Musat AM, Soricelli A, Salvatore M, Ferri R, Nobili F, Arnaldi D, Famà F, Buttinelli C, Giubilei F, Marizzoni M, Güntekin B, Yener G, Stocchi F, Vacca L, Frisoni GB, Babiloni C.

**What a single electroencephalographic (EEG) channel can tell us about patients with dementia due to Alzheimer's disease.**

*International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 182, 169–181. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.10.011

Abnormalities in cortical sources of resting-state eyes-closed electroencephalographic (rsEEG) rhythms recorded by hospital settings (10-20 electrode montage) with 19 scalp electrodes provide useful markers of neurophysiological dysfunctions in the vigilance regulation in patients with Alzheimer's disease dementia (ADD). Here we tested whether these markers may be effective from a few scalp electrodes towards the use of low-cost recording devices. Clinical and rsEEG data acquired in hospital settings (10-20 electrode montage) from 88 ADD participants and 68 age-, education-, and sex-matched normal elderly controls (Nold) were available in an international Eurasian database. Standard spectral FFT analysis of rsEEG data for individual delta, theta, and alpha frequency bands was from C3-P3, C4-P4, P3-O1, and P4-O2 bipolar channels. As compared to the Nold group, the ADD group showed increased delta, theta, low-frequency alpha power density and decreased high-frequency alpha power density at all those bipolar channels. The highest classification accuracy between the ADD and Nold individuals reached 90 % (area under the receiver operating characteristic curve) using Alpha2/Theta power density computed at the C3-P3 bipolar channel. Standard rsEEG power density computed from a few posterior bipolar channels successfully classified Nold and ADD individuals, thus encouraging a massive prescreening of neurophysiological mechanisms underpinning the vigilance dysregulation in underserved old seniors.

Forni R, Jacot E, Ruoppolo G, Amitrano A, Ognà A.

**Resuming swallowing and oral feeding in tracheostomized COVID-19 patients: Experience of a Swiss COVID-Center and narrative literature review.**

*Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 10(4). doi:10.3390/medsci10040057

During the COVID-19 pandemic, percutaneous tracheostomy proved to be an effective option in the management of patients with prolonged periods of intubation. In fact, among other things, it allowed early discharge from ICUs and contributed to reducing overcrowding in intensive care settings, a central and critical point in the COVID pandemic. As a direct consequence, the management and the weaning of frail, tracheostomized and ventilated patients was diverted to sub-intensive or normal hospitalization wards. One central challenge in this setting is the resumption of swallowing and oral feeding, which require interdisciplinary management involving a phoniatician, ENT, pneumologist, and speech therapist. With this article, we aim to share the experience of a Swiss COVID-19 Center and to draw up a narrative review on the issues concerning the management of the tracheostomy cannula during swallowing resumption, integrating the most recent evidence from the literature with the clinical experiences of the professionals directly involved in the management of tracheostomized COVID-19 patients. In view of the heterogeneity of COVID-19 patients, we believe that the procedures described in the article are applicable to a larger population of patients undergoing tracheostomy weaning.

Gourdeau D, Potvin O, Archambault P, Chartrand-Lefebvre C, Dieumegarde L, Forghani R, Gagné C, Hains A, Hornstein D, Le H, Lemieux S, Lévesque MH, Martin D, Rosenbloom L, Tang A, Vecchio F, Yang I, Duchesne N, Duchesne S.

**Tracking and predicting COVID-19 radiological trajectory on chest X-rays using deep learning.** *Scientific Reports*, 12(1), 5616. doi:10.1038/s41598-022-09356-w

Radiological findings on chest X-ray (CXR) have shown to be essential for the proper management of COVID-19 patients as the maximum severity over the course of the disease is closely linked to the outcome. As such, evaluation of future severity from current CXR would be highly desirable. We trained a repurposed deep learning algorithm on the CheXnet open dataset (224,316 chest X-ray images of 65,240 unique patients) to extract features that mapped to radiological labels. We collected CXRs of COVID-19-positive patients from an open-source dataset (COVID-19 image data collection) and from a multi-institutional local ICU dataset. The data was grouped into pairs of sequential CXRs and were categorized into three categories: 'Worse', 'Stable', or 'Improved' on the basis of radiological evolution ascertained from images and reports. Classical machine-learning algorithms were trained on the deep learning extracted features to perform immediate severity evaluation and prediction of future radiological trajectory. Receiver operating characteristic analyses and Mann-Whitney tests were performed. Deep learning predictions between "Worse" and "Improved" outcome categories and for severity stratification were significantly different for three radiological signs and one diagnostic ('Consolidation', 'Lung Lesion', 'Pleural effusion' and 'Pneumonia'; all  $P < 0.05$ ). Features from the first CXR of each pair could correctly predict the outcome category between 'Worse' and 'Improved' cases with a 0.81 (0.74-0.83 95% CI) AUC in the open-access dataset and with a 0.66 (0.67-0.64 95% CI) AUC in the ICU dataset. Features extracted from the CXR could predict disease severity with a 52.3% accuracy in a 4-way classification. Severity evaluation trained on the COVID-19 image data collection had good out-of-distribution generalization when testing on the local dataset, with 81.6% of intubated ICU patients being classified as critically ill, and the predicted severity was correlated with the clinical outcome with a 0.639 AUC. CXR deep learning features show promise for classifying disease severity and trajectory. Once validated in studies incorporating clinical data and with larger sample sizes, this information may be considered to inform triage decisions.

De Marchis M, Cioeta M, Cannataro M.

**'what are the applications for remote rehabilitation management in cystic fibrosis?': A scoping review protocol.**

*International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(21), 14014. doi:10.3390/ijerph192114014

**Background:** Telemedicine is an effective, widely used strategy in the field of cystic fibrosis management. The objective of this scoping review is to summarize and analyze the scientific literature with the special focus on the tools and the strategies used in patients with a chronic disease, such as cystic fibrosis.

**Methods:** This scoping review will be performed in accordance with the Joanna Briggs Institute methodology. In this context, the planned scoping review is a research synthesis that will map the literature on the applications of telemedicine and telemonitoring to the management of cystic fibrosis, with the aim to identify key concepts in the research and work to be conducted that may impact clinical practice. Studies will be included if they meet the following population, concept, and context criteria: all patients with cystic fibrosis receiving treatment with the tools of telemedicine and telemonitoring. No study design, publication type, or data restrictions will be applied. MEDLINE, Scopus, CINAHL, Pedro, Embase, Web of Science, ACM Digital Library, Health Technology Assessment Database (HTA), and Cochrane Central will be searched up to September 2022.

**Discussion:** To the best of our knowledge, this will be the first scoping review to provide a comprehensive overview of the topic. The results could add meaningful information for future research and, especially, for clinical practice, when implementing telerehabilitation in cystic fibrosis treatment. Furthermore, we expect that our work may identify possible knowledge gaps on the topic. The results of

this research will be published in a peer-reviewed journal and will be presented at relevant international scientific events, such as in congress or meetings.

Valle G, Iberite F, Strauss I, D'Anna E, Granata G, Di Iorio R, Stieglitz T, Raspopovic S, Petrini FM, Rossini PM, Micera S.

**A psychometric platform to collect somatosensory sensations for neuroprosthetic use.**

*Frontiers in Medical Technology, 3, 619280. doi:10.3389/fmedt.2021.619280*

Somatosensory neuroprostheses exploit invasive and non-invasive feedback technologies to restore sensorimotor functions lost to disease or trauma. These devices use electrical stimulation to communicate sensory information to the brain. A sensation characterization procedure is thus necessary to determine the appropriate stimulation parameters and to establish a clear personalized map of the sensations that can be restored. Several questionnaires have been described in the literature to collect the quality, type, location, and intensity of the evoked sensations, but there is still no standard psychometric platform. Here, we propose a new psychometric system containing previously validated questionnaires on evoked sensations, which can be applied to any kind of somatosensory neuroprosthesis. The platform collects stimulation parameters used to elicit sensations and records subjects' percepts in terms of sensation location, type, quality, perceptual threshold, and intensity. It further collects data using standardized assessment questionnaires and scales, performs measurements over time, and collects phantom limb pain syndrome data. The psychometric platform is user-friendly and provides clinicians with all the information needed to assess the sensory feedback. The psychometric platform was validated with three trans-radial amputees. The platform was used to assess intraneural sensory feedback provided through implanted peripheral nerve interfaces. The proposed platform could act as a new standardized assessment toolbox to homogenize the reporting of results obtained with different technologies in the field of somatosensory neuroprosthetics.

Rodrigues IM, Lima AG, Santos AED, Santos ACA, do Nascimento LS, Serra MVCL, de Jesus Santos Pereira T, Barbosa FDS, Seixas VM, Monte-Silva K, da Silva Scipioni KRD, da Cruz DMC, Piscitelli D, Goffredo M, Bolivar Gois-Junior M, de Freitas Zanona A.

**A single session of virtual reality improved tiredness, shortness of breath, anxiety, depression and well-being in hospitalized individuals with COVID-19: A randomized clinical trial.**

*Journal of Personalized Medicine, 12(5), 829. doi:10.3390/jpm12050829*

**Background:** In 2020, the world was surprised by the spread and mass contamination of the new Coronavirus (COVID-19). COVID-19 produces symptoms ranging from a common cold to severe symptoms that can lead to death. Several strategies have been implemented to improve the well-being of patients during their hospitalization, and virtual reality (VR) has been used. However, whether patients hospitalized for COVID-19 can benefit from this intervention remains unclear. Therefore, this study aimed to investigate whether VR contributes to the control of pain symptoms, the sensation of dyspnea, perception of well-being, anxiety, and depression in patients hospitalized with COVID-19.

**Methods:** A randomized, double-blind clinical trial was designed. Patients underwent a single session of VR and usual care. The experimental group (n = 22) received VR content to promote relaxation, distraction, and stress relief, whereas the control group (n = 22) received non-specific VR content.

**Results:** The experimental group reported a significant decrease in tiredness, shortness of breath, anxiety, and an increase in the feeling of well-being, whereas the control group showed improvement only in the tiredness and anxiety.

**Conclusions:** VR is a resource that may improve the symptoms of tiredness, shortness of breath, anxiety, and depression in patients hospitalized with COVID-19. Future studies should investigate the effect of multiple VR sessions on individuals with COVID-19.

Rossini PM, Miraglia F, Vecchio F.

**Review of Commentary on comparison of machine learning-based approaches to predict the conversion to Alzheimer's disease from mild cognitive impairment.**

*Neuroscience*, 514, 141–142. doi:10.1016/j.neuroscience.2022.12.018

Paolucci T, de Sire A, Agostini F, Bernetti A, Salomè A, Di Piero V, Ammendolia A, Mangone M, Paoloni M.

**Efficacy of interoceptive and embodied rehabilitative training protocol in patients with mild multiple sclerosis: A randomized controlled trial.**

*Frontiers in Neurology*, 13, 1095180. doi:10.3389/fneur.2022.1095180

**Introduction:** The aim of this randomized controlled trial was to evaluate the effect of an embodied rehabilitative protocol, in improving interoceptive awareness respect balance and motor performance in patients with mild multiple sclerosis (pwMS).

**Methods:** In this study patients with relapsing-remitting multiple sclerosis were enrolled. The rehabilitative treatment group (TG) participated in an embodied physiotherapy program consisting of 8 one-hour sessions in groups of 4 patients at a time, 1 per week and 2 one-hour sessions of neuro-cognitive exercise in single session during the rehabilitation program. All pwMS underwent a clinical assessment to measure the interoception sense for the Multidimensional Assessment of Interoceptive Awareness scale, balance for the Tinetti Mobility test and stabilometry, quality of life for the Short Form Health Survey-12 and body image perception for Trunk Appearance Perception Scale and Body Image Scale. All previous scales and tests were performed at baseline (T0), at the end of treatment (T1) and after 2 months of follow up (T2).

**Results:** Sixty patients were enrolled and randomized into two groups: TG (n = 30), aged  $43.0 \pm 10.2$  years, and a control/waiting list (WLG) group (n = 30), aged  $40.7 \pm 10.4$  years. Statistically significant improvements in interoceptive awareness, body image perception, balance and quality of life were reported in TG versus WLG ( $p < 0.05$ ).

**Discussion:** This study suggests that enhancing interoceptive awareness could improve postural balance. Future studies with a larger sample of patients will be needed to better quantify the effects of an embodied rehabilitation.

Ferrario C, Condoluci C, Tarabini M, Galli M.

**Energy analysis of gait in patients with down syndrome.**

*Heliyon*, 8(11), e11702. doi:10.1016/j.heliyon.2022.e11702

**Background:** the primary aim of this study is to analyse the energy parameters of patients with Down syndrome compared to a control group and secondly to verify whether the sport activity leads to differences in energy expenditure.

**Methods:** 3 groups of subjects were identified: 8 healthy subjects and 147 subjects with Down syndrome, of whom 14 played sports at least once a week. An energy index was calculated, given by the ratio between potential and kinetic energy. Next, kinetic and potential energy parameters were extrapolated at 60% of the gait cycle (propulsion phase).

**Findings:** Down syndrome group was compared with the control group and emerged that the energy index was higher in the first one. No changes were found between Down syndrome and Down syndrome Sport groups. The analysis of the energy parameters showed that all parameters, except the medio-lateral kinetic energy, were higher in the control than in the Down syndrome groups. The potential energy, medio-lateral kinetic energy, and vertical were higher in the Down syndrome Sport group than in the Down syndrome group. The kinetic energy and the mean velocity were higher in the control group than in Down syndrome Sport group while the medio-lateral kinetic energy was lower.

**Interpretation:** sport modified the parameter of potential energy but not that of kinetic energy, which continued to be different compared to the healthy group and increased the oscillations in the medio-lateral plane, which were double compared to Down syndrome group. The increase in potential energy, found to be almost equal to that of control group, indicates an increase in vertical oscillations. This could

be because subjects who practise sports have stronger muscles that allow a greater push-off ability, which therefore increases their potential energy.

Antal A, Luber B, Brem AK, Bikson M, Brunoni AR, Cohen Kadosh R, Dubljević V, Fecteau S, Ferreri F, Flöel A, Hallett M, Hamilton RH, Herrmann CS, Lavidor M, Loo C, Lustenberger C, Machado S, Miniussi C, Moliadze V, Nitsche MA, Rossi S, Rossini PM, Santarnecchi E, Seeck M, Thut G, Turi Z, Ugawa Y, Venkatasubramanian G, Wenderoth N, Wexler A, Ziemann U, Paulus W.

#### **Non-invasive brain stimulation and neuroenhancement.**

*Clinical Neurophysiology Practice*, 7, 146–165. doi:10.1016/j.cnp.2022.05.002

Attempts to enhance human memory and learning ability have a long tradition in science. This topic has recently gained substantial attention because of the increasing percentage of older individuals worldwide and the predicted rise of age-associated cognitive decline in brain functions. Transcranial brain stimulation methods, such as transcranial magnetic (TMS) and transcranial electric (tES) stimulation, have been extensively used in an effort to improve cognitive functions in humans. Here we summarize the available data on low-intensity tES for this purpose, in comparison to repetitive TMS and some pharmacological agents, such as caffeine and nicotine. There is no single area in the brain stimulation field in which only positive outcomes have been reported. For self-directed tES devices, how to restrict variability with regard to efficacy is an essential aspect of device design and function. As with any technique, reproducible outcomes depend on the equipment and how well this is matched to the experience and skill of the operator. For self-administered non-invasive brain stimulation, this requires device designs that rigorously incorporate human operator factors. The wide parameter space of non-invasive brain stimulation, including dose (e.g., duration, intensity (current density), number of repetitions), inclusion/exclusion (e.g., subject's age), and homeostatic effects, administration of tasks before and during stimulation, and, most importantly, placebo or nocebo effects, have to be taken into account. The outcomes of stimulation are expected to depend on these parameters and should be strictly controlled. The consensus among experts is that low-intensity tES is safe as long as tested and accepted protocols (including, for example, dose, inclusion/exclusion) are followed and devices are used which follow established engineering risk-management procedures. Devices and protocols that allow stimulation outside these parameters cannot claim to be "safe" where they are applying stimulation beyond that examined in published studies that also investigated potential side effects. Brain stimulation devices marketed for consumer use are distinct from medical devices because they do not make medical claims and are therefore not necessarily subject to the same level of regulation as medical devices (i.e., by government agencies tasked with regulating medical devices). Manufacturers must follow ethical and best practices in marketing tES stimulators, including not misleading users by referencing effects from human trials using devices and protocols not similar to theirs.

Geri T, Botticchio A, Rossetini G, Pournajaf S, Pellicciari L, Di Antonio S, & Castaldo, M.

#### **Pressure pain threshold of the upper trapezius trigger point: A systematic review with meta-analysis of baseline values and their modification after physical therapy.**

*Journal of Clinical Medicine*, 11(23), 7243. doi:10.3390/jcm11237243

**Background:** Myofascial trigger points (TrP) are diagnosed upon the presence of clinical signs among which hypersensitivity is considered one of the most important. The detection of the pressure pain threshold (PPT) is used to quantify the degree of hypersensitivity. However, there is a lack of normative data about how hypersensitive a TrP is. Therefore, the objective was to quantify the PPT for myofascial TrP in the upper trapezius muscle and its modification after manual or instrumental physical therapy interventions.

**Methods:** A systematic review and meta-analysis were conducted among three databases (MEDLINE, Cochrane Library, and PEDro). Two independent reviewers conducted the electronic search and assessed the methodological quality of the included studies.

**Results:** Eleven studies with a high-risk bias indicated that the PPT at TrP sites was 105.11 kPa lower (95% CI: -148.93; -61.28) at active TrP sites (Chi-squared = 1.07, df = 1 (p = 0.30), I<sup>2</sup> = 7%) compared to the PPT of the upper trapezius muscles of healthy subjects. In addition, the PPT of TrP was also lower than the reference values coming from the pain-free population. Moreover, the PPT increased after both manual and instrumental treatment by 28.36 kPa (95% CI: 10.75; 45.96) and 75.49 kPa (95% CI: 18.02; 132.95), respectively.

**Conclusions:** The results of the present study show that TrP has a decreased PPT when compared to healthy muscles and that physical therapy may increase the PPT. However, the clinical relevance of this decreased PPT

needs to be further elucidated. Further, the high risk of bias in all the retrieved studies undermines the validity of the results.

Angilecchia D, Stano F, Signorelli M, Giovannico G, Pournajaf S, Pellicciari L.

**Psychometric properties of the Italian version of the Forgotten Joint Score in patients with total hip arthroplasty. International Journal of Rehabilitation Research. Internationale Zeitschrift Für Rehabilitationsforschung.**

*Revue Internationale de Recherches de Readaptation*, 45(4), 343–349.  
doi:10.1097/MRR.0000000000000549

Total hip arthroplasty (THA) surgeries are increasing; to assess quality of life after THA, an instrument that considers patient's perspective on surgical outcomes is necessary. The objective of this study is to assess the psychometric properties of the Italian version of the Forgotten Joint Score (FJS-I) in patients with THA. The FJS-I was administered to 111 patients with THA, as well as the Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC), Numerical Pain Rating Scale (NPRS), and the EuroQol 5D-5L (EQ-5D-5L). Structural validity [confirmatory factor analysis (CFA)], internal consistency (Cronbach's alpha), test-retest reliability [intraclass correlation coefficient (ICC 2,1)], measurement error [standard error of the measurement (SEM)], and construct validity (hypothesis testing with correlation of the WOMAC, NPRS, and EQ-5D-5L) were assessed. In addition, the minimal detectable change (MDC) was computed. The result of CFA confirmed the one-factor structure. Internal consistency was supported ( $\alpha = 0.944$ ). A high test-retest reliability (ICC = 0.958; 95% confidence interval, 0.914-0.980) was found with an SEM and an MDC of 5.3 and 16.6 points, respectively. The a-priori hypotheses were fully met, determining the construct validity to be satisfactory. Psychometric properties of the FJS-I were confirmed, and it can be used for single-person assessment. Further research is suggested to refine its structural validity.

Frölich L, van der Flier W M, Gustavsson A, Rossini PM, Holzapfel D.

**Response to the letter titled 'The conundrum of the AD continuum'.**

*Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(1), 373–374.  
doi:10.1002/alz.12784

Franceschini M, Ottaviani M, Romano P, Goffredo M, Pournajaf S, Lofrumento M, Proietti S, Sterpi I, Tricomi E, Tropea P, Corbo M, Fadiga L, Infarinato F.

**The reaching phase of feeding and self-care actions optimizes action observation effects in chronic stroke subjects.**

*Neurorehabilitation and Neural Repair*, 36(9), 574–586. doi:10.1177/15459683221110884

Background: The Action Observation Therapy (AOT) is a well-established post-stroke rehabilitation treatment based on the theoretical framework of the Mirror Neuron System (MNS) activation. However, AOT protocols are still heterogeneous in terms of video contents of observed actions.

Objective: The aim of this study was to analyze electroencephalographic (EEG) recordings in stroke patients during the observation of different videos of task-specific upper limb movements, and to define which category of actions can elicit a stronger cortical activation in the observer's brain.

Methods: Signals were analyzed from 19 chronic stroke subjects observing customized videos that represented 3 different categories of upper limb actions: Finalized Actions, Non-Finalized Actions, and Control Videos. The Event-Related Desynchronization in the  $\mu$  and  $\beta$  bands was chosen to identify the involvement of the cerebral cortex: the area of the normalized power spectral density was calculated for each category and, deepening, for the reaching and completion sub-phases of Finalized Actions. For descriptive purposes, the time course of averaged signal power was described. The Kruskal-Wallis test ( $P < .05$ ) was applied.

Results: The analysis showed a greater desynchronization when subjects observed Finalized Actions with respect to Non-Finalized in all recorded areas; Control videos provoked a synchronization in the same

areas and frequency bands. The reaching phase of feeding and self-care actions evoked a greater suppression both in  $\mu$  and  $\beta$  bands.

Conclusions: The observation of finalized arm movements seems to elicit the strongest activation of the MNS in chronic stroke patients. This finding may help the clinicians to design future AOT-based stroke rehabilitation protocols.

Ercoli T, Barbato F, Cuffaro L, Iodice F, Romoli M, Tedeschi G, Berardelli A, Di Lorenzo F, Bombaci A; SlgN.

**The future of neurology after the COVID-19 pandemic according to neurology residents.** *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 44(1), 9–12. doi:10.1007/s10072-022-06450-9

Background: The ongoing COVID-19 pandemic has resulted in significant changes in the delivery of neurological disease care and in neurology training in academic departments.

Objective: We aimed to investigate how neurology residents viewed the future of neurology after the COVID-19 pandemic with regard to three main aspects: (i) organization of neurological activity, (ii) patient care, and (iii) funding availability for neurological diseases.

Methods: We surveyed Italian neurology residents in order to investigate how they viewed the future of neurology after the COVID-19 pandemic.

Results: Responses were collected from 254 residents who reported: a high risk of reduction of hospital neurological beds, of worsening of the quality of neurological patient management, and of lack of funding for neurological care and research.

Conclusion: The survey results demonstrate the views of future neurologists regarding the direction of neurology after the COVID-19 emergency. It is important to focus on these aspects in order to adapt neurology training to the societal changes introduced by the pandemic, and to safeguard the essential role of neurology in the management and prevention of chronic degenerative illnesses and emergencies.

Pournajaf, S., Goffredo, M., Pellicciari, L., Piscitelli, D., Criscuolo, S., Le Pera, D., ... Franceschini, M. (2022).

**Effect of balance training using virtual reality-based serious games in individuals with total knee replacement: A randomized controlled trial.**

*Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 65(6), 101609. doi:10.1016/j.rehab.2021.101609

Background: Virtual reality (VR) and serious games (SGs) are widespread in rehabilitation for many orthopedic and neurological diseases. However, few studies have addressed the effects of rehabilitation with VR-based SGs on clinical, gait, and postural outcomes in individuals with total knee replacement (TKR).

Objective: The primary objective was the efficacy of balance training using non-immersive VR-based SGs compared to conventional therapy in TKR patients on the Time Up and Go test. Secondary objectives included the efficacy on clinical, gait, and postural outcomes.

Methods: We randomly allocated 56 individuals with unilateral TKR to the experimental group (EG) or control group (CG) for 15 sessions (45 min; 5 times per week) of non-immersive VR-based SGs or conventional balance training, respectively. The primary outcome was functional mobility measured by the Timed Up and Go test; secondary outcomes were walking speed, pain intensity, lower-limb muscular strength, independence in activities of daily living as well as gait and postural parameters.

Results: We found significant within-group differences in all clinical outcomes and in a subset of gait ( $p < 0.0001$ ) and postural ( $p \leq 0.05$ ) parameters. Analysis of the stance time of the affected limb revealed significant between-group differences ( $p = 0.022$ ): post-hoc analysis revealed within-group differences in the EG ( $p = 0.002$ ) but not CG ( $p = 0.834$ ). We found no significant between-group differences in other outcomes.

Conclusions: Balance training with non-immersive VR-based SGs can improve clinical, gait, and postural outcomes in TKR patients. It was not superior to the CG findings but could be considered an alternative to the conventional approach and can be added to a regular rehabilitation program in TKR patients. The EG had a more physiological duration of the gait stance phase at the end of the treatment than the CG.

Xu J, Schoenfeld MA, Rossini PM, Tatlisumak T, Nürnberger A, Antal A,

**Adaptive and maladaptive brain functional network reorganization after stroke in hemianopia patients: An electroencephalogram-tracking study.**

*Brain Connectivity*, 12(8), 725–739. doi:10.1089/brain.2021.0145

Objective: Hemianopia after occipital stroke is believed to be mainly due to local damage at or near the lesion site. However, magnetic resonance imaging studies suggest functional connectivity network (FCN) reorganization also in distant brain regions. Because it is unclear whether reorganization is adaptive or maladaptive, compensating for, or aggravating vision loss, we characterized FCNs electrophysiologically to explore local and global brain plasticity and correlated FCN reorganization with visual performance. Methods: Resting-state electroencephalography (EEG) was recorded in chronic, unilateral stroke patients and healthy age-matched controls (n = 24 each). This study was approved by the local ethics committee. The correlation of oscillating EEG activity was calculated with the imaginary part of coherence between pairs of regions of interest, and FCN graph theory metrics (degree, strength, clustering coefficient) were correlated with stimulus detection and reaction time. Results: Stroke brains showed altered FCNs in the alpha- and low beta-band in numerous occipital, temporal brain structures. On a global level, FCN had a less efficient network organization whereas on the local level node networks were reorganized especially in the intact hemisphere. Here, the occipital network was 58% more rigid (with a more "regular" network structure) whereas the temporal network was 32% more efficient (showing greater "small-worldness"), both of which correlated with worse or better visual processing, respectively. Conclusions: Occipital stroke is associated with both local and global FCN reorganization, but this can be both adaptive and maladaptive. We propose that the more "regular" FCN structure in the intact visual cortex indicates maladaptive plasticity, where less processing efficacy with reduced signal/noise ratio may cause the perceptual deficits in the intact visual field (VF). In contrast, reorganization in intact temporal brain regions is presumably adaptive, possibly supporting enhanced peripheral movement perception.

Pappalettera C, Miraglia F, Cotelli M, Rossini PM, Vecchio F.

**Analysis of complexity in the EEG activity of Parkinson's disease patients by means of approximate entropy.**

*GeroScience*, 44(3), 1599–1607. doi:10.1007/s11357-022-00552-0

The objective of the present study is to explore the brain resting state differences between Parkinson's disease (PD) patients and age- and gender-matched healthy controls (elderly) in terms of complexity of electroencephalographic (EEG) signals. One non-linear approach to determine the complexity of EEG is the entropy. In this pilot study, 28 resting state EEGs were analyzed from 13 PD patients and 15 elderly subjects, applying approximate entropy (ApEn) analysis to EEGs in ten regions of interest (ROIs), five for each brain hemisphere (frontal, central, parietal, occipital, temporal). Results showed that PD patients presented statistically higher ApEn values than elderly confirming the hypothesis that PD is characterized by a remarkable modification of brain complexity and globally modifies the underlying organization of the brain. The higher-than-normal entropy of PD patients may describe a condition of low order and consequently low information flow due to an alteration of cortical functioning and processing of information. Understanding the dynamics of brain applying ApEn could be a useful tool to help in diagnosis, follow the progression of Parkinson's disease, and set up personalized rehabilitation programs.

Pappalettera C, Cacciotti A, Nucci L, Miraglia F, Rossini PM, Vecchio F.



**Approximate entropy analysis across electroencephalographic rhythmic frequency bands during physiological aging of human brain.**

*GeroScience*, 45(2), 1131–1145. doi:10.1007/s11357-022-00710-4

Aging is the inevitable biological process that results in a progressive structural and functional decline associated with alterations in the resting/task-related brain activity, morphology, plasticity, and functionality. In the present study, we analyzed the effects of physiological aging on the human brain through entropy measures of electroencephalographic (EEG) signals. One hundred sixty-one participants were recruited and divided according to their age into young ( $n = 72$ ) and elderly ( $n = 89$ ) groups. Approximate entropy (ApEn) values were calculated in each participant for each EEG recording channel and both for the total EEG spectrum and for each of the main EEG frequency rhythms: delta (2-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha 1 (8-11 Hz), alpha 2 (11-13 Hz), beta 1 (13-20 Hz), beta 2 (20-30 Hz), and gamma (30-45 Hz), to identify eventual statistical differences between young and elderly. To demonstrate that the ApEn represents the age-related brain changes, the computed ApEn values were used as features in an age-related classification of subjects (young vs elderly), through linear, quadratic, and cubic support vector machine (SVM). Topographic maps of the statistical results showed statistically significant difference between the ApEn values of the two groups found in the total spectrum and in delta, theta, beta 2, and gamma. The classifiers (linear, quadratic, and cubic SVMs) revealed high levels of accuracy (respectively  $93.20 \pm 0.37$ ,  $93.16 \pm 0.30$ ,  $90.62 \pm 0.62$ ) and area under the curve (respectively 0.95, 0.94, 0.93). ApEn seems to be a powerful, very sensitive-specific measure for the study of cognitive decline and global cortical alteration/degeneration in the elderly EEG activity.

Abellana-Pérez K, Martin-Trias P, Cassé-Perrot C, Vaqué-Alcázar L, Lanteaume L, Solana E, Babiloni C, Lizio R, Junqué C, Bargalló N, Rossini PM, Micallef J, Truillet R, Charles E, Jouve E, Bordet R, Santamaria J, Rossi S, Pascual-Leone A, Blin O, Richardson J, Jovicich J, Bartrés-Faz D.

**BDNF Val66Met gene polymorphism modulates brain activity following rTMS-induced memory impairment.**

*Scientific Reports*, 12(1), 176. doi:10.1038/s41598-021-04175-x

The BDNF Val66Met gene polymorphism is a relevant factor explaining inter-individual differences to TMS responses in studies of the motor system. However, whether this variant also contributes to TMS-induced memory effects, as well as their underlying brain mechanisms, remains unexplored. In this investigation, we applied rTMS during encoding of a visual memory task either over the left frontal cortex (LFC; experimental condition) or the cranial vertex (control condition). Subsequently, individuals underwent a recognition memory phase during a functional MRI acquisition. We included 43 young volunteers and classified them as 19 Met allele carriers and 24 as Val/Val individuals. The results revealed that rTMS delivered over LFC compared to vertex stimulation resulted in reduced memory performance only amongst Val/Val allele carriers. This genetic group also exhibited greater fMRI brain activity during memory recognition, mainly over frontal regions, which was positively associated with cognitive performance. We concluded that BDNF Val66Met gene polymorphism, known to exert a significant effect on neuroplasticity, modulates the impact of rTMS both at the cognitive as well as at the associated brain networks expression levels. This data provides new insights on the brain mechanisms explaining cognitive inter-individual differences to TMS, and may inform future, more individually-tailored rTMS interventions.

Miraglia F, Vecchio F, Pappalettera C, Nucci L, Cotelli M, Judica E, Ferreri F, Rossini PMR.

**Brain connectivity and graph theory analysis in Alzheimer's and Parkinson's disease: The contribution of electrophysiological techniques.**

*Brain Sciences*, 12(3), 402. doi:10.3390/brainsci12030402

In recent years, applications of the network science to electrophysiological data have increased as electrophysiological techniques are not only relatively low cost, largely available on the territory and

non-invasive, but also potential tools for large population screening. One of the emergent methods for the study of functional connectivity in electrophysiological recordings is graph theory: it allows to describe the brain through a mathematic model, the graph, and provides a simple representation of a complex system. As Alzheimer's and Parkinson's disease are associated with synaptic disruptions and changes in the strength of functional connectivity, they can be well described by functional connectivity analysis computed via graph theory. The aim of the present review is to provide an overview of the most recent applications of the graph theory to electrophysiological data in the two by far most frequent neurodegenerative disorders, Alzheimer's and Parkinson's diseases.

Costa C, Vecchio F, Romoli M, Miraglia F, Nardi Cesarini E, Alù F, Calabresi P, Rossini PM.

**Cognitive decline risk stratification in people with late-onset epilepsy of unknown etiology: An electroencephalographic connectivity and graph theory pilot study.**

*Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 88(3), 893–901. doi:10.3233/JAD-210350

Background: Although people with late onset epilepsy of unknown etiology (LOEU) are at higher risk of cognitive decline compared to the general population, we still lack affordable tools to predict and stratify their risk of dementia.

Objective: This pilot-study investigates the potential application of electroencephalography (EEG) network small-world (SW) properties in predicting cognitive decline among patients with LOEU.

Methods: People diagnosed with LOEU and normal cognitive examination at the time of epilepsy diagnosis were included. Cerebrospinal fluid biomarkers, brain imaging, and neuropsychological assessment were performed at the time of epilepsy diagnosis. Baseline EEG was analyzed for SW properties. Patients were followed-up over time with neuropsychological testing to define the trajectory of cognitive decline.

Results: Over 5.1 years of follow-up, among 24 patients diagnosed with LOEU, 62.5% were female, mean age was 65.3 years, thirteen developed mild cognitive impairment (MCI), and four developed dementia. Patients with LOEU developing MCI had lower values of SW coefficients in the delta ( $p = 0.03$ ) band and higher SW values in the alpha frequency bands ( $p = 0.02$ ) compared to patients having normal cognition at last follow-up. The two separate ANOVAs, for low and alpha bands, confirmed an interaction between SW and cognitive decline at follow-up. A similar gradient was confirmed for patients developing dementia compared to those with normal cognitive function as well as to those developing MCI.

Conclusion: Baseline EEG analysis through SW is worth investigating as an affordable, widely available tool to stratify LOEU patients for their risk of cognitive decline.

Vecchio, F. (2022).

**Cognitive training and neuromodulation for Alzheimer treatment.**

*Aging*, 14(9), 3722–3723. doi:10.18632/aging.204044

Porcaro C, Vecchio F, Miraglia F, Zito G, Rossini PM.

**Dynamics of the 'cognitive' brain wave P3b at rest for Alzheimer dementia prediction in mild cognitive impairment.**

*International Journal of Neural Systems*, 32(5), 2250022. doi:10.1142/S0129065722500228

Alzheimer's disease (AD) is the most common cause of dementia that involves a progressive and irrevocable decline in cognitive abilities and social behavior, thus annihilating the patient's autonomy. The theoretical assumption that disease-modifying drugs are most effective in the early stages hopefully in the prodromal stage called mild cognitive impairment (MCI) urgently pushes toward the identification of robust and individualized markers of cognitive decline to establish an early pharmacological intervention. This requires the combination of well-established neural mechanisms and the development of increasingly sensitive methodologies. Among the neurophysiological markers of attention and cognition, one of the sub-components of the 'cognitive brain wave' P300 recordable in an odd-ball paradigm -namely the P3b- is extensively regarded as a sensitive indicator of cognitive

performance. Several studies have reliably shown that changes in the amplitude and latency of the P3b are strongly related to cognitive decline and aging both healthy and pathological. Here, we used a P3b spatial filter to enhance the electroencephalographic (EEG) characteristics underlying 175 subjects divided into 135 MCI subjects, 20 elderly controls (EC), and 20 young volunteers (Y). The Y group served to extract the P3b spatial filter from EEG data, which was later applied to the other groups during resting conditions with eyes open and without being asked to perform any task. The group of 135 MCI subjects could be divided into two subgroups at the end of a month follow-up: 75 with stable MCI (MCI-S, not converted to AD), 60 converted to AD (MCI-C). The P3b spatial filter was built by means of a signal processing method called Functional Source Separation (FSS), which increases signal-to-noise ratio by using a weighted sum of all EEG recording channels rather than relying on a single, or a small sub-set, of channels. A clear difference was observed for the P3b dynamics at rest between groups. Moreover, a machine learning approach showed that P3b at rest could correctly distinguish MCI from EC (80.6% accuracy) and MCI-S from MCI-C (74.1% accuracy), with an accuracy as high as 93.8% in discriminating between MCI-C and EC. Finally, a comparison of the Bayes factor revealed that the group differences among MCI-S and MCI-C were 138 times more likely to be detected using the P3b dynamics compared with the best performing single electrode (Pz) approach. In conclusion, we propose that P3b as measured through spatial filters can be safely regarded as a simple and sensitive marker to predict the conversion from an MCI to AD status eventually combined with other non-neurophysiological biomarkers for a more precise definition of dementia having neuropathological Alzheimer characteristics.

Rossini PM, Miraglia F, Vecchio F.

**Early dementia diagnosis, MCI-to-dementia risk prediction, and the role of machine learning methods for feature extraction from integrated biomarkers, in particular for EEG signal analysis.**

*Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 18(12), 2699–2706. doi:10.1002/alz.12645

Introduction: Dementia in its various forms represents one of the most frightening emergencies for the aging population. Cognitive decline-including Alzheimer's disease (AD) dementia-does not develop in few days; disease mechanisms act progressively for several years before clinical evidence.

Methods: A preclinical stage, characterized by measurable cognitive impairment, but not overt dementia, is represented by mild cognitive impairment (MCI), which progresses to-or, more accurately, is already in a prodromal form of-AD in about half cases; people with MCI are therefore considered the population at risk for AD deserving special attention for validating screening methods.

Results: Graph analysis tools, combined with machine learning methods, represent an interesting probe to identify the distinctive features of physiological/pathological brain aging focusing on functional connectivity networks evaluated on electroencephalographic data and neuropsychological/imaging/genetic/metabolic/cerebrospinal fluid/blood biomarkers.

Discussion: On clinical data, this innovative approach for early diagnosis might provide more insight into pathophysiological processes underlying degenerative changes, as well as toward a personalized risk evaluation for pharmacological, nonpharmacological, and rehabilitation treatments.

Ferreri F, Miraglia F, Vecchio F, Manzo N, Cotelli M, Judica E, Rossini PM.

**Electroencephalographic hallmarks of Alzheimer's disease.**

*International Journal of Psychophysiology: Official Journal of the International Organization of Psychophysiology*, 181, 85–94. doi:10.1016/j.ijpsycho.2022.08.005

In the human brain, physiological aging is characterized by progressive neuronal loss, leading to disruption of synapses and to a degree of failure in neurotransmission and information flow. However, there is increasing evidence to support the notion that the aged brain has a remarkable level of resilience (i.s. ability to reorganize itself), with the aim of preserving its physiological activity. It is therefore of paramount interest to develop objective markers able to characterize the biological

processes underlying brain aging in the intact human, and to distinguish them from brain degeneration associated to age-related neurological progressive diseases like Alzheimer's disease. EEG, alone and combined with transcranial magnetic stimulation (TMS-EEG), is particularly suited to this aim, due to the functional nature of the information provided, and thanks to the ease with which it can be integrated in ecological scenarios including behavioral tasks. In this review, we aimed to provide the reader with updated information about the role of modern methods of EEG and TMS-EEG analysis in the investigation of physiological brain aging and Alzheimer's disease. In particular, we focused on data about cortical connectivity obtained by using readouts such graph theory network brain organization and architecture, and transcranial evoked potentials (TEPs) during TMS-EEG. Overall, findings in the literature support an important potential contribution of such neurophysiological techniques to the understanding of the mechanisms underlying normal brain aging and the early (prodromal/pre-symptomatic) stages of dementia.

Gustavsson A, Norton N, Fast T, Frölich L, Georges J, Holzapfel D, Kirabali T, Krolak-Salmon P, Rossini PM, Ferretti MT, Lanman L, Santucci Chadha A, van der Flier WM.

**Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum.** *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 19(2), 658–670. doi:10.1002/alz.12694

**Introduction:** Global estimates on numbers of persons in early stages of Alzheimer's disease (AD), including prodromal and preclinical, are lacking, yet are needed to inform policy decisions on preventive measures and planning for future therapies targeting AD pathology.

**Methods:** We synthesized the literature on prevalence across the AD continuum and derived a model estimating the number of persons, stratified by 5-year age groups, sex, and disease stage (AD dementia, prodromal AD, and preclinical AD).

**Results:** The global number of persons with AD dementia, prodromal AD, and preclinical AD were estimated at 32, 69, and 315 million, respectively. Together they constituted 416 million across the AD continuum, or 22% of all persons aged 50 and above.

**Discussion:** Considering predementia stages, the number of persons with AD is much larger than conveyed in available literature. Our estimates are uncertain, especially for predementia stages in low- and middle-income regions where biomarker studies are missing.

Vecchio F, Miraglia F, Alù F, Judica E, Cotelli M, Pellicciari MC, Rossini PM.

**Human brain networks in physiological and pathological aging: Reproducibility of electroencephalogram graph theoretical analysis in cortical connectivity.** *Brain Connectivity*, 12(1), 41–51. doi:10.1089/brain.2020.0824

**Background:** Physiological and pathological brain aging plays a central role in brain network modulation. The aim of the present article was to assess the stability of a proposed method for evaluation of small-world (SW) characteristics for the study of the human connectome.

**Subjects and Methods:** Eighty subjects were recruited: 36 young healthy controls, 32 elderly healthy controls, and 12 patients affected by Alzheimer's disease (AD). Electroencephalograms (EEGs) were recorded during six separate sessions (480 recordings) at an average intersession interval of  $3.8 \pm 0.2$  days. We applied graph theory functions to the weighted and undirected networks obtained by the lagged linear coherence estimated by exact low-resolution electromagnetic tomography (eLORETA). We explored the following frequency bands: delta (2-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha 1 (8-10.5 Hz), alpha 2 (10.5-13 Hz), beta 1 (13-20 Hz), beta 2 (20-30 Hz), and gamma (30-40 Hz).

**Results:** The proposed method for evaluation of SW characteristics exhibited good reproducibility and stability. Furthermore, results showed the pattern, Young>Elderly>AD, in low-frequency delta and theta bands and vice versa in the higher alpha band. Finally, a correlation with age was confirmed in healthy subjects, showing that the older the age, the higher the SW values for alpha 2.

**Discussion:** Evidences from the present study confirm the stability of the SW index and suggest that the analysis of connectivity patterns evaluated from EEGs can be supported by the graph theory. The

proposed method for evaluation of SW characteristics has shown good reproducibility and stability. This technique, applied to patient data, could provide more information on the pathophysiological processes underlying age-related brain disconnection, as well as on administration of rehabilitation treatments at the right time, which could allow patients to avoid unnecessary interventions. Impact statement The graph analysis tools described in this study represent an interesting approach to study the distinctive characteristics of physiological aging by focusing on functional connectivity networks. The proposed method for evaluation of small-world characteristics has shown good reproducibility and stability. This technique, applied to patient data, could provide more information on the pathophysiological processes underlying age-related brain disconnection, as well as on delivery of rehabilitation treatments at the right time, which could allow patients to avoid unnecessary interventions.

Vecchio F, Quaranta D, Miraglia F, Pappalettera C, Di Iorio R, L'Abbate F, Rossini, P. M.

**Neuronavigated Magnetic Stimulation combined with cognitive training for Alzheimer's patients: an EEG graph study.**

*GeroScience*, 44(1), 159–172. doi:10.1007/s11357-021-00508-w

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disorder in elderly subjects. Recent studies verified the effects of cognitive training combined with repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS-COG) in AD patients. Here, we analyzed neuropsychological and neurophysiological data, derived from electroencephalography (EEG), to evaluate the effects of a 6-week protocol of rTMS-COG in 72 AD. We designed a randomized, double-blind, sham-controlled trial to evaluate efficacy of rTMS on 6 brain regions obtained by an individual MRI combined with COG related to brain areas to stimulate (i.e., syntax and grammar tasks, comprehension of lexical meaning and categorization tasks, action naming, object naming, spatial memory, spatial attention). Patients underwent neuropsychological and EEG examination before (T0), after treatment (T1), and after 40 weeks (T2), to evaluate the effects of rehabilitation therapy. "Small World" (SW) graph approach was introduced allowing us to model the architecture of brain connectivity in order to correlate it with cognitive improvements. We found that following 6 weeks of intensive daily treatment the immediate results showed an improvement in cognitive scales among AD patients. SW present no differences before and after the treatment, whereas a crucial SW modulation emerges at 40-week follow-up, emphasizing the importance of rTMS-COG rehabilitation treatment for AD. Additional results demonstrated that the delta and alpha1 SW seem to be diagnostic biomarkers of AD, whereas alpha2 SW might represent a prognostic biomarker of cognitive recovery. Derived EEG parameters can be awarded the role of diagnostic and predictive biomarkers of AD progression, and rTMS-COG can be regarded as a potentially useful treatment for AD.

Di Iorio R, Rossi S, Rossini PM.

**One century of healing currents into the brain from the scalp: From electroconvulsive therapy to repetitive transcranial magnetic stimulation for neuropsychiatric disorders.**

*Clinical Neurophysiology: Official Journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology*, 133, 145–151. doi:10.1016/j.clinph.2021.10.014

Electroconvulsive therapy (ECT) was applied for the first time in humans in 1938: after 80 years, it remains conceptually similar today except for modifications of the original protocol aimed to reduce adverse effects (as persistent memory deficits) without losing clinical efficacy. We illustrate the stages of development as well as ups and downs of ECT use in the last eighty years, and the impact that it still maintains for treatment of certain psychiatric conditions. Targeted, individualized and safe noninvasive neuromodulatory interventions are now possible for many neuropsychiatric disorders thanks to repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) that injects currents in the brain through electromagnetic induction, powerful enough to depolarize cortical neurons and related networks. Although ECT and rTMS differ in basic concepts, mechanisms, tolerability, side effects and acceptability, and beyond their conceptual remoteness (ECT) or proximity (rTMS) to "precision medicine" approaches,

the two brain stimulation techniques may be considered as complementary rather than competing in the current treatment of certain neuropsychiatric disorders.

Vecchio F, Alù F, Orticoni A, Miraglia F, Judica E, Cotelli M, Rossini PM.

**Performance prediction in a visuo-motor task: the contribution of EEG analysis.**

Cognitive Neurodynamics, 16(2), 297–308. doi:10.1007/s11571-021-09713-x

Menardi A, Rossi S, Koch G, Hampel H, Vergallo A, Nitsche MA, Stern Y, Borroni B, Cappa SF, Cotelli M, Ruffini G, El-Fakhri G, Rossini PM, Dickerson B, Antal A, Babiloni C, Lefaucheur JP, Dubois B, Deco G, Ziemann U, Pascual-Leone A, Santarnecchi E.

**Toward noninvasive brain stimulation 2.0 in Alzheimer's disease.**

Ageing Research Reviews, 75(101555), 101555. doi:10.1016/j.arr.2021.101555

Noninvasive brain stimulation techniques (NiBS) have gathered substantial interest in the study of dementia, considered their possible role in help defining diagnostic biomarkers of altered neural activity for early disease detection and monitoring of its pathophysiological course, as well as for their therapeutic potential of boosting residual cognitive functions. Nevertheless, current approaches suffer from some limitations. In this study, we review and discuss experimental NiBS applications that might help improve the efficacy of future NiBS uses in Alzheimer's Disease (AD), including perturbation-based biomarkers for early diagnosis and disease tracking, solutions to enhance synchronization of oscillatory electroencephalographic activity across brain networks, enhancement of sleep-related memory consolidation, image-guided stimulation for connectome control, protocols targeting interneuron pathology and protein clearance, and finally hybrid-brain models for in-silico modeling of AD pathology and personalized target selection. The present work aims to stress the importance of multidisciplinary, translational, model-driven interventions for precision medicine approaches in AD.

Longo V, Barbati SA, Re A, Paciello F, Bolla M, Rinaudo M, Miraglia F, Alù F, Di Donna MG, Vecchio F, Rossini PM, Podda MV, Grassi C.

**Transcranial direct current stimulation enhances neuroplasticity and accelerates motor recovery in a stroke mouse model.**

Stroke; a Journal of Cerebral Circulation, 53(5), 1746–1758. doi:10.1161/STROKEAHA.121.034200

**Background:** More effective strategies are needed to promote poststroke functional recovery. Here, we evaluated the impact of bihemispheric transcranial direct current stimulation (tDCS) on forelimb motor function recovery and the underlying mechanisms in mice subjected to focal ischemia of the motor cortex.

**Methods:** Photothrombotic stroke was induced in the forelimb brain motor area, and tDCS was applied once per day for 3 consecutive days, starting 72 hours after stroke. Grid-walking, single pellet reaching, and grip strength tests were conducted to assess motor function. Local field potentials were recorded to evaluate brain connectivity. Western immunoblotting, ELISA, quantitative real-time polymerase chain reaction, and Golgi-Cox staining were used to uncover tDCS-mediated stroke recovery mechanisms.

**Results:** Among our results, tDCS increased the rate of motor recovery, anticipating it at the early subacute stage. In this window, tDCS enhanced BDNF (brain-derived neurotrophic factor) expression and dendritic spine density in the peri-infarct motor cortex, along with increasing functional connectivity between motor and somatosensory cortices. Treatment with the BDNF TrkB (tropomyosin-related tyrosine kinase B) receptor inhibitor, ANA-12, prevented tDCS effects on motor recovery and connectivity as well as the increase of spine density, pERK (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase), pCaMKII (phosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II), pMEF (phosphorylated myocyte-enhancer factor), and PSD (postsynaptic density)-95. The tDCS-promoted rescue was paralleled by enhanced plasma BDNF level, suggesting its potential role as circulating prognostic biomarker.

Conclusions: The rate of motor recovery is accelerated by tDCS applied in the subacute phase of stroke. Anticipation of motor recovery via vicariate pathways or neural reserve recruitment would potentially enhance the efficacy of standard treatments, such as physical therapy, which is often delayed to a later stage when plastic responses are progressively lower.

## **LINEA 3**

**Innovazione in medicina e riabilitazione**

---



## AREA DI RICERCA CEFALEA E DOLORE NEUROPATICO

### *Progetto per la costituzione del registro italiano dell'emicrania*

L'emicrania è la terza patologia più frequente al mondo e rappresenta la prima causa di disabilità del genere umano in soggetti di età inferiore a 50 anni. La letteratura stima una prevalenza pari al 14% della popolazione europea. Malgrado la sua alta prevalenza, l'emicrania è a tutt'oggi ancora sottostimata e poco trattata. L'emicrania è un disturbo molto eterogeneo e viene attualmente classificata sulla base della presenza/assenza di aura e della frequenza degli attacchi mensili, distinguendo una forma episodica (fino a 14 giorni al mese) da una forma cronica (> 15 giorni al mese da almeno 3 mesi). L'emicrania ha un impatto drammatico sulla vita sociale del paziente, sulle attività ricreative e familiari, sulla frequenza lavorativa e sulla produttività, comporta un enorme utilizzo di risorse sanitarie e determina elevati costi economici. In Italia è stato stimato un costo totale medio annuo diretto per paziente pari a € 523.6 (considerando le visite degli operatori sanitari, le ospedalizzazioni, le procedure e i farmaci) per la forma episodica ed a € 2.250,0 per la forma cronica quasi interamente caricati sul Sistema Sanitario Nazionale (SSN). L'emicrania è la terza patologia più frequente al mondo e rappresenta la prima causa di disabilità del genere umano in soggetti di età inferiore a 50 anni. La letteratura stima una prevalenza pari al 14% della popolazione europea. Studi condotti sulla popolazione italiana hanno dimostrato percentuali ben più alte e preoccupanti. Un'indagine di popolazione svolta mediante intervista diretta su 904 adulti abitanti a Parma, ha evidenziato una prevalenza dell'emicrania pari al 24.7%, corrispondente al 32.9% delle donne ed il 13% degli uomini. Numeri ancora maggiori per la nostra penisola giungono ancora da uno studio di popolazione presso 3500 soggetti della ASL di Pavia mediante questionario postale che ha suggerito una percentuale di soggetti affetti pari al 42.9% (54.6% nel sesso femminile, 32.5% in quello maschile). Malgrado la sua alta prevalenza, l'emicrania è a tutt'oggi ancora sottostimata e poco trattata. L'emicrania è un disturbo molto eterogeneo e viene attualmente classificata sulla base della presenza/assenza di aura e della frequenza degli attacchi mensili, distinguendo una forma episodica (fino a 14 giorni al mese) da una forma cronica (> 15 giorni al mese da almeno 3 mesi). Il 30% dei soggetti emicranici presenta almeno un episodio di emicrania a settimana ed è pertanto candidabile ad una terapia preventiva per ridurre frequenza e disabilità e per minimizzare il rischio di cronicizzazione. Il 2.5% dei pazienti emicranici episodici evolve infatti ogni anno verso la forma cronica. Tale percentuale sale però al 30% quando si considerino i soggetti con emicrania episodica ad alta frequenza di attacchi (> 8 al mese). L'emicrania cronica (EC) ha una prevalenza di circa il 2% nella popolazione generale e rappresenta un disturbo di difficile gestione per i suoi criteri diagnostici insoddisfacenti, la complessa fisiopatologia, le comorbidità, la gestione inadeguata e la risposta deludente ai trattamenti convenzionali. L'emicrania ha un impatto drammatico sulla vita sociale del paziente, sulle attività ricreative e familiari, sulla frequenza lavorativa e sulla produttività, comporta un enorme utilizzo di risorse sanitarie e determina elevati costi economici. In Italia è stato stimato un costo totale medio annuo diretto per paziente pari a € 523.6 (considerando le visite degli operatori sanitari, le ospedalizzazioni, le procedure e i farmaci) per la forma episodica ed a € 2.250,0 per la forma cronica quasi interamente caricati sul Sistema Sanitario Nazionale (SSN).

È pertanto necessario un approccio epidemiologico-clinico condiviso a livello nazionale che tenga conto di una pluralità di aspetti della malattia, dalla presentazione clinica, alle procedure diagnostiche e ai trattamenti, allo scopo di favorire una governance clinica condivisa e un approccio di medicina di precisione ottimizzando l'allocazione dei fondi e la sostenibilità economica della gestione e del trattamento dell'EC.

I registri di patologia sono sistemi attivi di raccolta sistematica di dati anagrafici e sanitari e hanno lo scopo di registrare e caratterizzare tutti i casi di una particolare malattia o di una condizione di salute rilevante in una popolazione definita. I registri sono, infatti, uno strumento di grande utilità per seguire la storia naturale della malattia, per valutare indicatori di salute, per la pianificazione sanitaria e per favorire la ricerca scientifica anche attraverso l'implementazione e lo sviluppo di nuovi studi su coorti selezionate di pazienti.

La necessità di studiare i molteplici aspetti clinici e assistenziali di una patologia cronica, complessa e invalidante quale l'emicrania ha gettato le basi all'istituzione del Registro Italiano sull'emicrania – I-GRAINE: "Italian Migraine Registry". I-GRAINE implementa ed include al suo interno l'esperienza del precedente studio di coorte su Emicrania Cronica (Studio IRON) che ha preso le mosse nel 2014 ed ha ad oggi arruolato >700 pazienti reclutati in 26 centri cefalee italiani.

*Studio osservazionale prospettico, multicentrico, non interventistico sulla storia clinica dell'emicrania nella pratica clinica che utilizza una rete di centri cefalee sul territorio italiano.*

1. fornire informazioni rilevanti sulla storia naturale della malattia e sulla sua evoluzione nel tempo;
2. fornire dati epidemiologici, sociali e assistenziali sulla popolazione di pazienti affetti da emicrania episodica e cronica;
3. individuare l'impatto di fattori legati alla gestione del paziente sull'evoluzione e la prognosi dell'emicrania
4. valutare se la gestione della malattia presso uno specialista delle cefalee certificato, migliori il governo clinico, ottimizzando l'uso delle risorse sanitarie

La dimensione campionaria del registro italiano emicrania I-GRAINE è il 10% dei pazienti seguiti presso i centri cefalee aderenti al registro.

All'interno dell'I-GRAINE vi sarà inoltre un studio osservazionale di coorte retrospettivo prospettico con lo scopo di fotografare in modo più dettagliato la realtà dei pazienti non seguiti presso un centro specializzato e la storia naturale della malattia una volta iniziato il percorso nel centro specializzato. In questo sottostudio verranno arruolati circa 6,000 dei pazienti incidenti (definiti come aventi data di prima visita nei 6 mesi precedenti all'arruolamento nel registro), che saranno invitati a partecipare a uno studio di follow up e raccolta dati allargata.

La durata del registro I-GRAINE, fissata a un minimo 5 anni, è intesa a permettere di misurare l'evoluzione dell'handicap prodotto dall'emicrania, il suo impatto sulla vita del paziente, nonché gli effetti di nuovi trattamenti di recente introduzione.

Sono stati arruolati 633 pazienti in 23 centri per la cefalea alla data del 15/09/2022. La maggior parte di loro sono donne (85,7%), con emicrania episodica (81,7%), gravemente disabili (punteggio MIDAS:  $47,5 \pm 50,4$ ; punteggio HIT-6:  $60,9 \pm 9,2$ ). È emersa una netta differenza tra la percentuale di responder ai triptani (75%) e agli anticorpi monoclonali antiCGRP (77,1%-86,8%) e quelli che rispondono a farmaci aspecifici (acetaminofene: 49,1%; NSAID: 56,8%; associazioni analgesiche 61,4% ; standard di cura preventivo: 19,5%-37,8%). Il 7,9% dei pazienti ha avuto  $\geq 1$  visita al pronto soccorso negli ultimi 12 mesi. Il 15% aveva precedentemente consultato un centro per il mal di testa. La maggior parte dei pazienti (70,95%) è stata sottoposta a diverse ( $2,3 \pm 2,2$ ) indagini diagnostiche negli ultimi 3 anni e il 42,3% è sottoposta a più visite specialistiche ( $4,5 \pm 4,8$ ) per emicrania: entrambe per lo più inappropriate e solitamente sovvenzionate dal SSN.

Il registro I-GRAINE dovrebbe fornire una raccolta esponenzialmente crescente di big data su informazioni cliniche, biologiche ed epidemiologiche sull'emicrania.

*Studio osservazionale multicentrico italiano, real life per la conferma dell'efficacia, tollerabilità e sicurezza di farmaci innovativi (anticorpi monoclonali ed altri) nella profilassi dell'emicrania episodica e cronica: Protocollo iNEED (New migrainE drugs Database)*

Studio di tipo multicentrico, osservazionale, prospettico. Verranno considerati tutti i pazienti affetti da emicrania episodica ad alta frequenza (HFEM: >8 gg/mese) ed emicrania cronica (CM >15 gg/mese) che afferiscono all'Unità per la cura e la ricerca su cefalee e dolore in trattamento di prevenzione farmacologica con anticorpi monoclonali anti CGRP (Ab Anti-CGRP) secondo indicazioni cliniche.

L'emicrania non è un sintomo ma una malattia neurologica che affligge soprattutto il sesso femminile e rappresenta la terza patologia più frequente e la seconda più disabilitante del genere umano secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) (Global Burden Disease 2017). Predilige nettamente il sesso femminile manifestando un rapporto donna/uomo pari a 3:1 con età compresa tra i 20 ed i 50 anni. L'emicrania è distinguibile, sulla base della frequenza, in una forma episodica (fino a 14 giorni al mese) ed in una forma cronica (>15 giorni al mese da almeno 3 mesi). Il 2.5% dei pazienti emicranici episodici evolve ogni anno verso la forma cronica. Tale percentuale sale però al 30% quando si

considerino i soggetti con HFEM (High Frequency Episodic Migraine) di attacchi (>8 al mese). La CM (Chronic Migraine) ha una prevalenza di circa il 2% nella popolazione generale e spesso è associata ad uso frequente di farmaci sintomatici che possono determinare la cefalea da iperuso di analgesici (MOH) ovvero l'assunzione di analgesici per almeno 15 giorni al mese (oppure triptani, ergotamini, oppioidi o associazioni analgesiche per almeno 10 giorni al mese) da perlomeno 3 mesi. La CM spesso in combinazione con MOH, affligge ancor più nettamente la donna rispetto all'uomo (rapporto 5-6/1). L'emicrania colpisce pertanto i soggetti nel periodo di massima produttività socio-lavorativa, causando marcata disabilità e considerevoli costi.

Approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) e dalla European Medicine Agency (EMA) a partire dal 2018, gli anticorpi monoclonali antiCGRP (mAb antiCGRP) costituiscono la prima vera rivoluzione nella terapia preventiva dell'emicrania per via della loro selettività e specificità e rappresentano l'approdo di un viaggio terapeutico iniziato con la metisergide oltre 60 anni fa. Il loro esordio sulla scena è avvenuto 36 anni dopo la scoperta del CGRP da parte di Susan Amara e a 30 anni dalla documentazione di una elevazione dei livelli ematici di CGRP nel sangue refluo della vena giugulare interna omolaterale al dolore nel soggetto emicranico durante l'attacco. I mAb antiCGRP finora sviluppati per la terapia preventiva dell'emicrania sono 4: eptinezumab, erenumab, fremanezumab, galcanezumab. Tutti i mAb antiCGRP si caratterizzano per un ottimo profilo di efficacia, sicurezza e tollerabilità e per una notevole rapidità di azione. Erenumab, fremanezumab e galcanezumab sono già disponibili in Italia mentre eptinezumab è in attesa di approvazione da parte di EMA. I mAb antiCGRP costituiscono non solo il primo trattamento specifico e selettivo per la profilassi dell'emicrania ma anche la categoria farmacologica di gran lunga più studiata in questo ambito con riferimento alla vastità ed alla complessità delle popolazioni studiate.

Gli effetti clinici dei diversi mAb appaiono sostanzialmente sovrapponibili e si caratterizzano per alcuni aspetti fondamentali: (a) elevata efficacia sia nell'emicrania episodica che in quella cronica con presenza di soggetti superresponsivi che presentano una riduzione del numero mensile medio di giorni di emicrania pari a >75% (o addirittura del 100%) rispetto a prima del trattamento; (b) efficacia indipendente dalla forma clinica dell'emicrania - con aura o senza aura - e dalla presenza o meno di iperuso di analgesici; (c) efficacia mantenuta anche in presenza di comorbidità depressiva o ansiosa; (d) elevata rapidità di azione (ancor più evidente con eptinezumab) con comparsa dell'effetto terapeutico già entro la prima settimana nella maggior parte dei casi; (e) ottima tollerabilità con assenza di eventi avversi di classe; (f) ottima aderenza terapeutica e bassissimo tasso di interruzione del trattamento nel lungo termine. L'European Headache Federation ha pubblicato delle linee guida dettagliate sullo stato dell'arte circa le prove di efficacia nel ridurre la frequenza, l'intensità degli episodi di cefalea, sicurezza e tollerabilità dei quattro anticorpi monoclonali in condizioni sperimentali "ideali", con pazienti selezionati con stringenti criteri di inclusione ed esclusione. Questa selezione limita la trasferibilità diretta delle conclusioni di questi studi nella realtà clinica: questo studio intende quindi confermare sul campo della pratica clinica la reale efficacia nella riduzione della frequenza mensile dei giorni di emicrania e la tollerabilità dei farmaci innovativi.

Lo studio si prefigge di valutare l'impatto del trattamento con farmaci innovativi, nei pazienti che presentano > 8 giorni di emicrania al mese nei 3 mesi precedenti alla prima somministrazione di farmaci innovativi in oggetto e in cui due o più trattamenti di profilassi precedenti non sono risultati efficaci o tollerati. L'endpoint primario di questo studio consiste nella valutazione della riduzione del numero di giorni di emicrania mensile rispetto alla media basale presentata dai giorni di emicrania nei 3 mesi precedenti il trattamento da ogni singolo paziente e dopo 4, 8, 12, 24 e 48 settimane. Lo studio si prefigge inoltre di confermare il profilo di tollerabilità e efficacia del trattamento con farmaci innovativi in un setting di real world evidence. Vengono inoltre identificati e riportati: il tipo e numero di eventi avversi verificatisi durante il periodo di studio, rilevati ad ogni controllo clinico, tramite specifico quesito (dettaglio dell'evento, durata, severità azione intrapresa); l'impatto della terapia con i farmaci innovativi sull'utilizzo di farmaci sintomatici e sugli aspetti correlati alla "dipendenza" da farmaci sintomatici: la riduzione dell'assunzione mensile media del numero di analgesici in pazienti già in trattamento con farmaci innovativi; l'impatto della disabilità indotta dall'emicrania in pazienti già in trattamento con farmaci innovativi: viene considerata la variazione media del punteggio dei questionari HIT-6 TM, MIDAS da prima del trattamento a 4, 8, 12, 24 e 48 settimane; l'impatto sull'intensità del dolore percepito durante l'attacco di emicrania in pazienti già in trattamento con farmaci innovativi:

sarà valutata la variazione media del punteggio della scala VAS rispetto a prima del trattamento e a 4, 8, 12, 24, 48 settimane; l'impatto sulle difficoltà lavorative correlate all'emicrania in pazienti già in trattamento con farmaci innovativi: è valutata la variazione media del punteggio del questionario HEADWORK rispetto a prima dell'inizio del trattamento e dopo 12, 24 e 48 settimane; l'impatto sui costi correlati all'emicrania: viene considerata la variazione media del punteggio del questionario COSTI rispetto a prima del trattamento e a 12, 24 e 48 settimane; tassi di risposta: a) percentuale di pazienti emicranici che otterranno una riduzione di > 50% del numero di giorni di emicrania mensile rispetto alla media dei giorni di emicrania prima del trattamento, dopo 4, 8, 12, 24 e 48 settimane; b) percentuale di pazienti emicranici che otterranno una riduzione di > 75% del numero di giorni di emicrania mensile rispetto alla media dei giorni di emicrania prima del trattamento, dopo 4, 8, 12, 24 e 48 settimane;

Nello studio vengono raccolte le informazioni relative ai pazienti ambulatoriali già in trattamento con farmaci innovativi da almeno 8 settimane, dalla prima somministrazione presso i rispettivi centri clinici. Alla prima visita viene eseguita una accurata anamnesi ed esame neurologico. In accordo con la scheda tecnica del farmaco è confermato il dosaggio dei farmaci innovativi con cui il paziente è in trattamento e se necessario, si può passare alla dose superiore. Il dosaggio dei farmaci innovativi, in accordo alla scheda tecnica, è confermato in caso di raggiungimento di beneficio clinico (inteso come la riduzione >50% dei giorni di emicrania rispetto alle precedenti 8 settimane); di contro, il dosaggio viene incrementato laddove previsto nelle successive somministrazioni in caso di beneficio clinico inferiore al 50%. La situazione clinica del paziente viene dettagliata con un'intervista semistrutturata e attraverso i questionari VAS, HIT-6 e MIDAS (allegato 5a e 5 b), HEADWORK (allegato 6a e 6b), questionario costi. I questionari VAS e HIT-6 sono compilati dal paziente ad ogni visita successiva mentre i questionari HEADWORK e COSTI sono compilati dopo 12, 24, 48 settimane di trattamento. Durante tutte le visite dello studio sono rilevati eventuali eventi avversi avvenuti durante tutto il periodo di osservazione. Il paziente fa pervenire ai medici sperimentatori il diario della cefalea mensilmente per tutta la durata dello studio. Sono arruolati tutti i pazienti affetti da HFEM e CM afferenti presso le Unità partecipanti allo studio e che rispettano i criteri previsti e nello specifico: a) Pazienti adulti (età > di 18 anni) con almeno 8 giorni di emicrania al mese secondo i criteri ICHD-3 in trattamento con farmaci innovativi da 8 settimane, che abbiano precedentemente fallito almeno due terapie preventive per inefficacia o intolleranza. Per le terapie preventive ci si riferisce a quelle indicate dalle linee guida nazionali ed internazionali; b) Sottoscrizione del consenso informato previsto; c) Accordo nel seguire tutte le procedure dello studio, incluse le visite di follow-up; d) Uso di metodo contraccettivo per tutti partecipanti durante tutta la durata dello studio.

Criteri di esclusione: a) Età < 18 anni; b) Gravidanza o allattamento; c) Scarsa conoscenza della lingua italiana; d) Comorbidità di altre patologie neurologiche, cardiovascolari, epatiche, respiratorie, ematologiche, autoimmuni o alterazioni di esami di laboratorio ritenute di rilevanza clinica. e) Indisponibilità a partecipare allo studio. Durante lo studio vengono utilizzate cartelle cliniche appositamente create composte dai seguenti elementi: 1. Cartella clinica dell'ambulatorio dell'Unità per la diagnosi e la terapia delle Cefalee dell'IRCCS San Raffaele, Scheda di rilevazione dei dati, Diario delle cefalee, Visual Analogue Scale, Questionari HIT-6 e MIDAS, Questionario, Questionario COSTI

I dati raccolti durante lo studio vengono inseriti in modo anonimo in un database elettronico. Le analisi statistiche sono condotte con un software dedicato (SPSS v 20) e in base alla variabile in studio sono utilizzati i test statistici appropriati (test del chi quadrato per variabili categoriche, Fisher's exact test per analizzare il tasso di risposta).

I parametri sui quali è stata condotta la stima della numerosità ottimale del gruppo in studio e riferita sono riferiti all'endpoint primario cioè alla variazione mensile del numero dei giorni di emicrania. I valori di riferimento sono i seguenti: Frequenza mensile giorni di emicrania =18.0 (SD 7.0); errore di I tipo pari all'1% (alpha = 0.05) one tailed; potenza statistica al 80%. Considerando una riduzione attesa del 30% nella frequenza di giorni con emicrania, è necessario osservare 52 pazienti. Considerata una percentuale plausibile di drop-out del 20%, il numero di soggetti da reclutare è pari a 61. Tutti i dati raccolti vengono inseriti nel.

L'analisi dei dati viene svolta dall'Unità di Epidemiologia Clinica dell'IRCCS San Raffaele. Per tutte le variabili vengono utilizzate sia analisi univariate che multivariate (a seconda della distribuzione per i dati continui, dimensioni del campione, media deviazioni standard, minima e massima per i dati categorici, dimensione del campione, frequenza assoluta e relativa). La variazione nel tempo dei dati continui e

categorici è analizzata confrontando le statistiche riassuntive di ogni visita con i valori baseline nello studio.

## **AREA DI RICERCA NEUROMOTORIA**

### *Telereabilitazione per la continuità assistenziale in pazienti neurologici: studio pilota multicentrico*

L'incremento della popolazione anziana fragile, l'aumentata incidenza di condizioni cliniche croniche e le crescenti richieste di cure più personalizzate, richiedono nuovi approcci nell'erogazione dell'assistenza sanitaria. I Servizi Sanitari di numerosi Paesi chiedono una limitazione delle degenze ospedaliere per motivi clinici ed economici. Pertanto, i servizi sanitari territoriali hanno un ruolo sempre più preponderante nella gestione del paziente cronico. Tuttavia, tanti pazienti ancora non usufruiscono di un adeguato trattamento riabilitativo territoriale a causa degli eccessivi costi del trattamento domiciliare e delle difficoltà logistiche per raggiungere le sedi dei servizi ambulatoriali.

In questo scenario, la Teleriabilitazione potrebbe aiutare a superare molte difficoltà, tramite l'erogazione di trattamenti riabilitativi domiciliari (senza lo spostamento di operatori o di pazienti) e potrebbe divenire la chiave operativa per garantire la continuità assistenziale ospedale-territorio con un equo accesso ai servizi di sanità territoriale.

Obiettivo di questo progetto in rete è la realizzazione di una rete integrata italiana per l'erogazione a distanza, su tutto il territorio nazionale, di trattamenti specifici di neuro riabilitazione motoria, cognitiva e logopedia.

Nel 2022, l'attività svolta dall'IRCCS San Raffaele per il progetto ha riguardato il reclutamento, valutazione e trattamento di due pazienti con Sclerosi multipla.

Tale studio proseguirà nel 2023 per un'analisi dell'efficacia della teleriabilitazione con serious game e tdc. I dati dalle persone con malattia di Parkinson e sclerosi multipla (senza tdc) sono in analisi e nel 2023 sono previste due pubblicazioni su riviste con impact factor.

### *Riabilitazione robotica attivo-assistita degli arti superiori ed inferiori in pazienti in trattamento riabilitativo con esiti neuromotori*

La capacità motoria è essenziale per eseguire le attività della vita quotidiana (ADL) nonché per la partecipazione alle attività sociali (attività del tempo libero e lavoro). I disturbi motori riducono significativamente la qualità della vita di un paziente comportando un importante impatto sulle ADL, sulle attività del tempo libero e sul lavoro. I deficit neuro-motori degli arti superiori e inferiori, a seguito delle patologie neurologiche o ortopediche d'interesse riabilitativo, limitano specificamente l'autonomia dei soggetti affetti, richiedendo quindi cure continuative da parte di famiglie o servizi sociali e comportando un elevato costo per il SSN.

Oramai, nuove conoscenze sui processi di riorganizzazione funzionale che si verificano dopo una lesione cerebrale, sono confermate dalle neuroscienze e la neuro-plasticità è un concetto consolidato. Infatti, è stato mostrato che il recupero funzionale previene ulteriori perdite delle abilità residue e preserva la capacità di apprendimento di un task motorio [Tomassini et al. 2011]. L'esercizio motorio sembra svolgere un ruolo fondamentale nei processi di riorganizzazione neurale e indurre neuroplasticità e recupero motorio. In questo contesto, il tipo della pratica motoria ha un ruolo ancora più determinante. La neuroplasticità è esperienza-dipendente e per attivarsi richiede un training specifico, sufficientemente ripetitivo e intensivo e con una durata effettiva [Kleim and Jones 2008].

Negli ultimi anni la tecnologia si è diffusa in maniera esponenziale nell'area riabilitativa, proponendo un gran numero di sistemi e soluzioni di trattamento. Un aspetto di rilevante importanza nell'ambito della riabilitazione è rappresentato dalla possibilità di somministrare sessioni di allenamento standardizzate, misurabili, continue e ripetibili. Questi aspetti, infatti, consentono un esatto intervento dal punto di vista dell'intensità dell'azione riabilitativa e della costanza delle caratteristiche fisiche e operative dell'esercizio motorio. Inoltre, l'utilizzo di soluzioni robotiche, integrate in ambienti virtuali e interfacce computerizzate, si è dimostrato efficace nel recupero delle funzionalità motorie degli arti superiori e inferiori dopo un ictus, accelerando i tempi di recupero rispetto alla terapia convenzionale.

Gli strumenti di riabilitazione robotica, inoltre, permettono la valutazione oggettiva degli outcome del programma terapeutico fornendo marcatori biomeccanici e misurazioni oggettive delle prestazioni per pazienti in trattamento riabilitativo con esiti neuromotori. Questo produrrà un avanzamento delle conoscenze traslazionali e di base garantendo un'ottimizzazione della personalizzazione del piano riabilitativo individuale.

Il progetto si inserisce nel contesto della personalizzazione del trattamento riabilitativo del paziente e ha come obiettivo l'utilizzo di nuove tecnologie e nuovi metodi per la riabilitazione dei deficit neuro-motori di diverse patologie disabilitanti sia neurologiche che ortopediche al fine di massimizzare gli outcome clinici e minimizzare i tempi di recupero, nonché ritardare più possibile le fasi di grave disabilità nei soggetti con patologie croniche degenerative (quali la malattia di Parkinson, Sclerosi Multipla,..). Tale studio permetterà di offrire un trattamento riabilitativo mirato e personalizzabile attraverso nuove tecnologie robotiche (esoscheletri, robot end-effector) in base allo stato neuro-motorio del paziente per l'ottimizzazione del progetto riabilitativo.

Il progetto si pone come obiettivo l'utilizzo dei sistemi robotici innovativi che permettono il recupero motorio degli arti superiori e inferiori attraverso esercizi funzionali in modalità attiva/attiva-assistita. L'attività di ricerca clinica e biomedica con tali sistemi permetterà di:

- 1) implementare un programma riabilitativo innovativo che faccia uso di robotica personalizzata che possa essere applicata ai principali distretti motori;
- 2) valutare l'efficacia della terapia robotica con gli esoscheletri e gli end-effector sia per la riabilitazione degli arti superiori che degli arti inferiori;
- 3) monitorare il recupero motorio durante la terapia con l'obiettivo di personalizzare il trattamento ed ottimizzare l'utilizzo delle varie apparecchiature;
- 4) comprendere gli effetti della terapia riabilitativa con diversi tipi di sistemi (esoscheletri e end-effector) in base alle caratteristiche dei pazienti;
- 5) confrontare gli effetti dei vari sistemi robotici per la riabilitazione in un gruppo di pazienti con specifici criteri di inclusione ed esclusione;
- 6) riassumere l'utilità e l'efficacia clinica della riabilitazione degli arti superiore ed inferiori attraverso i device tecnologici;
- 7) fornire un riferimento evidence-based sulle soluzioni nuove presenti per integrare e intensificare l'offerta riabilitativa.

Al termine del progetto ci si aspetta di ottenere un database di dati clinici e oggettivi estratti dalle valutazioni e dal sistema robotico utilizzato per la riabilitazione dei vari soggetti (sia degli arti superiori che inferiori) da parte dei soggetti con differenti patologie e caratteristiche, all'inizio (T0), qualora possibile durante (T1) e alla fine del trattamento (T2). Un follow-up a distanza di 3-6 mesi dalla fine del trattamento (T3) confermerebbe un eventuale mantenimento o perdita dell'effetto ottenuto; una caratterizzazione delle patologie in base al deficit neuro-motorio e il quadro clinico del paziente; la valutazione dell'efficacia di terapie riabilitative innovative; l'introduzione e l'utilizzo in pratica clinica di nuove indicazioni per l'utilizzo mirato dei sistemi robotici per ogni patologia studiata.

Diversi sono gli approcci adottati negli ultimi 20 anni per favorire il recupero motorio, e fra questi il trattamento robotico si è dimostrato efficace per il recupero della forza muscolare e del controllo motorio, e quindi nel migliorare le funzioni ADL [Louie DR et al., 2016; Mehrholz et al., 2015]. In particolare, per l'arto inferiore, uno studio [Mazzoleni S et al. 2017] eseguito su pazienti cronici post-ictus sottoposti a sessioni di sola riabilitazione robotica del cammino ha mostrato miglioramenti significativi nella performance motoria globale, nella resistenza durante il cammino, l'equilibrio e la coordinazione, nella forza muscolare e nella spasticità.

Esistono in commercio differenti tipologie di robot per la riabilitazione. Studi clinici hanno evidenziato come l'esecuzione di movimenti simili a quelli eseguiti nella vita quotidiana sia particolarmente importante per un recupero motorio orientato al re-inserimento del paziente nel proprio ambiente familiare [Johnson MJ, 2006]. Per questo motivo robot che consentono di eseguire movimenti 3D dell'arto superiore e di camminare overground sono considerati come sistemi riabilitativi innovativi in grado di offrire al paziente una maggiore stimolazione del controllo motorio e informazioni multisensoriali sensoriali (visive, propriocettive, tattili e vestibolari). Tali sistemi mantengono una partecipazione attiva del paziente, che è in grado di eseguire i task motori anche in caso di impairment motorio grave.

Pertanto, nell'ambito della riabilitazione della persona neurologica con esiti di disabilità, il recupero funzionale orientato a ADL sia dell'arto superiore che degli arti inferiori deve essere uno degli obiettivi principali dell'IRCCS. Tale argomento si inserisce in un contesto di più ampio respiro riguardo la sicurezza del paziente, il recupero dell'indipendenza e di un buon livello di qualità della vita, e l'active ageing.

Materiali e metodi:

STUDIO 1: La riabilitazione robot-assistita del cammino sul terreno libero (Overground Robot-Assisted Gait Training; o-RAGT) permette ai clinici di offrire un trattamento intensivo mirato alle persone con il deficit della deambulazione. Questo studio multicentrico randomizzato si occupa dell'analisi dell'efficacia di o-RAGT nei soggetti con ictus subacuto, rispetto al training del cammino con l'approccio tradizionale. Si recluteranno soggetti con ictus subacuto (Gruppo Sperimentale (EG) o Gruppo di Controllo (CG)). Entrambi i gruppi riceveranno 15 sessioni di training del cammino (con una frequenza di 5 sessioni a settimana di 60 minuti/sessione) e riabilitazione convenzionale giornaliera. Tutti i partecipanti saranno valutati clinicamente all'inizio (T1) e alla fine (T2) del periodo di trattamento con le seguenti scale di valutazione: Il 6-Minute Walking Test (6MWT), che è stato considerato come l'outcome primario dello studio; modified Ashworth Scale per la valutazione di spasticità dell'arto inferiore affetto (MAS-AL); Motricity Index dell'arto inferiore affetto (MI-AL); il Trunk Control Test (TCT); Functional Ambulation Classification (FAC); 10 meters Walking Test (10MWT); modified Barthel Index (mBI) e Walking Handicap Scale (WHS).

STUDIO 2: La perdita funzionale dell'arto superiore è una conseguenza molto frequente ed invalidante nei sopravvissuti da ictus. La riabilitazione robot-assistita degli arti superiori può migliorare i risultati con un approccio intensivo e task-orientato. Lo scopo di questo studio era di esplorare l'effetto del training robot-assistito utilizzando i sistemi robotici di tipo esoscheletro e end-effector sulla funzione dell'arto superiore dopo un ictus nella pratica clinica della vita reale. Un totale di 105 pazienti affetti da un primo ictus sopratentoriale è stato arruolato in 18 centri di neuroriabilitazione e trattati con la riabilitazione robot-assistita dell'arto superiore in aggiunta alla terapia convenzionale. Entrambi gli interventi prevedevano un esoscheletro o un dispositivo end-effector (come da pratica clinica) e consistevano in 20 sessioni (3/5 volte a settimana; per una durata complessiva di 6-8 settimane). I pazienti sono stati valutati mediante scale cliniche convalidate all'inizio (T0), dopo il trattamento (T1) e al follow-up di tre mesi (T2). La scala di Fugl-Meyer per l'arto superiore (FMA-UE) è stata considerata come l'outcome primario dello studio.

STUDIO 3: Sebbene i sopravvissuti all'ictus possano trarre beneficio dalla riabilitazione robotica stazionaria del cammino, il training del cammino necessita di ulteriori indagini. In questo lavoro abbiamo studiato l'efficacia di questo approccio (con un esoscheletro o un robot end-effector) rispetto alla riabilitazione convenzionale del cammino in sopravvissuti a ictus subacuto.

STUDIO 4: La perdita della funzione dell'arto superiore è comune e invalidante dopo l'ictus. La riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot può migliorare la funzionalità. Lo scopo di questo studio era di esplorare l'effetto del training assistito da robot utilizzando robot esoscheletrici ed end-effector sulla funzione dell'arto superiore in pazienti post-ictus subacuti e cronici.

Risultati:

STUDIO 1: Il reclutamento dei pazienti è in corso. Attualmente sono stati acquisiti 3 pazienti che hanno condotto o-RAGT con l'esoscheletro overground Indego (Parker, USA). I risultati ottenuti sono incoraggianti e suggeriscono future sperimentazioni cliniche su tale argomento e l'incremento del numero di pazienti nello studio.

STUDIO 2: Il reclutamento dei pazienti è in corso. Attualmente sono stati acquisiti 3 pazienti che hanno condotto riabilitazione dell'arto superiore con esoscheletro Armeo Power. I risultati ottenuti sono incoraggianti e suggeriscono future sperimentazioni cliniche su tale argomento e l'incremento del numero di pazienti nello studio.

STUDIO 3: In un RCT multicentrico, 89 pazienti hanno condotto 20 sessioni di riabilitazione robotica stazionaria del cammino (Gruppo robotico) o riabilitazione tradizionale del cammino (Gruppo di controllo) in aggiunta alla terapia giornaliera standard. Il training robotico è stato eseguito con un esoscheletro (RobotEXO-group) o un end-effector (gruppo RobotEND). Gli outcome clinici sono stati valutati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento. La velocità di deambulazione durante o riabilitazione tradizionale del cammino il 10-Meter Walk Test (10MWT) è stata l'outcome primario di questo studio e

gli outcome secondari sono stati il 6-MinuteWalk Test (6MWT), il Timed Up and Go test (TUG) e l'Indice di Barthel modificato (mBI).

I risultati dello studio hanno evidenziato un miglioramento significativo del 10MWT nel Gruppo robotico alla fine del periodo di trattamento (endpoint primario). Un miglioramento è stato osservato anche nei seguenti parametri: 6MWT, TUG e mBI. Inoltre, i pazienti appartenenti al Gruppo robotico ha superato il gruppo di controllo nella velocità del cammini, resistenza, equilibrio e ADL. Il gruppo RobotEND ha inoltre migliorato la velocità di camminata di più del gruppo RobotEXO. In conclusione, la riabilitazione robotica stazionaria del cammino ha migliorato la capacità di deambulazione di più rispetto alla riabilitazione tradizionale del cammino nell'ictus subacuto. Questi risultati suggeriscono che le persone con ictus subacuto possono trarre beneficio dalla riabilitazione robotica stazionaria del cammino per potenziare la velocità dell'andatura e la resistenza.

STUDIO 4: Un totale di 105 pazienti affetti da un primo ictus sono stati arruolati in 18 centri di neuroriabilitazione Italiani e hanno condotto riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot in aggiunta alla terapia convenzionale, con esoscheletro o robot end-effector. Entrambi gli interventi consistevano in 20 sessioni (3/5 volte a settimana; 6-8 settimane). I pazienti sono stati valutati mediante scale per l'arto superiore validate prima (T0), dopo (T1) il trattamento e ad un follow-up a tre mesi (T2). L'outcome primario era la valutazione Fugl-Meyer per l'arto superiore (FMA-UE). La FMA-UE è migliorata a T1 di 6 punti in media nel gruppo end-effector e di 11 punti in media nel gruppo esoscheletro ( $p < 0.0001$ ). Gli esoscheletri sono più efficaci nella fase subacuta, mentre gli end-effector nella fase cronica ( $p < 0.0001$ ). In conclusione, la riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot potrebbe aiutare a migliorare la funzione dell'arto superiore nei pazienti con ictus come trattamento aggiuntivo sia nella fase subacuta che in quella cronica. Sono necessari studi pragmatici e di alto livello metodologico per confermare l'efficacia dimostrata dell'esoscheletro e dei dispositivi end-effector.

## **RICERCA TRASLAZIONALE**

### **Laboratorio di Bioingegneria della Riabilitazione**

#### *Sviluppo e validazione di tecnologie per la teleriabilitazione e il telemonitoraggio*

Gli studi demografici mostrano una popolazione europea in continuo aumento e in progressivo invecchiamento. Le proiezioni sugli anni a venire confermano che l'aumento dell'età media della popolazione sarà accompagnato da una domanda di servizi sanitari in continuo aumento e come questo comporti una seria di difficoltà da parte delle esistenti strutture ed operatori sanitari a soddisfare le esigenze di tutti i pazienti, a meno di un sensibile incremento delle risorse economiche allocate. L'attuale situazione economica rende questa strada difficilmente praticabile, se non impossibile, con gli attuali strumenti e soluzioni in campo.

Le nuove tecnologie in ambito "Digital Health" possono essere una soluzione efficace a questi problemi in termini di miglioramento della qualità dei servizi, facile accesso da parte del cittadino e inserimento di protocolli personalizzati e incentrati sul paziente. Le iniziative digitali proposte nel panorama sanitario permettono la facile fruibilità e l'interconnessione di sistemi con l'obiettivo di accrescere la qualità dei servizi sanitari abbattendo l'impatto economico, così come previsto dall'Agenda Digitale Italiana.

I risultati di questa ricerca traslazionale potranno garantire progressi nell'ottimizzazione e nella personalizzazione del processo riabilitativo contribuendo così a migliorare la qualità della vita dei pazienti con ictus cronico.

I pazienti affetti da ictus in fase cronica si ritrovano generalmente nel proprio ambiente domestico, distanti dalle strutture ospedaliere spesso senza ancora aver completato il loro percorso riabilitativo. Il continuo monitoraggio delle prestazioni gioca un ruolo fondamentale nella riabilitazione motoria e cognitiva in seguito a un danno neurologico; l'interruzione dovuta



all'allontanamento dalla supervisione clinica può avere un impatto negativo sul recupero delle capacità funzionali. In questo contesto, l'applicazione di "Information and Communication Technology" (ICT) nell'ambito sanitario è lo strumento giusto per coprire la domanda riguardante il processo di riabilitazione: è un metodo efficace per far interagire il personale medico con il paziente, il quale si sente rassicurato dalla continua assistenza, guidato nelle attività giornaliere e stimolato a continuare la terapia anche al di fuori delle mura ospedaliere. Dall'altra parte i medici ed i terapisti possono continuare a monitorare in tempo reale e a distanza le condizioni di salute ed il recupero riabilitativo dei pazienti. Affinché questa metodologia possa farsi sempre più strada nella pratica clinica sono fondamentali i processi di implementazione, validazione e valutazione della fattibilità e dell'efficacia delle applicazioni di telemonitoraggio e teleriabilitazione.

Il presente progetto ha proposto la valutazione della fattibilità, dell'efficacia dell'accettazione di piattaforme digitali di Teleriabilitazione e telemonitoraggio volte allo svolgimento di terapie innovative mediante il supporto medico da remoto. La facile accessibilità per la continuità della terapia e dell'assistenza clinica dei pazienti post-ictus in fase cronica è uno dei principali obiettivi e lo si è perseguito per mezzo della progettazione di cruscotti user-friendly, sia lato-paziente, sia lato-clinico per la profilazione del paziente che esegue la terapia domiciliare. L'accettazione della tecnologia è stata valutata per mezzo di questionari già validati in letteratura.

Il modello del questionario sull'accettazione della tecnologia (TAM+) è stato utilizzato per valutare e spiegare la fattibilità delle nuove tecnologie, oltre a domande a risposta aperta poste al paziente alla fine delle cinque settimane di utilizzo del dispositivo. Le scale di valutazione utilizzate nella pratica clinica insieme a marcatori elettrofisiologici sono stati utilizzati per definire il recupero funzionale in seguito al trattamento. La fruibilità del servizio era incoraggiante in termini di aderenza e compliance da parte dei pazienti di qualsiasi età, oltre a considerarlo valido in termini di impatto potenziale sullo stato fisico e sul benessere del paziente grazie agli esercizi riabilitativi proposti.

Nel campo riabilitativo per pazienti neurologici, sono ancora poche le applicazioni ICT per la somministrazione di terapie domiciliari. Nello specifico, per i pazienti con ictus in fase cronica, con l'obiettivo di fornire modalità pratiche semplici, sicure e veloci di esecuzione di un trattamento riabilitativo, l'Action Observation Therapy rappresenta una possibilità promettente per favorire la neuroplasticità e quindi la riorganizzazione delle reti neurali. Ad oggi in letteratura sono quasi assenti le sperimentazioni che introducono video-terapie personalizzabili eseguite autonomamente a casa. Nell'ottica di rendere disponibile e accessibile la riabilitazione per l'ictus cronico, grazie all'utilizzo di stimoli video invece di dimostrazioni reali, un programma di teleriabilitazione basato su AOT, seguendo le stesse caratteristiche su cui viene definita la terapia in ospedale sotto la supervisione dei terapisti, può garantire progressi nell'ottimizzazione e nella personalizzazione del processo riabilitativo contribuendo così a migliorare la qualità della vita dei pazienti con ictus cronico.

Criteri di inclusione:

- pazienti di entrambi i sessi con ictus in fase cronica
- età maggiore di 18 anni
- primo ictus unilaterale ischemico con deficit dell'arto superiore/della mano clinicamente evidente
- distanza dall'evento acuto maggiore di 6 mesi
- diagnosi verificata mediante imaging cerebrale (MRI)
- funzione cognitiva sufficiente per comprendere le istruzioni sperimentali
- valutazione dell'ictus con punteggio scala Chedoke-McMaster superiore a 1

Criteri di esclusione:

- disfunzione bilaterale
- deficit sensoriali gravi dell'arto superiore paretico
- deterioramento cognitivo o disfunzione comportamentale
- rifiuto o incapacità di firmare il consenso informato
- altri gravi problemi medici presenti

I pazienti reclutati hanno avuto l'accesso al trattamento domiciliare grazie all'uso di un monitor o tablet (un sistema hardware accessibile a basso costo basato su tecnologia di consumo per facilitare la tele-riabilitazione). L'App è user-friendly in modo da renderla di facile utilizzo per qualsiasi fascia di età. La User Interface e la User Experience sono state appositamente studiate per ridurre l'impatto nell'uso del device ad utenti non avvezzi all'utilizzo di strumenti tecnologici al fine di ottenere il miglior risultato in termini di fruizione del servizio offerto dal tablet e dalle applicazioni. In particolare, sono state proposte due applicazioni, una Mobile App ed una Web-App, per allenare i pazienti e per ricevere un feedback sui loro progressi (numero di sessioni svolte, durata delle sessioni, obiettivi raggiunti). L'intervento ha previsto un numero di sedute prestabilito su indicazione del personale clinico (15) distribuite su 5 settimane, ciascuna di durata 15 minuti ripetuta due volte a distanza di un'ora. Le singole sedute consistevano in terapie video che mostravano gesti della vita quotidiana ripetuti per due minuti con una successiva pausa per l'esecuzione di 1 minuto del gesto osservato.

Sono stati reclutati 10 soggetti affetti da ictus cronico, inseriti nel gruppo domiciliare e valutati. Un paziente si è ritirato dallo studio in seguito alla consegna del tablet. Un paziente è stato escluso dall'analisi dei marcatori di performance motoria e inserito nella sola analisi di valutazione della tecnologia domiciliare, poiché dal monitoraggio a distanza sulle sedute svolte (7 su 15) e dai tempi di risposta ad un task attentivo è stata dedotta una scarsa compliance e partecipazione da parte del paziente.

Lo studio di nuove piattaforme per la teleriabilitazione e il telemonitoraggio e la loro validazione ha permesso di creare una piattaforma di conoscenze riutilizzabili per definire nuove strategie e nuovi approcci riabilitativi sia a livello locale che a livello nazionale. La comprensione dei meccanismi di efficacia dei servizi teleriabilitativi sarà di grande aiuto per la pianificazione di linee guida in sanità. Lo studio ha promosso strategie per l'utilizzo della telemedicina nella pratica clinica anche a livello legislativo e normativo. La scala Fugl-Meyer ha restituito una tendenza positiva tra l'inizio e la fine del trattamento, così come il Box and Block test. Il risultato ottenuto sul Nine Hole Peg Test non mostra miglioramenti per la funzionalità fine dell'arto superiore, addirittura un peggioramento. Poiché non sono stati sviluppati metodi per la riabilitazione motoria della presa fine e vista la dimensione del campione sperimentale, non è possibile una chiara comprensione del fenomeno osservato. Emerge, inoltre, una più evidente desincronizzazione dei ritmi cerebrali alla fine del trattamento, con un risultato statisticamente significativo di maggior soppressione del ritmo beta sull'emisfero lesionate durante un gesto motorio, indice di una maggiore attivazione dell'area motoria durante l'esecuzione di un task di puntamento. Riguardo ai valori restituiti dal modello di accettazione della tecnologia, tutti i domini del questionario restituiscono risultati positivi (sopra il livello neutro). La propensione all'impiego di questa tecnologia come ausilio e supporto alla riabilitazione in casa nella fase cronica dell'ictus è risultata altamente correlata a due domini del modello: il gradimento e l'utilità percepita. 8 pazienti su 10 non hanno riscontrato difficoltà nell'utilizzo del tablet e hanno apprezzato l'utilizzo di questa metodologia nel campo riabilitativo, constatando, secondo la loro esperienza riportata dalle risposte aperte al questionario al quale sono stati sottoposti, un miglioramento nella rigidità della mano.

Uno degli obiettivi era quello di fornire prove dell'applicabilità sistematica in futuro di questo approccio ed è stato quindi perseguito. C'è ancora la necessità di ottimizzare la terapia

domiciliare per garantire che la riabilitazione proposta possa essere ugualmente efficace nel fornire un intervento completo per il benessere del paziente.

## PUBBLICAZIONI

Altamura C, Brunelli N, Marcosano M, Aurilia C, Egeo G, Lovati C, Favoni V, Perrotta A, Maestrini I, Schiano Di Cola F, d'Onofrio F, Finocchi C, Bertuzzo D, Bono F, Ranieri A, Albanese M, Messina R, Doretti A, Di Piero V, Cevoli S, Barbanti P, Vernieri F, GARLIT Study Group. (2022).

**Conversion from chronic to episodic migraine in patients treated with galcanezumab in real life in Italy: the 12-month observational, longitudinal, cohort multicenter GARLIT experience.**

*Journal of Neurology*, 269(11), 5848–5857. doi:10.1007/s00415-022-11226-4

**Objective:** To investigate in real-life the conversion from chronic migraine (CM) to episodic migraine (EM), specifically to EM with High-Frequency (HFEM: 8-14 monthly migraine days, MMDs), Medium-Frequency (MFEM, 4-7 MMDs), and Low-Frequency EM (LFEM, 0-3 MMDs), and its persistence during 1 year of treatment with galcanezumab.

**Methods:** Consecutive CM patients treated with galcanezumab completing 1 year of observation were enrolled. We collected data on MMDs, pain intensity (Numeric Rating Scale, NRS score), and monthly acute medication intake (MAMI) from baseline (V1) to the 12-month visit (V12).

**Results:** Of the 155 enrolled patients, 116 (around 75%) reverted to EM at every visit and 81 (52.3%) for the entire 1-year treatment. Patients with older onset age ( $p = 0.010$ ) and fewer baseline MMDs ( $p = 0.005$ ) reverted more frequently to EM. At V12, 83 participants (53.5%) presented MFEM or LFEM. Patients reverted to MFEM or LFEM for 7 months (25th 1, 75th 11). The medication overuse discontinuation rate at V12 was 82.8% and occurred for 11 months (25th 8, 75th 12). From baseline to V12, the MAMI decreased by 17 symptomatic drugs ( $p < 0.000001$ ) while the NRS score reduced by almost 2 points ( $p < 0.000001$ ). A consistent transition to EM for the entire treatment year was observed in 81 (52.3%) patients.

**Discussion:** The 1-year GARLIT experience suggests that more than half of CM patients treated with galcanezumab persistently reverted to EM in real life.

Barbanti P, Goadsby PJ, Lambru G, Ettrup A, Christoffersen CL, Josiassen MK, Phul R, Sperling B.  
**Effects of eptinezumab on self-reported work productivity in adults with migraine and prior preventive treatment failure in the randomized, double-blind, placebo-controlled DELIVER study.**

*The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 153. doi:10.1186/s10194-022-01521-w

**Background:** The multinational phase 3b DELIVER trial was designed to evaluate the efficacy and safety of eptinezumab for migraine prevention in patients with prior preventive treatment failures across 17 countries. In the placebo-controlled portion, eptinezumab relative to placebo demonstrated greater reductions in migraine and headache frequency, migraine and headache severity, and acute medication use. The objective of this report is to describe the effects of eptinezumab on self-reported work productivity in the placebo-controlled portion of DELIVER.

**Methods:** Adults 18-75 years of age with migraine and documented evidence of 2 to 4 prior preventive treatment failures in the past 10 years were randomized to receive eptinezumab 100 mg, 300 mg, or placebo intravenously (IV) every 12 weeks. The Work Productivity and Activity Impairment questionnaire specific to migraine (WPAI:M), which comprises 6 items (4 of which are completed by currently employed patients only), was administered every 4 weeks. Changes from baseline in subscores (absenteeism, presenteeism, work productivity loss, and activity impairment) were calculated based on item responses. A mixed model for repeated measures was used to analyze changes from baseline in WPAI:M subscores.

**Results:** A total of 890 adults (mean age, 43.8 years) were included in the full analysis set (eptinezumab 100 mg,  $n = 299$ ; eptinezumab 300 mg,  $n = 293$ ; placebo,  $n = 298$ ). Mean WPAI:M subscores at baseline indicated a negative impact of migraine attacks on work productivity and ability to complete normal daily activities. Eptinezumab improved WPAI:M subscores more than placebo at all assessment points throughout the study. Mean changes from baseline in self-reported work productivity loss were -19.5, -

24.0, and -9.7 at Week 12; and -22.6, -20.2, and -7.2 at Week 24 (all  $P < 0.001$  vs placebo) for eptinezumab 100 mg, eptinezumab 300 mg, and placebo, respectively. Mean changes from baseline in activity impairment were -21.3, -23.8, and -11.2 at Week 12; and -24.7, -22.6, and -10.1 at Week 24 (all  $P < 0.0001$  vs placebo). Similarly, mean improvements in absenteeism and presenteeism were greater in the eptinezumab groups than in the groups receiving placebo at all timepoints ( $P < 0.05$ ).

Conclusion: In adults with migraine and prior preventive treatment failure, eptinezumab 100 mg and 300 mg IV every 12 weeks improved absenteeism, presenteeism, work productivity loss, and activity impairment more than placebo.

Goadsby PJ, Barbanti P, Lambru G, Ettrup A, Christoffersen CL, Josiassen MK, Phul 7, Bjørn Sperling 7

**Eptinezumab improved patient-reported outcomes and quality of life in patients with migraine and prior preventive treatment failures.**

*European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 30(4), 1089–1098. doi:10.1111/ene.15670

Background and purpose: In the phase 3b, randomized, double-blind, placebo-controlled DELIVER clinical trial, eptinezumab reduced migraine frequency and headache in adults with two to four prior preventive treatment failures. Here, the effect of eptinezumab on coinciding patient-reported outcomes is reported.

Methods: Adults were randomized to receive eptinezumab 100, 300 mg or placebo intravenously at weeks 12 and 24. The EQ-5D-5L, measuring overall patient health, and the six-item Headache Impact Test were completed every 4 weeks. The Patient Global Impression of Change was completed at weeks 4, 12 and 24. Patient-identified most bothersome symptom and the Migraine-Specific Quality of Life Questionnaire were administered at weeks 12 and 24.

Results: Eptinezumab improved patient-reported outcomes more than placebo, starting at week 4 and at all subsequent time points. By week 12, patients' overall health (EQ-5D-5L visual analog scale score) improved with eptinezumab treatment (difference from placebo in change from baseline: 100 mg, 5.1, 95% confidence interval [CI] 2.2, 8.1,  $p < 0.001$ ; 300 mg, 7.5, 95% CI 4.5, 10.4,  $p < 0.0001$ ). At week 12, eptinezumab improved headache-related quality of life (difference from placebo in change from baseline in Headache Impact Test total score: 100 mg, -3.8, 95% CI -5.0, -2.5,  $p < 0.0001$ ; 300 mg, -5.4, 95% CI -6.7, -4.2,  $p < 0.0001$ ), including each Migraine-Specific Quality of Life Questionnaire domain ( $p \leq 0.0001$ , all comparisons). Over twice as many patients receiving eptinezumab than placebo reported much or very much improvement on the Patient Global Impression of Change and patient-identified most bothersome symptom.

Conclusion: Patients with two to four prior preventive treatment failures receiving eptinezumab versus placebo reported greater improvements in well-being, quality of life and most bothersome symptoms compared to placebo.

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, d'Onofrio F, Albanese M, Cetta I, Di Fiore P, Zucco M, Filippi M, Bono F, Altamura C, Proietti S, Bonassi S, Vernieri F; FRIEND-Study Group.

**Fremanezumab in the prevention of high-frequency episodic and chronic migraine: a 12-week, multicenter, real-life, cohort study (the FRIEND study).**

*The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 46. doi:10.1186/s10194-022-01396-x

Background: Fremanezumab has demonstrated to be effective, safe, and tolerated in the prevention of episodic or chronic migraine (CM) in randomized, placebo-controlled trials (RCTs). Real-life studies are needed to explore drug effects in unselected patients in routine circumstances and to provide higher generalizability results. This study explores the effectiveness, safety, and tolerability of fremanezumab in a real-life population of individuals affected by high-frequency episodic (HFEM: 8-14 days/month) or CM.

**Methods:** This is a 12-week multicenter, prospective, cohort, real-life study. We considered all consecutive patients affected by HFEM or CM visited at 9 Italian headache centers from 28/07/2020 to 11/11/2020. Eligible patients were given subcutaneous fremanezumab at the doses of 225 mg monthly or 675 mg quarterly, according to their preference. Primary study endpoints were the change in monthly migraine days (MMDs) in HFEM and monthly headache days (MHDs) in CM patients at weeks 9-12 compared to baseline. Secondary endpoints encompassed variation in monthly analgesic intake (MAI), Numerical Rating Scale (NRS), HIT-6 and MIDAS scores, and  $\geq 50\%$ ,  $\geq 75\%$  and 100% responder rates at the same time intervals.

**Results:** Sixty-seventh number migraine patients had received  $\geq 1$  subcutaneous fremanezumab dose and were considered for safety analysis, while 53 patients completed 12 weeks of treatment and were included also in the effectiveness analysis. Fremanezumab was effective in both HFEM and CM, inducing at week 12 a significant reduction in MMDs (-4.6,  $p < 0.05$ ), MHDs (-9.4,  $p < 0.001$ ), MAI (-5.7,  $p < 0.05$ ; -11.1,  $p < 0.001$ ), NRS (-3.1,  $p < 0.001$ ; -2.5,  $p < 0.001$ ), and MIDAS scores (-58.3,  $p < 0.05$ ; -43.7;  $p < 0.001$ ). HIT-6 was significantly reduced only in HFEM patients (-18.1,  $p < 0.001$ ). Remission from CM to episodic migraine and from MO to no-MO occurred in 75% and 67.7% of the patients. The  $\geq 50\%$ ,  $\geq 75\%$  and 100% responder rates at week 12 were 76.5%, 29.4% and 9.9% in HFEM and 58.3%, 25% and 0% in CM. Younger age emerged as a positive response predictor (OR = 0.91; 95% CI 0.85-0.98,  $p = 0.013$ ). Treatment-emergent adverse events were uncommon (5.7%) and mild. No patient discontinued fremanezumab for any reason.

Fofi L, Altamura C, Fiorentini G, Brunelli N, Marcosano M, Barbanti P, Vernieri F.

**Improving distress perception and mutuality in migraine caregivers after 6 months of galcanezumab treatment.**

*Headache*, 62(9), 1143–1147. doi:10.1111/head.14400

**Objective:** This prospective cohort, real-life study aimed to evaluate whether galcanezumab, a monoclonal antibody anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP) ligand, can reduce caregivers' distress and improve their mutuality with patients.

**Background:** Migraine is a highly disabling chronic disease that negatively impacts patients' and often their relatives' lives, occurring during an active phase of life with direct consequences on leisure- and work-related activities. The figure of caregiver is crucial in several neurological conditions but poorly accounted for in migraine care so far. Studies on monoclonal antibodies against the CGRP pathway, recently introduced as migraine-preventive treatments, demonstrated that they significantly reduce migraine frequency and disability in the first weeks of treatment.

**Methods:** Consecutive patient-caregiver dyads were evaluated at baseline and after 6 months of treatment with galcanezumab (V6) at our headache center from September 2020 to September 2021. Enrolled patients were requested to report their monthly migraine days, monthly intake of acute medications, attack pain intensity (on the Numeric Rating Scale), concomitant preventives, and disability questionnaires (Headache Impact Test, Migraine Disability Assessment). Each dyad filled in the Mutuality Scale to check their reciprocity; moreover, the Relatives' Stress Scale was used to detect caregivers' distress.

**Results:** We enrolled 27 patient-caregiver dyads. At 6 months, migraine burden significantly improved with reductions in monthly migraine days (falling from 14.8 [SD = 4.8] days by 10.3 [SD = 4.8] days; 95% CI: 8.4, 12.2;  $p < 0.001$ ) and Migraine Disability Assessment scores (lowering from 83.6 [SD = 46.7] by 71.5 points [SD = 49.3]; 95% CI: 51.2, 91.9;  $p < 0.001$ ). From baseline to month 6, the caregiver Relatives' Stress Scale score significantly decreased (falling from 20.7 [SD = 13.7] by 6.5 [SD = 14.1] points; 95% CI: 0.8, 12.2;  $p = 0.027$ ), while the Mutuality Scale's caregiver total score increased (from 3.04 [SD = 0.61] by 0.29 [SD = 0.49] points; 95% CI: -0.508, -0.064;  $p = 0.014$ ).

**Conclusions:** Our findings preliminarily demonstrated that patients' migraine improvement after 6 months of galcanezumab treatment could be favorably perceived by caregivers, significantly reducing their distress with better reciprocity within the dyad.

Vernieri, F., Brunelli, N., Marcosano, M., Aurilia, C., Egeo, G., Lovati C, Favoni V, Perrotta A, Maestrini I, Rao R, d'Onofrio L, Finocchi C, Aguggia M, Bono F, Ranieri A, Albanese M, Di Piero V, Cevoli S, Altamura C, Barbanti P, GARLIT Study Group. (2023).

**Maintenance of response and predictive factors of 1-year GalcanezumAb treatment in real-life migraine patients in Italy: The multicenter prospective cohort GARLIT study.**

*European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 30(1), 224–234. doi:10.1111/ene.15563

Background and purpose: To evaluate the 1-year effectiveness and tolerability of galcanezumab in real life and the prognostic indicators of persistent response.

Methods: High-frequency episodic migraine (HFEM) and chronic migraine (CM) patients treated with galcanezumab who completed a 1-year observation were enrolled. The primary outcomes assessed during the 12 months (V1-V12) were the change in monthly migraine days (MMDs) from baseline and the response rates  $\geq 50\%$  in MMDs (MMD  $\geq 50\%$  RR). The secondary outcomes were changes in pain intensity (numerical rating scale [NRS]) and in monthly acute medication intake (MAMI).

Results: We enrolled 191 patients (77.5% CM). Twenty-three patients (12%) dropped out, two for nonserious adverse events. At least 40% of patients took add-on standard preventives from baseline to V12. At V12, MMDs were reduced by 6.0 days in HFEM and by 11.9 days in CM patients (both  $p < 0.00001$ ); NRS and MAMI were also decreased in both groups ( $p < 0.00001$ ). One-hundred eight (56.5%) patients presented MMD  $\geq 50\%$  RR for 9 cumulative months (interquartile range=8): we defined this value as the cutoff for a persistent response. Persistent responders were less likely to have a higher body mass index (BMI) ( $p = 0.007$ ) but more frequently had a good response to triptans ( $p = 0.005$ ) and MMD  $\geq 50\%$  RR at V1 ( $p < 0.0000001$ ). Patients without a persistent response were on add-on therapy for longer periods of time ( $p < 0.001$ ).

Conclusions: Galcanezumab was effective and well-tolerated in the 1-year term, with most patients presenting MMD  $\geq 50\%$  RR for at least 9 months. Triptan response, lower BMI, and MMD  $\geq 50\%$  RR in the first month emerged as predictive factors for a persistent response.

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Altamura C, d'Onofrio F, Finocchi C, Albanese M, Aguggia M, Rao R, Zucco M, Frediani F, Filippi M, Messina R, Cevoli S, Carnevale A, Fiorentini G, Messina S, Bono F, Torelli P, Proietti S, Bonassi S, Vernieri F; Italian Migraine Registry study group.

**Predictors of response to anti-CGRP monoclonal antibodies: a 24-week, multicenter, prospective study on 864 migraine patients.**

*The Journal of Headache and Pain*, 23(1), 138. doi:10.1186/s10194-022-01498-6

Background and objectives: The identification of predictors of response to antiCGRP mAbs could favor tailored therapies and personalized treatment plans. This study is aimed at investigating predictors of  $\geq 50\%$ ,  $\geq 75\%$  and 100% response at 24 weeks in patients with high-frequency episodic (HFEM: 8-14 days/month) or chronic migraine (CM).

Methods: This is a large, multicenter, cohort, real-life study. We considered all consecutive adult patients affected by HFEM or CM who were prescribed antiCGRP mAbs for  $\geq 24$  weeks in 20 headache centers. Patients were interviewed face-to-face using a shared semi-structured questionnaire carefully exploring socio-demographic and clinical characteristics. Patients received subcutaneous erenumab (70 mg or 140 mg, monthly), galcanezumab (120 mg monthly, following a 240 mg loading dose), or fremanezumab (225 mg, monthly or 675 mg, quarterly) according to drug market availability, physician's choice, or patient's preference. The primary endpoint of the study was the assessment of  $\geq 50\%$  response predictors at 24 weeks. Secondary endpoints included  $\geq 75\%$  and 100% response predictors at 24 weeks.

Results: Eight hundred sixty-four migraine patients had been treated with antiCGRP mAbs for  $\geq 24$  weeks (erenumab: 639 pts; galcanezumab: 173 pts; fremanezumab: 55 pts). The  $\geq 50\%$  response (primary endpoint) in HFEM was positively associated with unilateral pain (UP) + unilateral cranial autonomic symptoms (UAs) (OR:4.23, 95%CI:1.57-11.4;  $p = 0.004$ ), while in CM was positively associated

with UAs (OR:1.49, 95%CI:1.05-2.11; p = 0.026), UP + UAs (OR:1.90, 95%CI:1.15-3.16; p = 0.012), UP + allodynia (OR:1.71, 95%CI:1.04-2.83; p = 0.034), and negatively associated with obesity (OR:0.21, 95%CI:0.07-0.64; p = 0.006). The 75% response (secondary endpoint) was positively associated with UP + UAs in HFEM (OR:3.44, 95%CI:1.42-8.31; p = 0.006) and with UP + UAs (OR:1.78, 95%CI:1.14-2.80; p = 0.012) and UP + allodynia (OR:1.92, 95%CI:1.22-3.06; p = 0.005) in CM. No predictor of 100% response emerged in patients with HFEM or CM.

Conclusions: A critical evaluation of headache characteristics indicating peripheral or central sensitization may help in predicting responsiveness to antiCGRP mAbs in HFEM and CM. A more precise pain profiling may represent a steppingstone for a mechanism-based approach and personalized treatment of migraine with compounds targeting specific molecular mechanisms.

Vernieri, F., Altamura, C., Brunelli, N., Costa, C. M., Aurilia, C., Egeo, G., Fofi L, Favoni V, Lovati C, Bertuzzo D, d'Onofrio F, Doretto A, Di Fiore P, Finocchi C, Schiano Di Cola F, Ranieri A, Colombo B, Bono F, Albanese M, Cevoli S, Barbanti P, GARLIT Study Group.

**Rapid response to galcanezumab and predictive factors in chronic migraine patients: A 3-month observational, longitudinal, cohort, multicenter, Italian real-life study.**

*European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 29(4), 1198–1208. doi:10.1111/ene.15197

Background and purpose: A rapid response to preventive therapy is of pivotal importance in severely disabled patients with chronic migraine (CM) and diverse preventive treatment failures. This prospective, observational, multicenter real-life study aimed at investigating the effectiveness of galcanezumab in the first 3 months of treatment of CM patients at 14 Italian headache centers.

Methods: All consecutive adult patients with CM diagnosis with the clinical indication for galcanezumab were considered. We collected patients' baseline characteristics, monthly headache days, monthly painkiller intake, migraine clinical characteristics, and disability scale scores during a 1-month run-in period (baseline) and the first 3 months of therapy. Possible predictive factors of treatment were considered.

Results: A total of 156 patients (82.4% female, aged  $47.3 \pm 12.3$  years) were enrolled. The 65 (41.7%) patients with a consecutive  $\geq 50\%$  response rate (RR) in the 3 months of therapy presented a lower body mass index (p = 0.004) and more frequently presented unilateral migraine pain (p = 0.002) and good response to triptans (p = 0.003). Persistent conversion from CM to episodic migraine was observed in 55.8% (87/156) of patients. They more frequently presented a good response to triptans (p = 0.003) and unilateral pain (p = 0.046). At baseline, 131 of 156 (83.9%) patients presented medication overuse (MO). Of these, 61.8% (81/131) no longer displayed MO consistently during the 3 months. These patients were more frequently responders to triptans (p = 0.002) and less frequently suffered from gastrointestinal comorbidity (p = 0.007).

Conclusions: Unilateral pain, good response to triptans, and normal weight may be associated with a persistent positive response in the first 3 months of therapy with galcanezumab in CM patients.

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Fiorentini G, Proietti S, Tomino C, Bonassi S, Italian Migraine Registry Study Group Italian Migraine Registry Study Group. (2022).

**The first report of the Italian Migraine Registry (I-GRAINE).**

*Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 43(9), 5725–5728. doi:10.1007/s10072-022-06214-5

Italian Migraine Registry (I-GRAINE) is a multicenter (n = 38), prospective, observational, non-interventional study aimed at providing big data on migraine to ensure proper clinical disease management, according to scientific, and sustainability criteria. We enrolled consecutive patients affected by episodic or chronic migraine according to the systematic random method. Information on sociodemographic characteristics, lifestyle, migraine features, patient's journey, and healthcare resource use were gathered using face-to-face interviews. On the date of 31 December 2021, we



enrolled 231 patients at 12 headache centers. Most of them were women (84.4%), with high migraine frequency ( $9.6 \pm 6.9$  days/month) and severe disability (MIDAS score:  $43.0 \pm 40.8$ ; HIT-6 score:  $60.4 \pm 10.6$ ). Only a minority of patients (38.1%) had previously visited a headache center. A clear-cut difference emerged in the proportion of responders to nonspecific acute treatments (43.5-66.7%) compared to triptans (76.3%) and in responders to unspecific prophylaxis (5.4-35%) compared to anti-CGRP monoclonal antibodies (69.2-78.6%). Most patients underwent  $\geq 1$  specialist visit (66.9%) or diagnostic investigation (77.4%) over the last 3 years—mostly subsidized by our national health system—inappropriate in 64.9% and 25% of the cases, respectively. The I-GRAINE registry is expected to provide a large and exponentially increasing collection of clinical, biological, and epidemiologic information and will contribute to moving migraine out of the shadow cone of marginalization, which has been often relegated up to now.

Altamura C, Cevoli S, Brunelli N, Aurilia C, Fofi L, Egeo G, Barbanti P, Vernieri F, GARLIT Study Group collaborators.

**When should we consider chronic patients as non-responders to monoclonal antibodies targeting the CGRP pathway?**

*Journal of Neurology*, 269(2), 1032–1034. doi:10.1007/s00415-021-10772-7

Spina E, Tedeschi G, Russo A, Trojsi F, Iodice R, Tozza S, Iovino A, Iodice F, Abbadessa G, di Lorenzo F, Miele G, Maida E, Cerullo G, Sparaco M, Silvestro M, Leocani L, Bonavita S, Manganeli F, Lavorgna L; Digital Technologies D, Web and Social Media Study Group of the Italian Society of Neurology (SIN).

**Telemedicine application to headache: a critical review.**

*Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 43(6), 3795–3801. doi:10.1007/s10072-022-05910-6

Background: Migraine affects more than a billion people all over the world and requires critical employment of healthcare resources. Telemedicine could be a reasonable tool to manage people suffering from headaches, and it received a big push from the COVID-19 pandemic.

Objective: This review aims to propose a practical approach for the virtual management of these patients.

Methods: To do this, we conducted a literature search, including 32 articles relevant to the topic treated in this review.

Results: The most challenging step in telemedicine applied to practical neurology remains the clinical assessment, but through a careful headache history and a recently proposed entirely virtual neurological assessment, this hitch can be easily overcome. Electronic diary compilations and virtual administration of disability-measuring scales, conversely, are the key features of effective long-term follow-up although we do not have apps that met the criteria of scientific reliability. Furthermore, tele-rehabilitation seems to be effective and has demonstrated to be a solution to alternatively treat chronic patients at home, and can be considered part of the remote management of headache patients. Moreover, virtual management of headaches finds an application in specific communities of patients, as pediatric patients and for rural communities of low- and middle-income countries suffer from health disparities, with inadequate resources and knowledge gaps.

Conclusion: Telemedicine could be promising for patients with no regular or convenient access to headache specialists and seems to be a priority in managing migraine patients to avoid non-urgent hospitalizations.

Goffredo M, Proietti S, Pournajaf S, Galafate D, Cioeta M, Le Pera D, Posteraro F, Franceschini, M. (2022). **Baseline robot-measured kinematic metrics predict discharge rehabilitation outcomes in individuals with subacute stroke.**

*Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 10, 1012544. doi:10.3389/fbioe.2022.1012544*

Background: The literature on upper limb robot-assisted therapy showed that robot-measured metrics can simultaneously predict registered clinical outcomes. However, only a limited number of studies correlated pre-treatment kinematics with discharge motor recovery. Given the importance of predicting rehabilitation outcomes for optimizing physical therapy, a predictive model for motor recovery that incorporates multidirectional indicators of a patient's upper limb abilities is needed. Objective: The aim of this study was to develop a predictive model for rehabilitation outcome at discharge (i.e., muscle strength assessed by the Motricity Index of the affected upper limb) based on multidirectional 2D robot-measured kinematics. Methods: Re-analysis of data from 66 subjects with subacute stroke who underwent upper limb robot-assisted therapy with an end-effector robot was performed. Two least squares error multiple linear regression models for outcome prediction were developed and differ in terms of validation procedure: the Split Sample Validation (SSV) model and the Leave-One-Out Cross-Validation (LOOCV) model. In both models, the outputs were the discharge Motricity Index of the affected upper limb and its sub-items assessing elbow flexion and shoulder abduction, while the inputs were the admission robot-measured metrics. Results: The extracted robot-measured features explained the 54% and 71% of the variance in clinical scores at discharge in the SSV and LOOCV validation procedures respectively. Normalized errors ranged from 22% to 35% in the SSV models and from 20% to 24% in the LOOCV models. In all models, the movement path error of the trajectories characterized by elbow flexion and shoulder extension was the significant predictor, and all correlations were significant. Conclusion: This study highlights that motor patterns assessed with multidirectional 2D robot-measured metrics are able to predict clinical evaluation of upper limb muscle strength and may be useful for clinicians to assess, manage, and program a more specific and appropriate rehabilitation in subacute stroke patients.

Aprile I, Conte C, Cruciani A, Pecchioli C, Castelli L, Insalaco S, Germanotta M, Iacovelli C.

**Efficacy of robot-assisted gait training combined with robotic balance training in subacute stroke patients: A randomized clinical trial.**

*Journal of Clinical Medicine, 11(17), 5162. doi:10.3390/jcm11175162*

Recently, the use of robotic technology in gait and balance rehabilitation of stroke patients has been introduced, with positive results. The purpose of this study was to evaluate the effectiveness of robotic gait and trunk rehabilitation compared to robotic gait training alone on balance, activities, and participation measures in patients with subacute stroke. The study was a randomized, controlled, single blind, parallel group clinical trial. Thirty-six patients with first ischemic or hemorrhagic stroke event were enrolled, and they were randomized in two groups: Gait Group (GG), where they received only robotic treatment for gait rehabilitation through an end-effector system, and Gait/Trunk Group (GTG) where they performed end-effector gait rehabilitation and balance with a robotic platform, 3 times/week for 12 sessions/month. At the end of the study, there was an improvement in balance ability in both groups. Instead, the lower limb muscle strength and muscle tone significantly improved only in the GTG group, where we found a significant reduction in the trunk oscillations and displacement during dynamic exercises more than the GG group. The robotic platform which was added to the gait robotic treatment offers more intense and controlled training of the trunk that positively influences the tone and strength of lower limb muscles.

Goffredo M, Romano P, Infarinato F, Cioeta M, Franceschini M, Galafate D, Iacopini R, Pournajaf S, Ottaviani, M.

**Kinematic analysis of exoskeleton-assisted community ambulation: An observational study in outdoor real-life scenarios.**

Background: In neurorehabilitation, Wearable Powered Exoskeletons (WPEs) enable intensive gait training even in individuals who are unable to maintain an upright position. The importance of WPEs is not only related to their impact on walking recovery, but also to the possibility of using them as assistive technology; however, WPE-assisted community ambulation has rarely been studied in terms of walking performance in real-life scenarios. (2) Methods: This study proposes the integration of an Inertial Measurement Unit (IMU) system to analyze gait kinematics during real-life outdoor scenarios (regular, irregular terrains, and slopes) by comparing the ecological gait (no-WPE condition) and WPE-assisted gait in five able-bodied volunteers. The temporal parameters of gait and joint angles were calculated from data collected by a network of seven IMUs. (3) Results: The results showed that the WPE-assisted gait had less knee flexion in the stance phase and greater hip flexion in the swing phase. The different scenarios did not change the human-exoskeleton interaction: only the low-speed WPE-assisted gait was characterized by a longer double support phase. (4) Conclusions: The proposed IMU-based gait assessment protocol enabled quantification of the human-exoskeleton interaction in terms of gait kinematics and paved the way for the study of WPE-assisted community ambulation in stroke patients.

## **LINEA 4**

### **Progetti in rete**

---

## **AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO**

*Caratterizzazione clinica e genetica dei pazienti affetti da malattia di Parkinson - Studio di rete "PARK-NET 3"*

Istituti Virtuali Nazionali Demenze, Malattia di Parkinson e disordini del movimento, sclerosi multipla e disordini neuroimmunologici

I due principali obiettivi dello studio sono:

- effettuare uno screening genetico mirato ad individuare l'incidenza della mutazione nel gene GBA
- raccogliere e condividere le informazioni cliniche, strumentali e genetiche in una piattaforma condivisa RedCap.

Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele, nel mese di Giugno 2022.

Il Centro ha contribuito con l'analisi genetica della seguente casistica:

Totali pazienti:206

Negativi: 177

Positivi GBA: 16

Altre varianti patogeniche: 5

## **AREA DI RICERCA CARDIOLOGIA RIABILITATIVA, TELEMEDICINA E E-HEALTH**

### **Rete cardiologica**

*Manifestazioni cardiovascolari in Long Covid: Evidenze Diagnostiche, Meccanismi Trombotici, Infettivi, Immunologici, Infiammatori Cellulari e Tissutali*

Le biobanche sono unità di servizio, senza scopo di lucro diretto, finalizzate alla raccolta e alla conservazione di materiale biologico (sangue, plasma, siero, urine, cellule, tessuti, acidi nucleici e proteine), unitamente alle informazioni cliniche ad esso associate, da utilizzare in studi di ricerca clinica e traslazionale. Per tale motivo esse rappresentano infrastrutture essenziali per la ricerca biomedica, con l'obiettivo prioritario di distribuire materiali biologici e le informazioni ad essi collegate alla comunità scientifica.

Sulla base di quanto sopra riferito, la Rete degli IRCCS Cardiologici ha ipotizzato l'importanza dell'implementazione della Biobanca Diffusa della Rete degli IRCCS Cardiologici al fine di creare una raccolta dedicata di campioni biologici e dati clinici associati di pazienti COVID-19, Long e Post COVID qualitativamente appropriati da mettere a disposizione per i progetti di ricerca scientifica condivisi dalla Rete.

L'obiettivo primario del progetto è stato quello di creare una Biobanca Diffusa COVID della Rete Cardiologica (di cui la BioBIM fa parte) per la raccolta, lo stoccaggio e la distribuzione di campioni biologici e dati associati di pazienti con COVID-19, Long COVID e Post COVID asintomatici – ottenuti durante la fase acuta della malattia e/o nel follow-up – per lo sviluppo e la realizzazione di progetti di ricerca multicentrica condivisi tra gli istituti della Rete Cardiologica mirati non solo al COVID-19 ma anche alle patologie correlate e/o sviluppatasi in seguito all'infezione.

La creazione di una raccolta armonizzata di campioni biologici associata ad un database dettagliato e condiviso per la raccolta di dati clinici e di imaging, permette di caratterizzare il coinvolgimento multi-sistemico, ed in particolare quello cardiovascolare, sia nei pazienti COVID-19 che in quelli Long e Post COVID.

Il progetto, in coerenza con i programmi Nazionali e Comunitari, dedica una forte attenzione alla armonizzazione e standardizzazione della raccolta di campioni biologici attraverso la pubblicazione e l'adozione di Procedure Operative Standard (SOPs).

Nell'ambito del progetto in fase di rendicontazione, la BioBIM ha provveduto al collezionamento di campioni biologici di pazienti con COVID-19, Long-COVID e pazienti Post COVID. Per ogni paziente sono disponibili i seguenti dati clinici associati: età, sesso, giorni di degenza, data della diagnosi ed eventuale data del decesso, pressione sistolica e diastolica, frequenza cardiaca, temperatura, SPO2, presenza di polmonite, esito tampone/i molecolare, comorbidità, esami di laboratorio, esami strumentali (RX torace, TC torace, Ecocardiogramma), nonché informazioni sulla terapia. Per ogni paziente sono altresì disponibili dati anamnestici relativi a interventi chirurgici, allergie, intolleranze, abitudini alimentari, ecc.

Il progetto si è positivamente concluso nel dicembre 2022. Le SOPs dedicate alla raccolta di questi campioni sono state elaborate e condivise da tutte le biobanche partecipanti alla Rete. Per quanto attiene alla raccolta dei campioni biologici, la BioBIM ha reclutato campioni biologici da 68 pazienti con COVID-19, per ciascuno dei quali sono disponibili aliquote di: sangue in toto EDTA (n=134), plasma EDTA (n=273), plasma citratato (n=383) e siero (n=363). Inoltre, per 11 pazienti sono disponibili campioni aggiuntivi durante il follow-up clinico con un totale di 174 aliquote (22 sangue in toto EDTA, 40 plasma EDTA, 59 plasma citratato, 53 siero).

#### *Creazione e validazione della BioBanca Diffusa CARDIOvascolare degli IRCCS: BBDCARDIO*

Le biobanche sono unità di servizio, senza scopo di lucro diretto, finalizzate alla raccolta e alla conservazione di materiale biologico (sangue, plasma, siero, urine, cellule, tessuti, acidi nucleici e proteine), unitamente alle informazioni cliniche ad esso associate, da utilizzare in studi di ricerca clinica e traslazionale. Per tale motivo esse rappresentano infrastrutture essenziali per la ricerca biomedica, con l'obiettivo prioritario di distribuire materiali biologici e le informazioni ad essi collegate alla comunità scientifica.

Sulla base di quanto sopra riferito, la Rete degli IRCCS Cardiologici ha ipotizzato l'importanza della creazione di una Biobanca Diffusa della Rete degli IRCCS Cardiologici al fine di creare una raccolta armonizzata di campioni biologici associata ad un database dettagliato e condiviso per la raccolta di dati clinici e di imaging, da mettere a disposizione per i progetti di ricerca scientifica condivisi dalla Rete.

L'obiettivo primario del progetto in fase di rendicontazione è stato quello di creare una Biobanca Diffusa della Rete Cardiologica per la raccolta, lo stoccaggio e la distribuzione di campioni biologici e dati clinici e di imaging associati per lo sviluppo e la realizzazione di progetti di ricerca multicentrica condivisi tra gli istituti della Rete Cardiologica.

La creazione di una raccolta armonizzata di campioni biologici associata ad un database dettagliato e condiviso per la raccolta di dati clinici e di imaging, permetterà di eseguire progetti di ricerca multicentrica condivisi tra gli istituti della Rete Cardiologica.

Il progetto, in coerenza con i programmi Nazionali e Comunitari, dedica una forte attenzione alla armonizzazione e standardizzazione della raccolta di campioni biologici da parte delle biobanche partecipanti attraverso la pubblicazione e l'adozione di Procedure Operative Standard (SOPs).

I campioni biologici vengono prelevati da pazienti che rientrano nei criteri di inclusione del progetto e hanno acconsentito a partecipare firmando il consenso informato. I campioni di

sangue (cell pellet per estrazione del DNA, siero, plasma citratato e plasma EDTA) vengono prelevati da personale qualificato per il prelievo. Il materiale biologico per il progetto CV-PREVITAL deve provenire da raccolte dedicate al progetto e non da left-over di campioni raccolti per analisi di laboratorio.

Il progetto è stato avviato nel corso del 2022. Allo stato dell'arte, sono state elaborate e condivise da tutte le biobanche partecipanti alla Rete le SOPs dedicate alla raccolta dei campioni. Al fine di uniformare le modalità di raccolta, è stata avviata l'acquisizione del materiale necessario per la processazione e lo stoccaggio dei campioni biologici. Più recentemente è stato attivato il reclutamento dei casi da acquisire da parte della BioBIM nell'ambito del progetto CV-PREVITAL.

La BioBIM è impegnata nella raccolta di campioni di DNA da 150 pazienti sui quali verrà effettuata la determinazione del profilo del metabolismo lipidico e glucidico al tempo 0, durante ed alla fine del percorso riabilitativo per la valutazione di biomarcatori ematochimici supplementari.

## LABORATORIO DI ENDOCRINOLOGIA CARDIOVASCOLARE

*Responder/non-responder in clinical trials of medication treatment for CVD, Omics analyses in these subjects, Bioinformatical analyses to derive signature, validation in additional cohorts/Trials and animal models, final molecular signature by bioinformatics – MATCH - Reference Number ERAPERMED2018-226*

Le malattie cardiovascolari rappresentano la causa principale di mortalità e morbilità nella Comunità Europea, e questo determina un impatto socioeconomico enorme poiché fanno aumentare la spesa annua di circa 200 miliardi di Euro. La medicina basata sulle evidenze, ha consentito un notevole avanzamento nel trattamento delle malattie coronariche (CHD), e il suo progresso è stato favorito dagli studi interventistici multicentrici. Nonostante ciò nell'ultimo decennio, la maggior parte degli studi clinici su larga scala ha raggiunto differenze statisticamente significative solamente nel risultato finale, ma è risultato scarsamente efficace nel ridurre in modo rilevante il rischio residuo. Perciò sono divenuti urgenti approcci innovativi che consentano di superare questo orientamento e di promuovere una farmacoterapia individualizzata nel trattamento delle CHD. Durante lo svolgimento del **MATCH**, si utilizza un approccio interdisciplinare e traslazionale che consente di integrare le conoscenze provenienti dalle analisi di un fenotipo molecolare che raggruppi ciò che è noto dalle "Omics technologies", dall'epidemiologia cardiovascolare, dall'"imaging", dalla bioinformatica, dalla statistica e dalla biologia molecolare. **MATCH** trae origine da dati noti di fenotipi-genotipi individualizzati provenienti da differenti studi clinici nell'ambito delle CHD, da dati di immagini funzionali, da evidenze provenienti da coorti epidemiologiche e da biobanche, da metodologie bioinformatiche e da modelli animali. La bioinformatica che si serve di modelli di apprendimento basati sui computer, è in grado di generare un pannello caratteristico di biomarcatori come responsivi o non-responsivi considerando una varietà di studi sui lipidi cardiovascolari. Questo profilo di biomarcatori sarà ottimizzato in modelli murini prone all'aterosclerosi e su gruppi di pazienti. Il profilo così ottenuto è validato su un secondo sottogruppo di pazienti arruolati nello studio e, in ultimo, è trasferito in uno studio longitudinale già in essere, basato sull'"imaging" (OCT) che ha come scopo quello di valutare la progressione dell'aterosclerosi in pazienti con CHD. **MATCH** consente di 1) tracciare la strada per l'utilizzo di metodi accessibili per il trattamento mirato delle malattie cardiovascolari (CVD), 2) esplorare la fisiopatologia ed il profilo delle risposte individuali alle terapie preventive, e 3)

servirsi della medicina personalizzata per la cura dei pazienti utilizzando una farmacoterapia individualizzata.

Facendo riferimento al “German Heart Report” del 2016, circa 420,000 individui hanno subito un evento ischemico acuto. Ciò si traduce in circa 3.5 milioni di eventi in Europa. In accordo con le attuali linee guida questi pazienti vengono sottoposti a una terapia di controllo del profilo lipidico, somministrando in particolare statine, ezetimibe, e inibitori della PCSK9. Tuttavia, il rischio residuo, per esempio l’incidenza di eventi ischemici secondari, che permane durante la terapia indicata dalle linee guida, risulta tuttora troppo elevato. Circa i due terzi di questi pazienti vanno incontro a eventi coronarici secondari nell’arco di 10 anni. Il trattamento individualizzato delle malattie cardiovascolari risulta necessario al fine di ridurre mortalità e morbilità associate a eventi coronarici, e per ridurre a lungo termine, i problemi socioeconomici e di salute pubblica originati dalle malattie cardiovascolari.

Circa 3.5 milioni di persone in Europa ogni anno sono soggette a un evento ischemico acuto. Approssimativamente i due terzi sono soggetti a eventi coronarici secondari nei 10 anni di follow up successivi. La maggior parte degli studi clinici su larga scala, effettuati nell’ultimo decennio, sono risultati scarsamente efficaci nel ridurre in modo rilevante il rischio residuo. Perciò sono divenuti necessari approcci innovativi che consentano di superare questo andamento e di promuovere quindi una farmacoterapia individualizzata nel trattamento delle malattie coronariche. La rete traslazionale ha arruolato forze che possono servirsi efficientemente di tutti i dati e le conoscenze finora disponibili in grado facilitare la messa a punto di una terapia individualizzata delle CHD da un punto di vista multidisciplinare e sinergistico. Le scoperte scientifiche e l’organizzazione infrastrutturale raggiunta in seno ai gruppi facenti parte del nostro network (per es. gruppi epidemiologici e già arruolati in trials clinici con fenotipi dettagliati e inseriti in biobanche corredati di conoscenza esaustiva nella gestione dati e nelle discipline legali e etiche; tecniche sperimentali di biologia molecolare e con uso di modelli animali standardizzate; studio clinico basato sull’“imaging” coronarico ; infrastrutture bioinformatiche ad alto potenziale a disposizione) costituiscono basi eccellenti per consentire di aumentare le potenzialità di applicazioni ad ampio raggio degli studi interdisciplinari.

Per raggiungere i gli obiettivi sono stati organizzati 5 gruppi di lavoro (WPs) complementari:

WP1: Valutazione e correlazione di “OMICs technologies” disponibili derivanti da tutti i “clinical trials”.

WP2: Derivazione bioinformatica e validazione del profilo di biomarcatori.

WP3: Validazione del profilo di marcatori in gruppi di soggetti malati, in un sottogruppo di individui afferenti al clinical trial e in modelli animali di aterosclerosi.

WP4: Applicazione traslazionale nel Clinical trial OTC WP5: Gestione del progetto che avendo un approccio traslazionale e clinico necessita di particolare attenzione per quanto concerne problematiche riguardanti l’etica e la raccolta di dati sensibili.

Ad oggi non sono disponibili approcci sistemici interdisciplinari su larga scala per una terapia di controllo lipidico. MATCH rappresenta un network interdisciplinare di ricercatori giovani e dinamici in grado di integrare la conoscenza relativa alle malattie cardiovascolari e all’epidemiologia, con la bioinformatica, la statistica, la biologia molecolare e la fisiologia. Tutti i ricercatori afferenti al progetto possiedono una lunga esperienza nel loro settore di ricerca e condividono la loro esperienza e le risorse disponibili per complementarsi a vicenda e lavorare in stretta sinergia. Inoltre tutti i membri del consorzio trarranno benefici da network professionali instaurati nel corso degli anni con altri istituti che si distinguono nel campo delle malattie cardiovascolari e nell’ approccio alla medicina personalizzata.

Materiali:



WP3: Modelli murini di aterosclerosi. Per determinare lo sviluppo di aterosclerosi nel gruppo sperimentale di topi ApoE KO, topi maschi e femmine di età compresa tra 9 e 10 settimane, sono stati sottoposti a trattamento con Aldosterone e a dieta aterogena (con 42% di contenuto in grassi) per quattro settimane. Sono stati utilizzati sia maschi che femmine per valutare se nei topi di sesso femminile la presenza di estrogeni possa ulteriormente migliorare la protezione dall'aterosclerosi. Infatti l'azione degli estrogeni nei topi di sesso femminile potrebbe aggiungersi agli effetti protettivi sull'aterosclerosi. La dieta utilizzata è una dieta commerciale (Envigo) che accelera lo sviluppo di ipercolesterolemia e di placche aterosclerotiche. Durante le 4 settimane di dieta aterogena ciascuno dei due gruppi è stato trattato con Aldosterone (ALDO, 6 µg/Kg al giorno) tramite minipompa, o con soluzione di controllo. Oltre al gruppo sperimentale ApoE KO ALDO o ApoE KO (gruppo di controllo), sono stati trattati con Aldosterone anche un gruppo sperimentale di topi C57BL6 wild type di 9-10 settimane (maschi e femmine) che rappresenta un secondo gruppo di controllo (per analizzare l'effetto specifico di Aldosterone).

Le minipompe sono state lasciate negli animali dei tre gruppi sperimentali per 4 settimane.

Al termine della dieta aterogena e del trattamento con ALDO (o soluzione di controllo) è stato effettuato un prelievo di sangue periferico dal plesso sub-mandibolare per ottenere il plasma e stoccato a -80°C in aliquote. Successivamente al prelievo di sangue, gli animali sono stati sacrificati e sono stati dissecati cuore, aorta, depositi di grasso (sottocutaneo, viscerale ed interscapolare), reni e milza che sono stati stoccati.

I campioni di plasma e tessuti ottenuti dal sacrificio degli animali utilizzati nel protocollo sperimentale, sono stati interamente spediti in Germania dove si stanno ultimando le analisi per valutare l'espressione dei marcatori identificati attraverso gli studi di bioinformatica, nel modello animale.

L'impatto clinico di MATCH risulta fondamentale in considerazione del fatto che le malattie cardiovascolari rappresentano la causa principale di mortalità e morbidità nella Comunità Europea, e che ciò determina un impatto socioeconomico enorme poiché fanno aumentare la spesa annua di circa 200 miliardi di Euro. Il peso economico sui budget della salute pubblica è tanto elevato poiché una frazione considerevole di pazienti affetti da disturbi cardiovascolari fanno parte di una categoria di persone in età produttiva e che potrebbero ancora contribuire attivamente all'economia. La prevenzione di eventi cardiovascolari secondari e la riduzione delle ospedalizzazioni e delle morti da CVD per mezzo di approcci di medicina personalizzata e "target therapy", sono considerati il traguardo a cui ambire. I pazienti necessitano di studi che tentino di raggiungere i più alti standard possibili in termini di qualità e tecniche utilizzate. Il gruppo di ricerca afferente al MATCH ambisce all'individuazione di una terapia individualizzata delle malattie cardiovascolari che possa far decrescere mortalità e morbidità ad esse legate. Pertanto verranno combinati gli sforzi per avere prima di tutto un impatto sulla salute pubblica. Se avremo successo, i progressi nei nostri studi ci consentiranno non solo di influire sulla salute pubblica, ma anche di cambiare le regole e le conoscenze per il trattamento delle malattie cardiovascolari.



## AREA DI RICERCA NEUROSCIENZE

### LABORATORIO DI BRAIN CONNECTIVITY

#### Giovani Ricercatori

##### *Prediction of conversion from Mild Cognitive Impairment to Alzheimer's disease based on TMS-EEG biomarkers*

Il decadimento cognitivo lieve (MCI) descrive una condizione clinica in cui le funzioni cognitive non sono normali, ma l'entità della loro compromissione non soddisfa i criteri clinici per la demenza. Questa condizione è comune, ma anche critica poiché il tasso di progressione a demenza è significativamente più alto rispetto ai soggetti cognitivamente normali e può o meno sottendere i meccanismi patofisiologici della malattia di Alzheimer (AD). Utilizzando un innovativo strumento neurofisiologico, ovvero la co-registrazione TMS-EEG (Stimolazione Magnetica Transcranica - Elettroencefalografia), ed avendo già descritto le caratteristiche TMS-EEG dell'AD (Ferrerri et al., 2016).

Gli obiettivi di questo studio sono:

- studiare l'eccitabilità, la connettività e la plasticità cerebrali in una coorte di soggetti MCI. Raccogliere un'ampia coorte di dati TMS-EEG, analizzandoli alla luce di quanto è stato già osservato in pazienti AD (Ferrerri et al., 2016), con l'obiettivo di identificare un sottogruppo di soggetti sospetti di essere, alla prima osservazione neurofisiologica (T0), MCI dovuti ad AD, in base al loro specifico modello neurofisiologico.
- monitorare nel tempo i soggetti MCI attraverso successive valutazioni cliniche e neurofisiologiche per valutare se il pattern elettrofisiologico individuato in T0 possa predire o meno un peggioramento neuropsicologico e/o una conversione clinica in AD.
- seguire nel tempo le caratteristiche TMS-EEG dell'eccitabilità, connettività e plasticità cerebrali nei soggetti MCI arruolati per verificare se esiste una correlazione significativa tra profili neurofisiologici e neuropsicologici, mirando a testare il potenziale di TMS-EEG per il monitoraggio di progressione della malattia.

Nonostante il progetto abbia subito rallentamenti nella esecuzione delle attività dovuto alla pandemia SARS-CoV-2, che ha colpito la popolazione anziana oggetto di questo studio sperimentale, con conseguenti gravissime difficoltà correlate alla esecuzione di attività sperimentali in ambienti ospedalieri su soggetti umani anziani, sono state comunque effettuate una serie di attività correlate a questo progetto e sono stati pubblicati articoli scientifici.

Sono stati organizzati un incontro in presenza a Roma e diversi incontri periodici online tra le unità partecipanti al progetto con lo scopo di coordinare l'attività di ricerca, sia in termini di pianificazione delle attività che di analisi dei dati, che di pubblicazione degli stessi.

Attraverso una forte interazione tra le unità operative, sono stati analizzati i dati elettrofisiologici (TMS-EEG) e clinici di soggetti affetti da Mild Cognitive Impairment di tipo amnestico e soggetti anziani sani di controllo.

Analizzando le caratteristiche dei segnali elettrofisiologici alla luce dei parametri clinici si è osservato che i soggetti MCI presentano una ridotta eccitabilità cerebrale rispetto ai soggetti anziani sani di controllo, nonché una diversa connettività della corteccia motoria stimolata ed all'interno di tale gruppo sono identificabili almeno due pattern di risposta elettrofisiologica TMS-EEG in termini di connettività cerebrale e stabilità del segnale (obiettivo sperimentale 1).

I soggetti vengono seguiti nel tempo per valutare, attraverso opportuni test, la loro conversione a demenza di Alzheimer.

L'Unità Operativa 1 (Clinica Neurologica, Azienda Ospedale Università di Padova) è responsabile dell'arruolamento dei soggetti, dell'esecuzione delle valutazioni cliniche preliminari e di follow-up e della somministrazione del protocollo elettrofisiologico. L'Unità Operativa ha analizzato i dati clinici e pre-processato i dati elettrofisiologici (TMS-EEG) dei soggetti affetti da amnesic Mild Cognitive Impairment e dei soggetti anziani sani di controllo. L'obiettivo è stato identificare, alla luce delle evidenze nei pazienti Alzheimer pubblicate in Ferreri et al., 2016, l'esistenza di pattern diversi di risposte elettrofisiologiche TMS-EEG nel gruppo MCI rispetto al gruppo di controllo ed all'interno del gruppo di MCI.

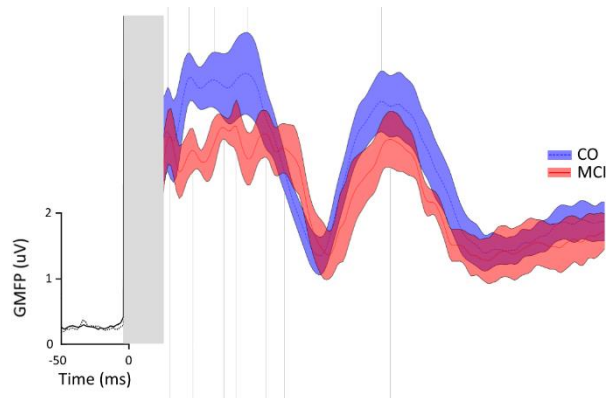
Nella seguente Tabella 1 riassuntiva si riportano i dati clinici e neuropsicofisiologici delle popolazioni sperimentali di cui sopra:

**Table 1. Demographic, clinical and neurophysiological characteristics of participants**

	Controls (n=15)	aMCI (n=17)	aMCI vs. Controls
Age, y (mean ± SD)	67.5 ± 7.0	70.9 ± 5.6	p=0.12
Gender (F; M)	7; 8	7; 10	p=0.99
Education, y (mean ± SD)	9.0 ± 4.2	7.6 ± 3.7	p=0.31
MMSE baseline (mean ± SD)	29.7 ± 0.6	26.7 ± 1.7	p<0.01
RAVLT immediate recall (mean ± SD)	-	26.8 ± 4.8	-
RAVLT delayed recall (mean ± SD)	-	3.5 ± 2.0	-
Neuropsychological profile	-	7 aMCI-SD; 10 aMCI-MD	-
RMT, % (mean ± SD)	57.2 ± 5.3	58.6 ± 8.6	p=0.87
MEP amplitude, $\mu V$ (mean ± SD)	579 ± 328	726 ± 548	p=0.11

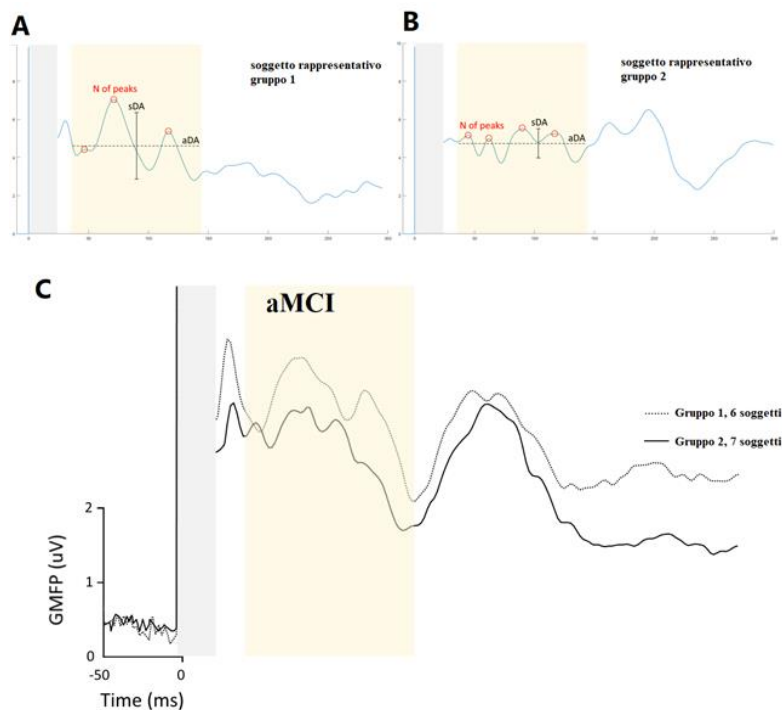
*aMCI: patients with amnesic Mild Cognitive Impairment; MMSE: Mini Mental State Examination score; RAVLT: Rey's Auditory Verbal Learning Test score; aMCI-SD: amnesic MCI single domain, i.e. deficit on at least 1 of the memory tests with no deficit in other domains; aMCI-MD: amnesic MCI multiple domains, i.e. at least 1 deficit in memory plus at least 1 additional deficit in another domain; RMT: resting motor threshold; MEP: motor evoked potential; SD: standard deviation; F: female; M: male; y: years.*

Il pre-processamento dei segnali TMS-EEG ha permesso di identificare l'esistenza di una significativa ipoeccitabilità della corteccia motoria dei soggetti appartenenti al gruppo degli MCI rispetto ai soggetti di controllo, come rappresentato nella Figura 1, che riporta il Global Mean Field Power (GMFP), cioè la media tra tutti i canali EEG in risposta ad ogni singolo stimolo TMS. È stato possibile osservare come la differente eccitabilità corticale nei due gruppi sia ristretta ad una specifica finestra temporale dopo lo stimolo TMS (30-90 ms) e che nella stessa finestra si possano osservare un numero diverso di picchi nei due gruppi sperimentali, in analogia a quanto già osservato negli AD nel nostro lavoro del 2016 (obiettivo 1).



**Figura 1.** Global mean field power (GMFP), ossia la media tra tutti i canali EEG in risposta ad ogni singolo stimolo TMS e suo standard error, nei due gruppi sperimentali in esame.

È stato inoltre possibile identificare, come previsto (obiettivo 1), l'esistenza di almeno due pattern diversi di risposte elettrofisiologiche TMS-EEG in relazione alla stabilità del segnale evocato, come visualizzabile nella Figura 2.



**Figura 2.** A e B mostrano i GMFP di due diversi soggetti MCI in cui si apprezzano una serie di differenze in termini di stabilità del segnale e numero di picchi. Il soggetto in A presenta un segnale TMS-EEG più ampio, meglio definito e caratterizzato da un ridotto numero di picchi che si stagliano chiaramente. Il soggetto in B presenta un segnale meno ampio e definito, con un numero di picchi maggiore. In C il GMFP medio degli MCI raggruppati in due sottogruppi sulla base della stabilità e del numero dei picchi del loro GMFP.

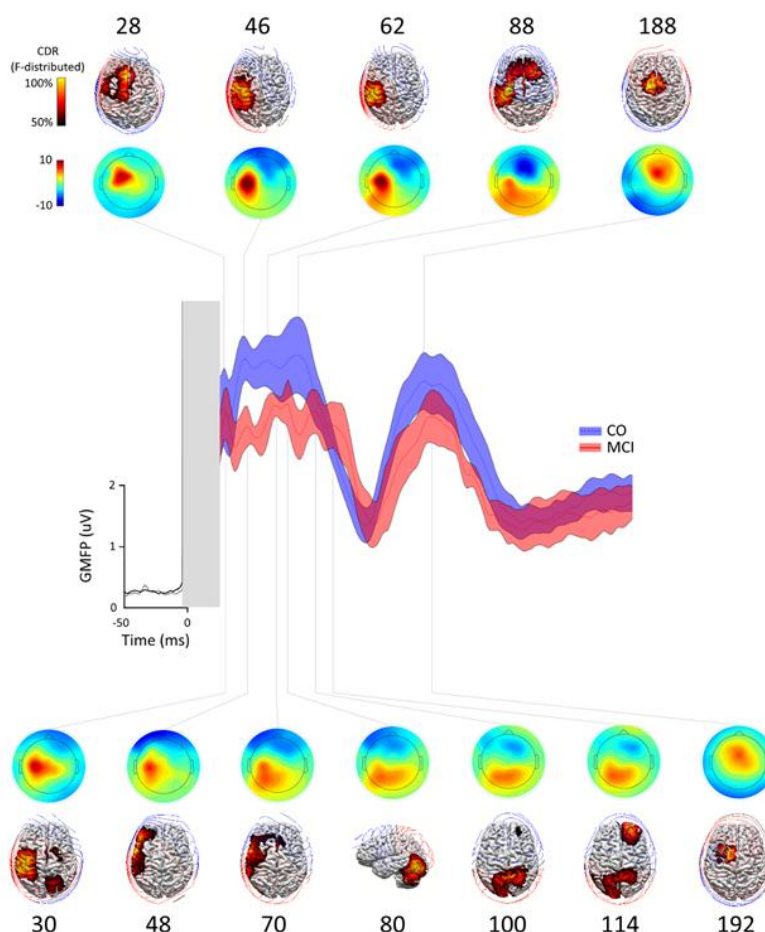
Brain Connectivity Laboratory, IRCCS San Raffaele e Fondazione Fatebenefratelli per la Ricerca e la formazione sanitaria e sociale, Divisione AFaR (Ricerca). L'Unità Operativa 2 è responsabile delle analisi dei dati elettroencefalografici per lo studio della connettività funzionale attraverso avanzate tecniche di esplorazioni dell'architettura delle reti neurali basate anche sulla teoria dei grafi.

L'Unità Operativa 3 è responsabile delle analisi statistiche dei dati.

Grazie alla perfetta integrazione delle due unità 2 e 3 sono state effettuate le analisi avanzate dei segnali elettrofisiologici TMS-EEG e le analisi statistiche di questi e delle variabili neuropsicologiche disponibili.

I risultati sono rappresentati di seguiti.

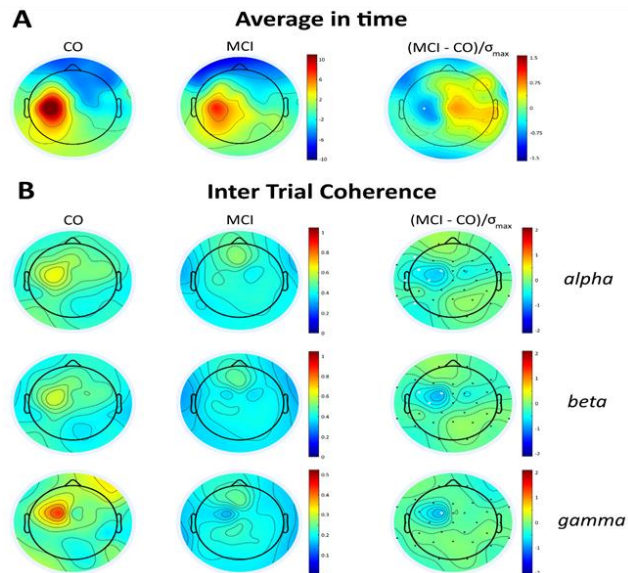
Nella Figura 3 sono riportate le rappresentazioni allo scalpo e sulle sorgenti corticali (ottenute attraverso l'uso di software innovativi) delle attività cerebrali a determinate latenze (indicate in millisecondi nella immagine) a partire dallo stimolo TMS.



**Figura 3.** Mappe di distribuzione dell'attività elettrica sullo scalpo e localizzazione delle sorgenti del Global Mean Field Power (GMFP), ottenute con TMS su M1 sinistra nei soggetti di controllo (CO, linea blu  $\pm$  SE) e nei soggetti MCI (linea rossa  $\pm$  SE). Nei CO, la massima corrente (che riflette la massima attività neuronale) si sposta dall'area stimolata M1 alla corteccia ipsilaterale premotoria/prefrontale (28 ms), alla corteccia ipsilaterale sensori-motoria (46 ms), diventando più focalizzata sulla corteccia sensoriale (62 ms), diffondendo alle regioni premotorie bilaterali e aree prefrontali dorsali (88 ms), infine localizzando alla linea centrale mediana (188 ms). Nei soggetti MCI, la massima corrente a 30 ms dopo la stimolazione risulta ancora localizzata nella corteccia ipsilaterale motoria sensoriale, espandendo alla regione ipsilaterale premotoria e parietale, e nell'area motoria supplementare (SMA) e regioni contro laterali premotorie e parietali, per poi spostarsi alle regioni ipsilatero laterali sensori motorie e premotorie laterali e prefrontali (48 e 70 ms), alla giunzione ipsilaterale occipito-cerebrale, bilateralmente ai lobuli parietali superiori (100 ms), alla corteccia prefrontale contro laterale (114 ms) ed infine alla regione ipsilaterale premotoria/pre-SMA.

Infine, la Figura 4 rappresenta una prima analisi (sia osservazionale che statistica) di connettività fatta sui dati EEG nei soggetti sottoposti al protocollo TMS-EEG.

È stato valutato un indice, l'Inter Trial Coherence, che permette di valutare la connettività sullo scalpo grazie alla valutazione delle variazioni tra i vari trial (cioè tra le singole stimolazioni TMS) in specifiche bande di frequenza. È stata considerata anche la variazione standardizzata dividendo la differenza tra MCI e CO per la deviazione standard massima osservata.



**Figura 4.** Mappe topografiche dell'attività media TMS evocata e intertrial coherence (ITC) nei soggetti di controllo ed MCI. (A) Distribuzione topografica della media delle risposte evocate nei soggetti di controllo (CO) e nei soggetti MCI nella finestra temporale 45–55 ms dopo TMS su M1 sinistra; il punto bianco rappresenta la posizione dello scalpo (C3) dove l'eccitabilità cerebrale risulta significativamente diminuita nei soggetti MCI. (B) ITC nelle bande alpha, beta e gamma nella finestra temporale 35–145 ms post-TMS nei CO e MCI e mappe di differenza (colonna a destra). Nelle mappe di differenza, i punti bianchi rappresentano la posizione dello scalpo dove ITC diminuisce significativamente nei soggetti MCI.

## LABORATORIO DI FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DEL DOLORE

### Employment of natural killer opioid receptor as a biomarker to ameliorate the efficacy of the rehabilitation program in a patient-oriented strategy

Starting Grant 2021

Il dolore rappresenta un problema clinico, sociale ed economico significativo nelle comunità di tutto il mondo. Il dolore cronico è un disturbo grave che si verifica nel 26% degli Italiani. Negli ultimi anni c'è stata una vera e propria riforma culturale e scientifica che ha visto il dolore trasformarsi da sintomo ad un'entità nosologica da diagnosticare e trattare, con importanti aspetti fisici, psicologici, sociali e con ripercussioni economiche. Le conseguenze fisiche del dolore cronico includono perdita di mobilità, perdita di indipendenza e dipendenza da farmaci antidolorifici. I programmi di riabilitazione sono sicuri ed efficaci nel trattare le persone con dolore, anche se talvolta con risultati parziali. La mancanza di una diagnosi accurata e di un trattamento appropriato rappresenta uno dei principali limiti del dolore nella medicina. Il governo italiano, tramite l'emanazione della legge 38/2010, ha espresso chiaramente il suo enorme sforzo nel garantire l'accesso alle cure palliative e alla gestione del dolore, accentuando l'importanza sul monitoraggio del dolore. Da qui nasce l'esigenza di definire percorsi diagnostico-terapeutici a partire dall'individuazione di una metodica diagnostica per integrare l'approccio terapeutico.

Molto spesso i clinici non hanno linee guida specifiche e devono scegliere tra il trattamento analgesico continuo e gli oppioidi su richiesta, responsabili di effetti collaterali.

La limitazione più importante di un approccio personalizzato-focalizzato nella ricerca sul dolore è che gli studi sono principalmente finalizzati a caratterizzare gli stati di dolore, e solo pochi testano direttamente i meccanismi anatomici, biochimici o fisiopatologici. Il miglioramento delle conoscenze sui meccanismi del dolore con modelli in vivo consolidati potrebbe aprire la strada a una migliore comprensione dei potenziali metodi per la misurazione del dolore. Un recente studio ha descritto la modulazione della percentuale di linfociti B che esprimono il

recettore  $\mu$  oppioide come potenziale marker di misurazione del dolore e dati preliminari hanno mostrato il coinvolgimento dei recettori  $\mu$  oppioidi sulle cellule Natural Killer (NK) nella fibromialgia, tramite un'azione immunosoppressiva. È stato dimostrato che i pazienti con dolore neuropatico hanno una perdita delle funzioni delle cellule NK confermando l'importanza di un approfondimento sul ruolo dell'espressione del recettore degli oppioidi sulle cellule NK e chiarire il loro potenziale ruolo di marker nel monitoraggio del dolore.

In particolare, le cellule NK svolgono un ruolo centrale nell'immunità innata in quanto mediano le prime difese contro i patogeni. Sono cruciali durante le malattie infettive, nell'uccidere le cellule infette e nel regolare le risposte immunitarie adattative. A differenza delle cellule T e B, le NK non esprimono un singolo recettore clonale codificato da geni sottoposti a ricombinazione somatica. Usano più recettori codificati dalla linea germinale di due tipi fondamentali, attivanti e inibitori, per esaminare i ligandi della superficie cellulare espressi dalle altre cellule. La funzione effettrice delle NK è innescata quando l'input di attivazione supera l'input inibitorio e le cellule NK possono quindi percepire schemi alterati composti da aumento dell'attivazione e diminuzione dei ligandi inibitori sulle cellule circostanti. I ligandi attivanti sono espressi costitutivamente o indotti da stress, infezione o trasformazione maligna. I principali ligandi inibitori sono le molecole MHC di classe I. In particolare, è stato osservato che la morfina induce cambiamenti dose-dipendenti dell'attività NK: dosi elevate hanno portato a un'inibizione dell'attività NK; dosi inferiori citotossicità potenziata delle NK. Studi recenti suggeriscono che i recettori  $\kappa$  e  $\delta$  non influenzano l'attività delle cellule NK. Questi studi sulle interazioni tra il sistema nocicettivo, immunitario e oppioide e i risultati di un oppioide periferico del sangue correlabile la presenza di recettori su cui ogni sistema esprime le proprie interazioni, potrebbero essere la base per la ricerca di una standardizzazione terapia guidata da un marcatore biologico: il recettore degli oppioidi.

Lo studio si prefigge di identificare la percentuale di cellule NK positive per il recettore degli oppioidi  $\mu$  nel sangue di pazienti con dolore e soggetti sani per valutare se tale percentuale possa essere considerata come un possibile biomarcatore per l'identificazione di dolore cronico ai fini di un approccio terapeutico-riabilitativo personalizzato.

### **Persistent pain in pharmacologically or surgically treated osteoarthritis: the role of the $\mu$ -Lympho-Marker as a candidate innovative diagnostic tool**

Giovani Ricercatori 2021

L'artrosi è una delle sindromi di Dolore Cronico (DC) più comuni al mondo. Il DC associato all'artrosi può derivare da meccanismi concomitanti e presenta caratteristiche diverse. Può avere come conseguenza la sostituzione dell'articolazione, ma il 20% dei pazienti riporta DC anche dopo l'artroplastica totale del ginocchio (ATG). Diversi fattori collegati alla ATG, come procedure chirurgiche errate e caratteristiche psicosociali, potrebbero spiegare il dolore dopo l'intervento. Escludendo queste cause, il 5-15% dei pazienti continua a provare dolore. In questo contesto, sono disponibili pochi biomarcatori di DC correlati all'artrosi per una diagnosi precisa dell'insorgenza e della cronicizzazione del dolore. Sempre più evidenze suggeriscono che le interazioni tra sistema immunitario e nervoso possono contribuire allo stato di DC associato all'artrosi. È stato recentemente identificata la percentuale di cellule B  $\mu$  come biomarcatore candidato per una diagnosi oggettiva di DC in pazienti con artrosi e FM. La bassa percentuale di cellule B  $\mu$  in pazienti con DC potrebbe essere dovuta a una riduzione della "riserva" di recettori oppioidi, necessari per l'inibizione del dolore mediata dalle cellule immunitarie. I dati preliminari del laboratorio, ottenuti in pazienti con artrosi, mostrano anche una correlazione significativa tra la riduzione della percentuale di cellule NK  $\mu$  e il dolore moderato/severo. In questa sede si intende analizzare il ruolo del MLM come biomarcatore



diagnostico della cronicizzazione del dolore. Se confermata, MLM potrebbe fornire uno strumento diagnostico/prognostico del DC correlato all'artrosi, utile per programmi di riabilitazione personalizzati e volti al recupero completo del paziente.

La mancanza di biomarcatori specifici del dolore rappresenta una grande limitazione nella medicina del dolore, perché non consente una diagnosi precisa e di conseguenza un trattamento adeguato. I pochi biomarcatori introdotti finora non sono specifici ed è ancora in atto un dibattito scientifico sulla loro definizione e sul loro ruolo. Sono quindi urgentemente necessari nuovi marcatori inequivocabili per superare i limiti sensoriali-discriminativi, affettivi-motivazionali e cognitivi-valutativi del dolore stesso. I recettori oppioidi sulla superficie delle cellule immunitarie periferiche potrebbero svolgere un ruolo cruciale nella comprensione dell'insorgenza e dello sviluppo del DC. La loro modulazione potrebbe essere sfruttata per ottenere una precisa strategia a misura del singolo paziente, per la cura del dolore. Nel presente progetto, si intende approfondire lo studio preliminare pubblicato, che mostra differenze significative nella percentuale di espressione delle cellule B ed NK esprimenti Mu sulla loro superficie, in condizioni di DC correlate all'artrosi, concentrandoci sul rischio di cronicizzazione del dolore. La caratterizzazione di uno specifico biomarcatore diagnostico in grado di misurare oggettivamente il dolore e/o la sua cronicizzazione dopo le terapie farmacologiche e/o l'artroplastica totale del ginocchio e la riabilitazione, potrebbe aiutare a progettare una terapia personalizzata, migliorando i risultati del trattamento e riducendo sofferenze e costi inutili al paziente. Pertanto, potrebbe essere utile per i medici come strumento per evitare sprechi ed interventi farmacologici o chirurgici inutili. Inoltre, l'identificazione di un biomarcatore periferico, rintracciabile attraverso un semplice prelievo di sangue, potrebbe migliorare notevolmente la gestione dei pazienti affetti da DC, evitando anche visite ed esami clinici eccessivi, limitando così stress e ansia a pazienti e caregivers. Questo approccio personalizzato potrebbe migliorare il processo di ottenimento del consenso informato, che risulterebbe arricchito di spiegazioni più accurate, consentendo una presentazione più chiara dei rischi associati al post-operatorio e un'adeguata strategia di recupero farmacologico e riabilitativo.

L'obiettivo primario della ricerca è quello di studiare la relazione tra la percentuale di cellule B e NK Mu+ e la progressione del dolore nei pazienti affetti da artrosi, indagando anche se questa caratteristica sia associata a particolari risultati degli interventi farmacologici e/o chirurgici e della riabilitazione.

L'obiettivo secondario della ricerca è quello di caratterizzare le cellule B e NK Mu+ in termini di stati di maturazione, attivazione/inibizione e proprietà funzionali, nonché la loro capacità di rispondere alla stimolazione del recettore Mu, al fine di comprendere se queste cellule possono avere un ruolo nella patogenesi del DC associato all'artrosi.

Il terzo obiettivo è quello di indagare il potenziale effetto confondente di altri elementi biologici e psicologici nella relazione tra MLM e la progressione del dolore in pazienti con artrosi.

## **LABORATORIO DI IMMUNOPATOLOGIA SINAPTICA**

### **Giovani Ricercatori**

*The cross-talk between immune, autonomic and central nervous systems as a target of exercise therapy in human and experimental multiple sclerosis*

Nella Sclerosi Multipla (SM), le cellule T che hanno perso la tolleranza immunitaria contro epitopi della mielina innescano una catena di eventi infiammatori all'interno del sistema nervoso centrale che portano a demielinizzazione, perdita assonale e neurodegenerazione,

causando sul piano clinico un'estrema variabilità di sintomi, che coinvolgono anche l'attività vagale. E' stato dimostrato che le cellule T in corso di SM vanno incontro ad importanti deficit metabolici che ne alterano la funzione. E' stato altresì dimostrato che i linfociti T e le citochine da essi rilasciate causano alterazioni della trasmissione sinaptica che contribuiscono alla neurodegenerazione. L'esercizio fisico è una terapia di supporto per la SM, il cui potenziale terapeutico è ancora sottostimato.

In questo progetto, ci si propone di studiare l'effetto dell'esercizio fisico sull'asse immuno-sinaptico nella SM umana e sperimentale e il coinvolgimento del nervo vago negli effetti immunomodulatori dell'esercizio, utilizzando approcci sperimentali complementari e innovativi, nell'uomo, nel topo e nel modello chimerico di SM. Questo studio, che quindi comprende una parte clinica e una parte preclinica, consentirà di svelare i meccanismi alla base degli effetti benefici dell'esercizio fisico nella SM.

Il Principal Investigator del progetto, coordina gli esperimenti di esercizio fisico e vagotomia nei topi con encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE). Inoltre, è responsabile della coordinazione delle attività previste in collaborazione con le altre unità coinvolte nello studio.

Per quanto riguarda lo studio clinico, dall'inizio dello studio ad oggi sono stati reclutati 23 pazienti, di cui 18 hanno completato le valutazioni al t1 e 10 hanno completato le valutazioni sia al t1 che al t2. In totale 6 pazienti sono usciti dallo studio, di cui 4 per motivi personali e 2 a causa dei disagi causati dalla pandemia.

I pazienti SM in forma progressiva sono stati inseriti in uno studio longitudinale interventistico volto a valutare gli effetti della riabilitazione su parametri neurofisiologici, neuropsicologici e di risposta immunitaria e immuno-sinaptica. I dati acquisiti finora suggeriscono che la riabilitazione motoria ha un effetto di significativo miglioramento sull'ansia, sia di tratto che di stato, migliora la qualità della vita, valutata attraverso il Multiple Sclerosis Quality of Life (MSQoL-54), nella sottoscala fisica, nelle sotto-componenti relative al funzionamento fisico, all'energia e alla fatica percepita e la percezione degli effetti della SM sulla vita quotidiana e sui sintomi da un punto di vista psicologico. Gli esperimenti chimerici mostrano che l'esercizio fisico è in grado di attenuare gli effetti sinaptici dei linfociti sulle frequenze della trasmissione glutammatergica nel modello chimerico linfociti umani-sezioni cerebrali murine. Infine, pur non alterando la frequenza ed il numero assoluto delle principali classi linfocitarie, l'esercizio fisico modula l'assetto metabolico linfocitario, favorendo la risposta glicolitica e la respirazione mitocondriale.

E' stato dimostrato che l'esercizio attenua l'eccitotossicità glutammatergica, determinata da aumentato rilascio di glutammato nel nucleo striato. Questo effetto si associa ad una ridotta microgliosi nella stessa area cerebrale osservata tramite immunofluorescenza su tessuto e ad una ridotta infiltrazione di cellule linfocitarie CD3+ nel cervello, come attestato da misure citofluorimetriche condotte nell'omogenato del tessuto cerebrale murino. A livello striatale si è inoltre osservato un effetto benefico dell'esercizio fisico nel ripristinare normali livelli del trasportatore vescicolare del glutammato vGLUT1, e non del trasportatore vGLUT2, suggerendo quindi un effetto specifico sulle sinapsi corticostriatali.

Sono in corso esperimenti di immunizzazione su animali vagotomizzati per valutare la risposta immunitaria e di score clinico.

## **LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA**

### **Ricerca Finalizzata 2018- Starting Grant**

*A more accurate risk biomarkers recognition for progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) caused by Polyomavirus JC in patients with multiple sclerosis during treatment with disease-modifying therapies (DMTs): an ongoing clinical challenge*

Il virus JC (JCPyV) è l'agente eziologico di una malattia demielinizzante ad esito quasi spesso fatale conosciuta come Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML). L'incremento di terapie modificanti il decorso della malattia (DMTs) per il trattamento della sclerosi multipla (SM), ha ampliato notevolmente i pazienti a rischio di sviluppare la PML. Le metriche utilizzate per prevedere il rischio di PML potrebbero essere implementate se localizzazione virale, ceppo genetico virale e immunità sistemica dell'ospite, venissero presi in considerazione contemporaneamente.

Il presente studio si prefigge di: 1) valutare le variazioni della carica virale di JC durante la somministrazione di DMTs (natalizumab, fingolimod, Dimetil-fumarato) 2) rilevare varianti virali e specifici genotipi circolanti all'interno delle coorti di studio; 3) scoprire l'effetto dei trattamenti sui livelli di citochine/chemochine circolanti ed esplorare il loro ruolo nel determinare un equilibrio tra sottopopolazioni di cellule T helper.

Risultati dell'obiettivo 1: In questo studio, i dati ottenuti dallo STRATIFY JCV<sup>®</sup> non sono risultati essere sempre correlabili con quelli ottenuti dalla Q-PCR, infatti, il ritrovamento del DNA virale nei campioni di urina precedeva quello degli anticorpi ritrovati nei campioni di siero ad un anno di trattamento con natalizumab. Pertanto, l'analisi dei risultati ha permesso di confermare che nei pazienti affetti da SM, la presenza di viruria possa rappresentare un biomarker predittivo di riattivazione e replicazione virale in quanto precocemente diagnosticabile rispetto alla determinazione anticorpale ed utile nell'identificare i pazienti JCPyV-positivi ma con risposta umorale non ancora rilevabile. Per quanto riguarda la viremia, la presenza di virioni circolanti nel sangue è stata associata, nella maggioranza dei casi, allo shedding dei virioni con le urine. La viremia da JC sembra essere essenziale per lo sviluppo della PML e, poiché è stata rilevata nel 66,6% (22/33) dei pazienti, si può affermare che, all'aumentare del numero di infusioni di natalizumab aumenta il rischio di insorgenza di viremia soprattutto nei pazienti con STRATIFY JCV<sup>®</sup> negativi. Infatti, se la terapia con natalizumab da un lato riduce lo stato infiammatorio che caratterizza i pazienti affetti da SM, dall'altra promuoverebbe la riattivazione di JCPyV nelle cellule dell'epitelio renale in seguito ad una diminuzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie, dotate di attività antivirale accertata, ed interferendo con il reclutamento dei linfociti T attivati con conseguente ridotta produzione di IFN- $\gamma$  a livello locale. Questo ridotto controllo della replicazione virale a livello renale da parte del sistema immunitario dell'ospite potrebbe favorire la diffusione del virus nel torrente circolatorio incrementando quindi la prevalenza di JCPyV nel plasma e nei PBMC. Pertanto, il monitoraggio della viremia durante il follow-up, potrebbe rappresentare un ulteriore strumento per valutare l'andamento dell'infezione virale. Complessivamente i risultati ottenuti analizzando la carica virale nelle urine, nel plasma e nei PBMC di pazienti SM e trattati con Fingolimod e Dimetil-fumarato durante tutto il follow up ha evidenziato che entrambi i farmaci favoriscono la replicazione virale a livello renale con shedding dei virioni nelle urine e con una carica virale che aumenta in modo all'aumentare delle somministrazioni del farmaco. Fingolimod agisce come un antagonista funzionale della sfingosina 1-fosfato (S1P), causando principalmente una ridotta migrazione delle cellule T al Sistema Nervoso Centrale (SNC). Fingolimod svolge anche un ruolo nella modificazione dei sottoinsiemi delle cellule B: riduce le cellule B di memoria circolanti e, al contempo, aumenta le proporzioni di cellule B di transizione e di cellule B regolatorie (B-reg). Favorendo l'homing dei linfociti, Fingolimod, a causa della presenza di nuove cellule B di transizione circolanti e B-reg, potrebbe espandere il pool di cellule B, migliorando il ruolo delle cellule B produttrici di anticorpi. Queste modificazioni immunologiche potrebbero spiegare l'aumento dell'indice JCPyV trovato nel nostro studio. La valutazione dell'indice di JCPyV (anti-JCV index), valutato al basale (T0) e nell'arco dei 16 mesi dall'inizio del trattamento con Dimetil-fumarato (T1-T4) rimaneva costante in tutti i pazienti analizzati e con un valore di rischio medio

$\leq 0.9$  (anti-JCV index  $\leq 0.9$ ). L' anti-JCV-index, esaminato nell'unico paziente risultato positivo dopo 12 mesi di trattamento con Dimetil-fumarato (T3) nel plasma, ha evidenziato un aumento del livello di rischio da basso (anti-JCV index  $\leq 0.9$ ) ad intermedio ( $0.9 < \text{JCV index} > 1.5$ ).

Risultati dell'obiettivo 2: Al tempo T0, l'analisi della NCCR di JCPyV isolata dai campioni risultati positivi alla ricerca del DNA virale e appartenenti ai pazienti trattati con Natalizumab, Fingolimod e Dimetil-fumarato, ha mostrato un'organizzazione strutturale simile all'archetipo in tutti i campioni analizzati (urine, plasma e PBMC). Durante il follow-up  $< 12$  mesi, nei pazienti trattati con natalizumab, sono state identificate mutazioni puntiformi come la transizione nucleotidica 208A $\rightarrow$ G all'interno del box F, coinvolgente il sito di legame NF-1; la trasversione 37T $\rightarrow$ G nel box B, corrispondente al sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e la transizione 217G $\rightarrow$ A nel box F.

L'analisi della NCCR isolata dai pazienti trattati con Fingolimod e Dimetil-fumarato durante il follow-up  $< 12$  mesi, confermava un'organizzazione NCCR archetipa. L'analisi della NCCR isolata dai pazienti trattati con Natalizumab durante il follow-up  $> 12$  mesi, confermava un'organizzazione NCCR archetipa nelle urine e la presenza di mutazioni puntiformi identiche a quelle osservate durante il primo anno di trattamento negli stessi pazienti. Dopo 24 mesi di trattamento, delezioni parziali e complete venivano osservate insieme a transizioni come la A $\rightarrow$ G in posizione 208. Sebbene non sia stato possibile individuare una reale correlazione tra la presenza di varianti neurovirulente ed il trattamento con DMTs, da questo studio è emerso che:

- l'impiego natalizumab sembrerebbe favorire la mobilitazione delle cellule CD34+ e dei linfociti B infettati da JCPyV, che pertanto possono essere considerati carrier in grado di veicolare il virus verso il SNC;
- durante la diffusione del virus nell'ospite si selezionerebbero particolari sequenze della NCCR di JCPyV;
- il trattamento con tale farmaco può contribuire alla selezione di tali varianti.

Per quanto riguarda l'analisi della sequenza della VP1 virale, è stata osservata una prevalenza dei genotipi 1A e 1B, maggiormente diffusi nel continente europeo.

Risultati dell'obiettivo 3: Per tutta la durata del follow-up (T0, T3, T6 e T8), nei pazienti trattati con Natalizumab, la concentrazione di alcune citochine/chemochine è risultata diminuita come nel caso dell'IL-7 e dell'IL-10. I rapporti Th2/Th1 non hanno mostrato differenze nei punti temporali analizzati (T0, T3, T6 e T8). Il trattamento con Fingolimod e Dimetil-fumarato, non ha modificato il profilo delle citochine nel sangue, sebbene sia stato osservato un aumento di alcune citochine pro-infiammatorie e antinfiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13), che si è mantenuto lungo tutta la durata del follow-up. I livelli assoluti di linfociti T CD4+ e CD8+ circolanti diminuivano nei pazienti trattati con fingolimod. Tuttavia, le cellule T CD4+ erano ridotte in misura maggiore, comportando quindi una diminuzione del rapporto CD4+/CD8+, che è aumentato nel corso del trattamento (T3-T6-T8). Anche la percentuale di cellule T CD4+ e CD8+ che producono IFN- $\gamma$  e IL-17 diminuiva principalmente all'interno dei sottoinsiemi Th1 o Th1/Th17. Poiché queste popolazioni produttrici di IFN- $\gamma$  si sono dimostrate fondamentali per l'attivazione di una risposta antivirale al JCPyV, la diminuzione in questi sottogruppi ha importanti implicazioni per il rischio di PML. Il trattamento con Dimetil-fumarato induceva l'apoptosi delle cellule T ed in modo maggiore dei CD8+ rispetto ai CD4+ ed influenzava le cellule dendritiche, riducendo la sintesi di IL-12 e IL-23. Il trattamento con Dimetil-fumarato aumentava i rapporti Th2/Th1Th17 e T-reg/Th1Th17, determinando uno spostamento verso uno stato antinfiammatorio nel sangue periferico. Il trattamento con Dimetil-fumarato aumentava l'espressione della citochina Th2 IL-4.

## **PNRR 2022**

*Impact of circulating and gut virome in immunity and frailty syndrome*

La fragilità è caratterizzata da un declino del funzionamento di più sistemi fisiologici, accompagnato da un aumento della vulnerabilità ai fattori di stress. L'infiammazione cronica è probabilmente un processo fisiopatologico chiave che contribuisce direttamente o indirettamente alla sindrome della fragilità. Tuttavia, le cause di questa infiammazione cronica e le relazioni tra fragilità e l'immunità disregolata è ancora incerta. Il problema principale è che ad oggi non esiste un biomarcatore universale per quantificare la reattività del sistema immunitario e stratificare il rischio di funzionalità immunitaria nei pazienti geriatrici. Gli attuali biomarcatori immunologici proposti hanno scarsa sensibilità e specificità, non rivelano lievi alterazioni del sistema immunitario e nessuna di esse permette di valutare la capacità del sistema immunitario negli anziani.

Il solido background indica che i componenti più abbondanti del viroma umano, gli Anelloviridae, potrebbero fornire un test semplice, accurato, universale e non invasivo per valutare con precisione la reattività del sistema immunitario, in particolare in contesti clinici geriatrici (ad es. soggetti anziani fragili). Recentemente è stato dimostrato che l'immunità modula rigorosamente la replicazione di uno di questi virus (TTV) e che la viremia TTV tende ad essere maggiore nei pazienti con disfunzione del sistema immunitario rispetto ai controlli sani. Anche la carica virale di TTV aumenta con l'invecchiamento ed è associata alla mortalità negli anziani. Pertanto, è una questione cruciale dimostrare se TTV o altri annellovirus possano essere utilizzati come riferimento per sviluppare una gestione appropriata e personalizzata dei pazienti anziani clinicamente immunocompromessi.

Il presente progetto intende affrontare questa problema attraverso un'indagine a 360 gradi del viroma con un particolare focus su annellovirus e TTV. La carica virale, la complessità del viroma, la produzione di miRNA virali saranno studiate in campioni biologici derivati da progetti integrati su larga scala incentrati sui biomarcatori dell'invecchiamento e della fragilità.

Gli obiettivi che il progetto si prefigge di raggiungere:

1. contribuire in modo significativo alla validazione del TTV o di altri componenti del viroma come biomarcatori innovativi dell'immunità e per la personalizzazione e ottimizzazione della gestione dei soggetti fragili geriatrici
2. approfondire le conoscenze sulla relazione ancora inesplorata tra alterazioni nel viroma legate all'età, infiammazione cronica e fragilità.



## AREA DI RICERCA NEUROSCIENZE

Horizon 2020

*Digital diagnostics – developing tools for supporting clinical decisions by integrating various diagnostic data”. AI-MIND*

AI-Mind è un progetto quinquennale finanziato dall'UE (Horizon2020) che mira a fornire soluzioni innovative che supportino la definizione e la diagnosi del rischio di progredire verso la demenza per le persone che si trovano all'inizio del deterioramento cognitivo. L'obiettivo è creare una piattaforma diagnostica basata su cloud e supportata dall'intelligenza artificiale che integri tecnologie non invasive, ampiamente disponibili e a basso costo. I due strumenti AI-Mind integrati - Connector e Predictor - miglioreranno e faranno avanzare l'individuazione precoce del rischio di progredire verso la demenza per le persone affette da Mild Cognitive Impairment (MCI).

In AI-Mind Connector l'obiettivo principale è individuare le disfunzioni sinaptiche mediante l'analisi, basata sull'EEG, delle mappe di rete funzionali, utilizzando algoritmi di intelligenza artificiale. Il risultato di AI-Mind Connector è ulteriormente arricchito con altri marcatori di progressione verso la demenza, ad esempio biomarcatori ematici, valutazione del rischio genetico e test cognitivi computerizzati, dando vita a un secondo strumento, l'AI-Mind Predictor, che stima, infine, il rischio di progressione verso la demenza per le persone affette da MCI.

L'IRCCS San Raffaele è work package (WP) leader del WP5 e nel 2022 ha sottomesso la prima deliverable (5.1).

L'obiettivo del WP5 è raccogliere dati standardizzati e prospettici per validare e perfezionare gli strumenti finali, AIMind Connector e AI-Mind Predictor. I dati sono raccolti attraverso uno studio clinico che recluta persone con deterioramento cognitivo lieve (MCI). Lo studio è condotto in cinque siti clinici in Finlandia (HUS), Italia (IRCCS/UCSC), Norvegia (OUS) e Spagna (UCM).

Il Deliverable 5.1 fa parte del compito 5.1: "Preparazione e implementazione dello studio osservazionale". Lo studio clinico di AIMind recluta persone con sintomi di MCI per raccogliere dati medici utilizzati per lo sviluppo degli algoritmi di intelligenza artificiale e la validazione dell'AI-Mind Connector e del Predictor.

Questo Deliverable fornisce informazioni sul dossier dello studio clinico, in particolare sul background e sulle procedure cliniche standardizzate, secondo le quali lo studio clinico è implementato. I risultati del Deliverable si basano su un processo di metodologie impiegate per rendere l'arruolamento, le procedure e la somministrazione di tutti i test omogenei tra i siti clinici partecipanti.

La definizione dei criteri di inclusione e di esclusione si basa su un'ampia revisione della letteratura e sull'accordo dei partner interni di AI-Mind di aderire agli obiettivi del progetto.

Vengono raccolte diverse variabili cliniche (ad esempio, dati demografici, peso, ecc.), informazioni su patologie associate e interventi ben documentati. Questi dati vengono analizzati per determinare la loro influenza sul rischio di progressione verso la demenza per la popolazione con MCI.

Alla prima visita vengono raccolti campioni di sangue per determinare la costellazione di alleli APOE e i livelli individuali di proteina P181 e/o P217 associati alla P $\tau$ . I campioni sono raccolti, conservati e spediti secondo le procedure standardizzate (Deliverable 2.1).

Tutti gli aspetti tecnologici per la registrazione dell'EEG sono stati standardizzati e concordati tra gli esperti dei cinque siti clinici. Tutti i siti utilizzano dispositivi EEG a 128 canali identici e parametri di registrazione armonizzati (amplificazione, frequenza di campionamento, filtri, riconoscimento degli artefatti, durata di ogni sessione, ecc. frequenza di campionamento, filtri, riconoscimento degli artefatti, durata di ciascuna sessione, ecc.). Le caratteristiche dell'ambiente di registrazione (linea di base rumore/luminosità) sono state standardizzate (Deliverable 2.1).

Digitalised Cognitive Testing (CANTAB)

Tutti i siti clinici utilizzano test cognitivi digitali standardizzati (CANTAB). I test sono somministrati digitalmente in tutte le lingue nazionali tramite tablet elettronici (iPad), forniti ai partecipanti durante le visite di studio.

WP5 e Deliverable 5.1

L'obiettivo del WP5 è implementare e convalidare AI-Mind Connector, come biomcatore per l'identificazione precoce dei disturbi della connettività della rete cerebrale, e l'AI-Mind Predictor, come strumento di supporto diagnostico per la valutazione del rischio di sviluppare demenza. Questo obiettivo viene raggiunto attraverso uno studio clinico che si svolge in cinque siti clinici europei: HUS (Finlandia), IRCCS e UCSC (Italia), OUS (Norvegia) e UCM (Spagna). I dati prospettici raccolti (oltre alle classiche procedure cliniche SOA), sono trasferiti e analizzati sul server SSD (Services for Sensitive Data) dell'Università di Oslo (UiO - il server è chiamato specificamente TSD, secondo la traduzione di SSD in norvegese).

Nel Deliverable 5.1 (Clinical Study Dossier) sono definiti i seguenti elementi e procedure:

- Panoramica dello studio clinico
- Definizione dei criteri di inclusione ed esclusione
- Processo di inerimento e raccolta dei dati (compresi i dati testuali)
- Registrazioni EEG
- Raccolta, conservazione e trasferimento del campione di sangue
- Test cognitivi digitali (CANTAB)
- Procedure di armonizzazione, utilizzate per ottenere una realizzazione uniforme dello studio in tutti i siti clinici.

tutti i siti clinici.

- Principi e procedure etiche nei siti clinici.

Circa 1000 partecipanti MCI sono sottoposti a screening e arruolati sulla base dei criteri di inclusione/esclusione. L'identificazione clinica dell'MCI è definita attraverso l'utilizzo di specifici strumenti di valutazione deputati ad identificare lo status cognitivo e la progressione del declino cognitivo. Gli strumenti di assessment includono l'utilizzo del Mini Mental Status Examination (MMSE), della Clinical Dementia Rating (CDR), degli IADL (Instrumental activities of daily living) e dei criteri Petersen/Winblad che definiscono cali di prestazione uguali a 1.5 deviazione standard in uno o più domini cognitivi.

Strumenti di valutazione per l'MCI:

- Clinical Dementia Rating: La CDR® Dementia Staging Instrument utilizza una scala a 5 punti per caratterizzare 6 domini cognitivi e di performance funzionali applicabili alla demenza. I sei domini sono: Memoria, Orientamento, Giudizio e Ragionamento, Attività di Comunità, Casa e Hobbies, Cura personale. L'attribuzione di punteggio è condotta attraverso una intervista semi strutturata del paziente e di un informatore attendibile o risorsa collaterale (come un familiare) così come da CDR® Assessment Protocol
- Mini Mental Status Evaluation: MMSE è una scala breve che consente una misura quantitativa dello status cognitive. Può essere utilizzato per stimare la gravità del deterioramento cognitive in un certo momento, per seguire il corso dei cambiamenti cognitive intra-individuali nel corso del tempo e per documentare la risposta del singolo al trattamento.
- Montreal Cognitive Assessment (MoCa): A causa dell'effetto soffitto riscontrato nel MCI per l'utilizzo del MMSE, si utilizza anche il MOCA per la valutazione dei soggetti affetti da MCI. Il MOCA è un test di 30 domande che richiede per l'esecuzione circa 10-12 minuti e aiuta a valutare le persone con demenza. Il MOCA valuta differenti tipi di abilità cognitive. Queste includono Orientamento, Memoria e breve termine/Richiamo differito, Abilità esecutive/visuospatiali, Linguaggio, Astrazione, Denominazione di animali, Attenzione e Clock Drawing Test.

Presso l'UCM e l'HUH, un minimo di 70 pazienti per sito è sottoposto a misurazioni con registrazioni M/EEG simultanee. L'accuratezza della localizzazione della MEG è utilizzata per estrarre le caratteristiche più rilevanti per l'analisi dei dati EEG.



Milestones	M01	M05	M15	M25	M35	M45	M55	M60
Submit protocol	★							
Approval by local IRB/IEC		★						
Participant recruitment		■						
FPFV and FPLV		▬						
Participant testing		■						
LPFV and LPLV			▬					
Statistical analysis			■					
Final report								★

**FPFV** = Primo Paziente Prima Visita,  
**FPLV** = Primo paziente Ultima visita,  
**LPFV** = Ultimo paziente prima visita,  
**LPLV** =ultimo paziente ultima visita

Seguendo i requisiti della CE, il coordinatore (OUS) ha creato una scheda informativa dello studio in inglese, che include le informazioni necessarie sul progetto AI-Mind, incluso il responsabile generale dello studio nominato da AI-Mind per la protezione dei dati (DPO). Questo documento è stato utilizzato per creare un "consenso informato" specifico per ogni Paese. Tutti i siti clinici hanno seguito le loro procedure locali e nazionali e hanno incorporato i dettagli specifici dello studio forniti dal "Foglio informativo" generale, insieme ai requisiti locali dei comitati etici. Oltre al contributo delle organizzazioni nazionali di utenti, i siti italiani hanno incorporato nel consenso informato il feedback di Alzheimer Europe e dell' European Working Group of People with Dementia. È stato creato un registro di monitoraggio del consenso informato per ogni sito clinico, per registrare eventuali ulteriori modifiche ai documenti di consenso informato. I consensi informati sono firmati e conservati in forma cartacea in tutti i siti, ad eccezione della Norvegia (OUS). Qui il consenso viene dato in forma digitale, in conformità con le leggi e le normative locali. Tutti i documenti firmati saranno conservati secondo i requisiti del sito clinico locale, in conformità con la legge sui dati personali/GDPR.

I Case Report Forms (CRF) sono progettati per raccogliere tutte le informazioni testuali relative allo screening iniziale e, in seguito all'inclusione, altri dati testuali, ad esempio informazioni socio-demografiche. Tutti i CRF nazionali sono implementati digitalmente in "Nettskjema" (modulo web digitalizzato) fornito dall'Università di Oslo (UiO). Il servizio Nettskjema trasferisce le informazioni in modo altamente sicuro direttamente alle directory specifiche del sito per l'archiviazione sul server TSD.

Il personale nazionale autorizzato dei siti clinici inserisce i dati nel modulo elettronico. La delega di compiti a personale clinico specifico è effettuata dagli sperimentatori principali di ciascun sito clinico e documentata nel file "Registro delle deleghe" (cfr. Deliverable 9.1).

Per lo screening e l'inclusione finale dei soggetti in AIMind vengono utilizzati due diversi numeri di identificazione:

- ID di inclusione locale: un sistema di numerazione locale, scelto da ciascun sito, per tracciare il potenziale partecipante prima di confermare l'idoneità alla partecipazione allo studio. I numeri ID locali non sono utilizzati per l'integrazione dei dati nella piattaforma centralizzata del progetto. Ogni sito è responsabile di mantenere un elenco che colleghi l'ID di inclusione locale con l'ID del partecipante AI-Mind.

- ID partecipante AI-Mind: quando un soggetto soddisfa i criteri di inclusione, gli viene attribuito un numero univoco, in base alla pseudonimizzazione armonizzata (descritto nel deliverable 2.1). Tutti i dati raccolti a livello nazionale sono contrassegnati da un ID univoco del partecipante AI-Mind, che insieme all'ID del sito e all'ID della visita crea un ID di sessione unico, con il quale i dati inseriti nella piattaforma sono associati a ciascun partecipante.

Procedure cliniche strumentali:

### Elettroencefalografia

L'EEG viene eseguito nei quattro centri clinici: Oslo University Hospital (OUS), Complutense University of Madrid (UCM), Helsinki University Hospital (HUH), IRCCS San Raffaele. I dati sul resting state (RS) registrati per tre volte con 5 minuti di intervallo; occhi aperti, occhi chiusi, occhi aperti, sono collezionati con un dispositivo EEG a 128 canali. I dati EEG sono pre-elaborati utilizzando una sequenza semi automatica definita dai partners del WP2 che include procedure all'avanguardia per il rilevamento e la gestione del rumore del segnale e degli artefatti. La registrazione EEG viene eseguita ad ogni follow up.

### Magnetoencefalografia

La MEG viene eseguita in due siti clinici: HUH e UCM. Le registrazioni MEG vengono eseguite utilizzando procedure standard [Gross et al., Neuroimage. 2013] con sistemi MEGIN (306 canali). I dati vengono raccolti a una frequenza di campionamento di 1000 Hz e il segnale è filtrato tra 0,1 e 330 Hz. Il protocollo MEG è lo stesso utilizzato per l'EEG. I dati grezzi registrati vengono prima inviati al software Maxfilter per il rumore esterno e la compensazione del movimento. Quindi vengono calcolate le procedure di eliminazione degli artefatti.

### Genetica e analisi delle proteine

Campioni di sangue per l'isolamento del DNA e la valutazione delle proteine plasmatiche sono raccolti dai partecipanti che hanno acconsentito a partecipare alla componente di analisi genetica dello studio. La partecipazione è facoltativa. Il sangue viene raccolto al mattino durante la prima visita, con i partecipanti non a digiuno.

L'analisi genetica dell'allele  $\epsilon 4$  dell'APOE è il più forte fattore di rischio genetico per l'AD rispetto a quelli portatori del più comune allele  $\epsilon 3$ .

### The Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB)

I partecipanti allo studio sono sottoposti ad una batteria di test neuropsicologici (CANTAB), basato su un cloud che è validato per l'utilizzo tramite iPad. I test utilizzati nella batteria sono:

Paired Associates Learning (PAL)- 10 minuti, test sulla memoria episodica visiva e sull'apprendimento;

Elaborazione rapida delle informazioni visive (RVP) - 7 minuti, test su attenzione sostenuta;

Spatial Working Memory (SWM) - 7 minuti, test sulla memoria di lavoro e sulla strategia;

Match To Sample Visual Search (MTS) –7 minuti, valuta l'attenzione e la ricerca visiva;

Delayed Matching to Sample (DMS) –7 minuti, valuta sia la capacità di abbinamento visivo simultaneo che la memoria di riconoscimento visivo a breve termine, per i pattern non verbali.

Sono state condotte diverse attività di divulgazione per identificare i possibili candidati alla partecipazione. L'uso dei media, quelli classici (TV, radio, ecc.) e i moderni social media sono stati scelti come campo di prima linea per le attività di divulgazione: sono state trasmesse interviste sui principali canali e nazionali, sono state realizzate pubblicazioni su giornali e riviste per diffondere informazioni sul progetto ed evidenziare i criteri di inclusione. Inoltre, è stato creato materiale di supporto alle procedure di reclutamento: il sito web del progetto per i professionisti e i potenziali partecipanti (nelle lingue nazionali), volantini, video esplicativi, ecc. Infine, i gruppi di risorse nazionali per il reclutamento e le collaborazioni hanno diffuso informazioni su AI-Mind tra i medici di base e gli specialisti, aumentando la consapevolezza degli obiettivi e delle finalità del progetto.

Prima della presentazione del deliverable si sono svolte alcune riunioni di armonizzazione delle procedure di studio.

Inoltre, nell'ambito della 3<sup>a</sup> Assemblea generale (Oslo, 17 settembre 2021) si è svolto un incontro trasversale al WP (sessione di breakout WP2 e 5). Il risultato dell'incontro è stato l'accordo finale sui criteri clinici precedentemente discussi, sulle proposte di valutazione neuropsicologica per lo screening e sulle strategie di reclutamento. Inoltre, come già accennato, l'indagine neuropsicologica classica per il confronto e la validazione del test CANTAB digitalizzato è stato discusso e standardizzato.

Nel mese di maggio l'IRCCS ha organizzato la 4<sup>a</sup> Assemblea generale (4-5 maggio 2022).

La 5<sup>a</sup> Assemblea generale si è tenuta a Madrid (17-18 novembre 2022).

### **Fondazione G Baroni:**

*Stimolazione tDCS per la riabilitazione nei soggetti colpiti da ictus con deficit dell'arto superiore. PI Fabrizio Vecchio*

Lo stroke è la principale causa di disabilità permanente. Tecniche di neuromodulazione cerebrale come la stimolazione transcranica a corrente continua (tDCS), sono state applicate per potenziare la riorganizzazione plastica come trattamento aggiuntivo alla terapia standard.

Questo progetto mira ad applicare la tDCS biemisferica (anodica sul lato affetto e catodica controlaterale), al fine di valutare l'impatto della neuromodulazione (per ri-bilanciare i rapporti di reciproco controllo tra i due emisferi che divengono asimmetrici a seguito dello stroke) sul recupero funzionale e a valutare la presenza di un marcatore EEG che preveda l'efficacia di questo trattamento. Viene anche valutata la ricaduta di questo trattamento innovativo su durata e tipo di riabilitazione.

Nel presente progetto si vuole esplorare il contributo della neuromodulazione sul recupero funzionale dei pazienti stroke mediante lo studio combinato di elettroencefalografia (EEG) e tDCS. L'originalità principale di questo progetto riguarda la possibilità di utilizzare una misura di neuroplasticità per comprendere la relazione tra effetto della tDCS e plasticità sinaptica e utilizzare questi marker per monitorare e prevedere l'evoluzione della riabilitazione. L'obiettivo è quello di introdurre metodi nuovi, a basso costo e non invasivi per l'induzione e il monitoraggio della neuroplasticità per il recupero funzionale motorio.

Si è proposto uno studio randomizzato, doppio cieco, controllato (gruppo sham) sull'efficacia della tDCS, con un totale di 75 pazienti in 3 gruppi uniformi:

- A: tDCS + riabilitazione standard
- B: sham tDCS + riabilitazione standard
- C: riabilitazione standard

Criteri di inclusione: età tra 18 e 90 anni; primo stroke ischemico da 3 a 30 giorni; funzione residua dell'arto superiore; capacità di dare il consenso informato e comprendere le istruzioni

Criteri di esclusione: spasticità grave (Ashworth>2); malattie neurologiche concomitanti; comorbidità significativa; emorragia intracerebrale; grave neglect; controindicazioni alla tDCS.

Tutti i pazienti vengono sottoposti a:

- Baseline: valutazione clinica ed EEG
- Durante la riabilitazione: tDCS biemisferica (reale o sham) per 3 settimane, 5 giorni/settimana nel gruppo A e B; nessuna stimolazione per il gruppo C
- Alla fine del trattamento: valutazione clinica ed EEG
- Dopo tre mesi: valutazione clinica

Per valutare l'impatto sul recupero funzionale e la presenza di un marcatore EEG si valutano almeno:

- spettro di potenza
- spettro di densità di potenza nelle sorgenti corticali
- misure di connettività anche a livello corticale
- misure innovative di connettività basate sulla teoria dei grafi

Infine, si sviluppa un classificatore basato su Machine Learning.

## **ITOP**

Progetto NEUPER: NEURORIABILITAZIONE PERSONALIZZATA: approccio tecnologico innovativo per la valutazione strumentale dell'impatto delle procedure riabilitative in pazienti con esiti di ictus. PI Francesca Miraglia. Relazione scientifica del 14/11/2022 già presente.

*Studio finalizzato alla messa a punto e al collaudo del Network Italiano di Teleneuroriabilitazione*

## **AREA DI RICERCA RIABILITAZIONE NEUROMOTORIA E ROBOTICA RIABILITATIVA**

### **Attività di ricerca in rete**

*Progetto multicentrico "Sviluppo e implementazione di un Network Italiano di Teleneuroriabilitazione per la continuità assistenziale", con sottoprogetto dal titolo: "La riabilitazione domiciliare con controllo remoto: sistemi innovativi per la somministrazione, la valutazione e la misura dell'esercizio riabilitativo"*

*Progetto spontaneo multicentrico "TREADSTROKE - Studio RCT (con randomizzazione per ogni centro) sull'efficacia dell'esercizio robotico su treadmill associato a riabilitazione convenzionale per il recupero del cammino negli esiti di stroke"*

Sebbene i sopravvissuti all'ictus possano trarre beneficio dalla riabilitazione robotica stazionaria del cammino, il training del cammino necessita di ulteriori indagini. In questo lavoro è stata studiata l'efficacia di questo approccio (con un esoscheletro o un robot end-effector) rispetto alla riabilitazione convenzionale del cammino in sopravvissuti a ictus subacuto. In un RCT multicentrico, 89 pazienti hanno condotto 20 sessioni di riabilitazione robotica stazionaria del cammino (Gruppo robotico) o riabilitazione tradizionale del cammino (Gruppo di controllo) in aggiunta alla terapia giornaliera standard. Il training robotico è stato eseguito con un esoscheletro (RobotEXO-group) o un end-effector (gruppo RobotEND). Gli outcome clinici sono stati valutati prima (T0) e dopo (T1) il trattamento. La velocità di deambulazione durante o riabilitazione tradizionale del cammino il 10-Meter Walk Test (10MWT) è stata l'outcome primario di questo studio e gli outcome secondari sono stati il 6-MinuteWalk Test (6MWT), il Timed Up and Go test (TUG) e l'Indice di Barthel modificato (mBI).

I risultati dello studio hanno evidenziato un miglioramento significativo del 10MWT nel Gruppo robotico alla fine del periodo di trattamento (endpoint primario). Un miglioramento è stato osservato anche nei seguenti parametri: 6MWT, TUG e mBI. Inoltre, i pazienti appartenenti al Gruppo robotico ha superato il gruppo di controllo nella velocità del cammini, resistenza, equilibrio e ADL. Il gruppo RobotEND ha inoltre migliorato la velocità di camminata di più del gruppo RobotEXO. In conclusione, la riabilitazione robotica stazionaria del cammino ha migliorato la capacità di deambulazione di più rispetto alla riabilitazione tradizionale del cammino nell'ictus subacuto. Questi risultati suggeriscono che le persone con ictus subacuto possono trarre beneficio dalla riabilitazione robotica stazionaria del cammino per potenziare la velocità dell'andatura e la resistenza.

*Progetto spontaneo multicentrico "ROBOTAS - Studio multicentrico osservazionale aperto di confronto fra dispositivi robotici (end-effector e esoscheletrici) per il recupero funzionale dell'arto superiore negli esiti di stroke"*

La perdita della funzione dell'arto superiore è comune e invalidante dopo l'ictus. La riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot può migliorare la funzionalità. Lo scopo di questo studio consiste nell'esplorare l'effetto del training assistito da robot utilizzando robot esoscheletrici ed end-effector sulla funzione dell'arto superiore in pazienti post-ictus subacuti e cronici. Un totale di 105 pazienti affetti da un primo ictus sono stati arruolati in 18 centri di neuroriabilitazione Italiani e hanno condotto riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot in aggiunta alla terapia convenzionale, con esoscheletro o robot end-effector. Entrambi gli interventi consistevano in 20 sessioni (3/5 volte a settimana; 6-8 settimane). I pazienti sono stati valutati mediante scale per l'arto superiore validate prima (T0), dopo (T1) il trattamento e ad un follow-up a tre mesi (T2). L'outcome primario era la valutazione Fugl-Meyer per l'arto superiore (FMA-UE). La FMA-UE è migliorata a T1 di 6 punti in media nel gruppo end-effector e di 11 punti in media nel gruppo esoscheletro ( $p < 0.0001$ ). Gli esoscheletri sono più efficaci nella fase subacuta, mentre gli end-effector nella fase cronica ( $p < 0.0001$ ). In conclusione, la riabilitazione dell'arto superiore assistita da robot potrebbe aiutare a migliorare la funzione dell'arto superiore nei pazienti con ictus come trattamento aggiuntivo sia nella fase subacuta

che in quella cronica. Sono necessari studi pragmatici e di alto livello metodologico per confermare l'efficacia dimostrata dell'esoscheletro e dei dispositivi end-effector.

*Progetto spontaneo multicentrico "Training riabilitativo con realtà virtuale semi-immersiva (Nirvana) in pazienti con artroprotesi di ginocchio: effetti clinici e funzionali"*

Lo studio coinvolge i seguenti centri di ricerca italiani: IRCCS San Raffaele (capofila); IRCCS LAM INRCA (Ancona); Azienda per l'Assistenza Sanitaria n.2 "Bassa Friulana - Isontina", Gorizia; Nova Salus srl, Gorizia; ASST Centro Specialistico Ortopedico Gaetano Pini – CTO, Milano.

Obiettivo dello studio è l'analisi comparata tra pazienti che eseguono esercizi riabilitativi in terapia di gruppo tradizionale, in gruppo con realtà virtuale (idrochinesiterapia virtuale) e con esercizi in acqua (idrochinesiterapia) con lo scopo di dimostrare l'equivalenza e/o una eventuale superiorità di una tecnica rispetto all'altra. Obiettivo più generale è quello di evidenziare eventualmente se l'attività effettuata in realtà virtuale mimando gli esercizi in acqua possa produrre gli stessi effetti dell'idrochinesiterapia. I parametri presi in considerazione sono: aumento del rom articolare; aumento della forza muscolare; riduzione dell'edema peri-articolare e articolare; miglioramento della qualità di vita del paziente; soddisfazione del paziente verso la terapia. Nel 2022, purtroppo, a seguito della pandemia da covid-19 l'attività riabilitativa di gruppo è stata sospesa.

*Progetto spontaneo multicentrico "Studio multicentrico randomizzato e controllato sull'efficacia della riabilitazione dell'arto superiore con esoscheletro in pazienti con ictus subacute"*

Lo studio coinvolge i seguenti centri di ricerca italiani: IRCCS San Raffaele (capofila); Azienda Ospedaliero Universitaria Ospedali Riuniti, Foggia; Azienda Ospedaliero-Universitaria di Ferrara; Fondazione "Gli Angeli di Padre Pio", San Giovanni Rotondo (FG); HABILITA S.p.A Bergamo; IRCCS Centro Neurolesi Bonino Pulejo, Messina; IRCCS Fondazione Santa Lucia, Roma; Presidio Ospedaliero Accreditato Villa Bellombra S.p.A Bologna. Lo studio è volto a valutare l'efficacia di un sistema robotico di tipo esoscheletro per la riabilitazione dell'arto superiore rispetto ad un trattamento riabilitativo convenzionale senza dispositivo robotico. L'efficacia del trattamento sperimentale viene valutata in termini di miglioramento della performance motoria mediante il Fugl-Meyer Assessment Upper Limb (FM-UL) motoria. Nel 2022, l'attività svolta dall'IRCCS San Raffaele per il progetto ha riguardato il reclutamento, la valutazione ed il trattamento di 3 pazienti come da protocollo e riunioni organizzate in tele-conferenza con tutti i centri partecipanti per il coordinamento e il monitoraggio dello stato dello studio in ogni centro. Tale studio proseguirà nel 2023 con il reclutamento di nuovi soggetti per raggiungere il sample size calcolato per il protocollo di studio. I dati raccolti dei pazienti reclutati presso tutti i centri partecipanti saranno raccolti ed analizzati. I risultati saranno interpretati e preparati per essere pubblicati.

**Call Horizon 2020 EUROBENCH (H2020-779963)**

Progetto della FSTP-2

*ExoSkeleton-assisted Community AmbuLation of healthy and sTroKе subjects (ESCALATE)*

Circa il 74% dei sopravvissuti all'ictus cerebrale soffre di una disabilità nelle attività di vita quotidiana (ADL) [Miller et al., 2010]. Alla dimissione da un centro ospedaliero di neuroriabilitazione, l'indipendenza della persona nel muoversi a casa o in comunità può essere

significativamente compromessa, inducendo depressione e bassa qualità della vita (QoL), con un importante impatto economico sul benessere e sulla società. Il cammino in comunità è un'attività complessa che può essere definita come "mobilità autonoma fuori casa, che include la capacità di affrontare con sicurezza terreni irregolari, strade private, strade rurali, centri commerciali e trasporti pubblici" [Perry et al., 1995]. Camminare all'aperto richiede non solo buone capacità di controllo motorio ma anche una buona capacità cognitiva in grado di adattare il controllo motorio a vari stimoli ambientali uditivi e visivi (es. il tipo di terreno, la presenza di ostacoli improvvisi, la capacità di gestire più attività contemporaneamente...). Per raggiungere un buon livello di QoL alla dimissione, i medici sono chiamati a pianificare un programma di riabilitazione appropriato e personalizzato che dovrebbe includere una terapia fisica intensiva [Pollock et al., 2014].

Gli esoscheletri indossabili overground (Wearable Powered Exoskeletons WPEs) consentono di eseguire terapia riabilitativa aggiuntiva, che porta a risultati positivi e tempi di recupero più brevi [Molteni et al., 2018]. Inoltre, alcuni WPE commerciali consentono ai pazienti di utilizzare il dispositivo non solo per la riabilitazione ma anche come tecnologia assistiva da impiegare in ambito comunitario o domiciliare [Raab et al., 2016]. Sebbene siano stati pubblicati studi recenti sulla riabilitazione del cammino assistita da WPE, con incoraggianti risultati preliminari [Goffredo et al., 2019], l'uso personale di WPE è stato raramente valutato in termini di prestazioni di deambulazione a casa e in comunità in diversi scenari di vita reale. Per questi motivi, sono necessari test sperimentali in condizioni di vita reale in un contesto di benchmarking standardizzato [Torricelli et al., 2020].

Lo studio ESCALATE ha come obiettivo la valutazione delle prestazioni di attività motorie in comunità assistite da WPE di soggetti sani e colpiti da ictus. Il WPE sarà testato in un ambiente di vita reale utilizzando gli strumenti e gli scenari di benchmarking definiti nei progetti EUROBENCH Call 1, con l'obiettivo di: 1. Studiare il cammino (con e senza WPE) su terreni irregolari e salite/discese; misurare l'assistenza delle stampelle durante l'andatura assistita da WPE; e analizzare le capacità di manipolazione di oggetti in condizioni di stabilità posturale assistita da WPE.

Obiettivo secondari dello studio è caratterizzare l'esperienza dell'utente durante l'utilizzo del WPE in ambiente di vita reale.

Lo studio ESCALATE valuta l'uso di un WPE nella deambulazione in comunità: vengono reclutati soggetti sani e soggetti con ictus per valutare le prestazioni e la tollerabilità durante i movimenti assistiti dal WPE in scenari di vita reale. I risultati dello studio consentiranno di quantificare in che modo la soluzione robotica soddisfa le esigenze dell'utente, in termini di assistenza fornita, indicatori di prestazioni, sicurezza e accettabilità. Questi dati aiuteranno i medici, le associazioni di pazienti e la società a comprendere la fattibilità dell'uso di un WPE a casa e nella comunità.

Lo studio è supportato dall'IRCCS San Raffaele. La strutturazione del progetto e lo stretto collegamento fra clinica e bioingegneria permettono di ottimizzare la valutazione dei soggetti e quindi la trasferibilità dei risultati nell'ambito clinico e socioeconomico. L'inclusione dei soggetti nel presente studio clinico può fornire benefici in termini di una più accurata gestione del trattamento riabilitativo. Non sono previsti rischi noti per i soggetti che parteciperanno allo studio.

Sono stati reclutati 8 soggetti (5 sani; 3 ictus) che soddisfano i seguenti criteri:

- Criteri di inclusione: età compresa tra 18 e 80 anni; misure antropometriche adatte per l'utilizzo del WPE (altezza tra 155-195 cm; peso  $\leq 113$  kg; larghezza dell'anca  $\leq 46$  cm).
- Criteri di esclusione: contratture articolari persistenti; lesioni ortopediche; dolore; osteoporosi grave; problemi dermatologici; gravidanza.

Inoltre, i soggetti con ictus devono soddisfare questi criteri aggiuntivi:

- Criteri di inclusione dell'ictus: distanza dall'evento acuto  $\geq 2$  mesi; Classificazione della deambulazione funzionale (Functional Ambulation Classification - FAC  $\geq 2$ ); Modified Ashworth Scale di ciascun muscolo  $\leq 2$ ; capacità di mantenere una posizione eretta per almeno 60 secondi; condizioni cardiovascolari e respiratorie stabili; capacità di dare il consenso scritto e rispettare le procedure dello studio.

- Criteri di esclusione dell'ictus: deficit cognitivi o linguistici gravi (incapacità di comprendere e rispettare le procedure dello studio).

Lo studio si è svolto presso gli ambienti interni ed esterni dell'IRCCS San Raffaele, equipaggiata del WPE oggetto dello studio (Indego Therapy® - Parker Hannifin Corp., Cleveland, OH, US), e della strumentazione necessaria per la valutazione biomeccanica dei task motori: sistema inerziale per l'analisi del movimento Movit G1-3D (Captiks, Italia); sistema stereofotogrammetrico per l'analisi del movimento BTS SMART DX (BTS Bioengineering, Italy).

Questo studio propone l'integrazione di un sistema di unità di misura inerziale (IMU) per analizzare la cinematica del cammino durante scenari reali all'aperto (terreni regolari, irregolari e salite) confrontando il cammino ecologico (condizione senza WPE) e il cammino assistito da WPE. I parametri temporali dell'andatura e degli angoli articolari sono stati calcolati dai dati raccolti da una rete di sette IMU.

I risultati hanno mostrato che il cammino assistito da WPE presentava una minore flessione del ginocchio nella fase di appoggio e una maggiore flessione dell'anca nella fase di oscillazione. I diversi scenari non hanno modificato l'interazione uomo-esoscheletro: solo il cammino assistito da WPE a bassa velocità è stato caratterizzato da una fase di doppio supporto più lunga. Il protocollo di valutazione del cammino basato su IMU ha consentito l'analisi quantitativa dell'interazione uomo-esoscheletro in termini di cinematica del passo e ha aperto la strada allo studio della deambulazione di comunità assistita da WPE nei pazienti con ictus.

## **AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO**

### **Bando AIFA**

*Gender-related predictors of development of fluctuations and dyskinesia in Parkinson's disease: a 2-year observational longitudinal study*

Questo studio, interventistico non farmacologico, longitudinale prospettico, nazionale, multicentrico (21 centri, Università di Salerno Centro Coordinatore), si è proposto di descrivere le differenze di genere nello sviluppo di fluttuazioni motorie/non motorie valutate con appositi questionari durante due anni di osservazione a partire dall'inizio del trattamento con levodopa. Lo studio ha previsto un periodo di inclusione di 6 mesi e un periodo di osservazione di 24 mesi dall'inizio del trattamento con levodopa, con una valutazione basale e due visite di follow up rispettivamente ad 1 e 2 anni dalla visita basale.

Lo studio si è concluso in novembre 2022 con il follow-up a 2 anni di 216 pazienti/293 reclutati. È in corso l'analisi statistica per identificare le differenze di genere nei predittori clinici, genetici, farmacocinetici, metabolici delle fluttuazioni motorie e non motorie e delle discinesie.

Il centro dell'IRCCS San Raffaele ha contribuito con una casistica di 32 pazienti, la più numerosa tra tutti i centri a livello nazionale.

*Progetto ParkRoma comune educazione*

Comune di Roma - Protocollo d'Intesa sottoscritto da Roma Capitale

Il sopraggiungere dell'emergenza sanitaria a seguito del diffondersi della pandemia da COVID-19 e i conseguenti provvedimenti dei DPCM hanno imposto di rimodulare le attività di assistenza domiciliare.

L'isolamento prolungato può generare o acuire per le persone in carico sensazioni di solitudine e abbandono, con possibili ripercussioni in termini emotivi e comportamentali. Si è resa quindi necessaria una particolare attenzione non solo rispetto all'attuazione delle misure di massima protezione ma anche in merito allo sviluppo di progettualità di sostegno per affrontare il periodo attuale con i migliori strumenti psicologici, soprattutto in termini di capacità di resilienza.

Da tale necessità è nato quindi il Protocollo d'Intesa sottoscritto da Roma Capitale e dall'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico San Raffaele, in particolare con il Centro Parkinson diretto dal Professor Fabrizio Stocchi, per la sperimentazione di un sistema di integrazione socio-sanitaria destinata alle persone con Parkinson e Parkinsonismi.

Il Protocollo, tramite il progetto CO-PARK "Il Comune per il Parkinson", è finalizzato a fornire servizi di tele-assistenza, attraverso l'attivazione della linea specifica 06 52252434 e del numero verde dedicato 800 848 438, attivi dal lunedì al venerdì dalle ore 12 alle ore 15.

Finora 168 utenti si sono registrati sul sito per usufruire dei servizi, avvenuti altrettanti contatti telefonici.

Inoltre è stata realizzata la piattaforma digitale per le video lezioni.

Indirizzo della piattaforma per il corso di formazione: <https://copark.uniroma5.it/>

L'IRCCS San Raffaele ha realizzato un corso di formazione rivolto ai caregiver, agli operatori socio-sanitari e badanti iscritti al Registro Assistenti alla persona di RomaCapitale, per la gestione del paziente affetto da malattia di Parkinson e altre malattie neurodegenerative.

Il corso è stato realizzato attraverso video lezioni inerenti: la gestione delle complicanze motorie, i disturbi gastrointestinali, i disturbi del linguaggio, i disturbi cognitivi e psicologici, i disturbi della sfera autonoma, la gestione della terapia farmacologica e le strategie riabilitative.



### Conto capitale

*Modello innovativo di gestione di una biobanca di ricerca per la tracciabilità globale dei processi: dall'automazione alla medicina predittiva/di precisione in riabilitazione*

L'acquisizione dell'insieme strumentale finanziato nel progetto si è posta all'interno ed in modo trasversale alla Linea 1 di ricerca riconosciuta nella programmazione triennale per l'IRCCS San Raffaele, che prevede lo sviluppo della cosiddetta medicina predittiva/di precisione in campo riabilitativo per meglio conoscere o addirittura predire l'outcome del processo riabilitativo stesso. L'acquisizione delle strumentazioni richieste ha permesso l'avvio dell'ampliamento della casistica e della tipologia di campioni biologici collezionabili da parte della biobanca a seguito del completamento dell'automazione includente anche i tessuti.

Obiettivo prioritario raggiunto grazie all'acquisizione di queste strumentazioni è la tracciabilità e rintracciabilità a sistema dei processi di acquisizione, processazione, aliquotazione e conservazione di campioni biologici liquidi e tessutali per un loro uso efficace in studi di biomarker discovery tesi ad una medicina predittiva, personalizzata/di precisione nell'ambito della riabilitazione delle malattie croniche complesse debilitanti (malattie cardiovascolari, neurodegenerative). In particolare, l'insieme strumentale acquisito permette: a) il miglioramento dell'integrità e "qualità" del campione per migliorare la riproducibilità dei dati analitici da essi derivati; b) il controllo della fase pre-analitica al fine di ridurre al minimo la probabilità di errore attraverso la standardizzazione e tracciabilità globale delle procedure; c) il miglioramento dell'idoneità dei campioni biologici e, in conseguenza, il "valore scientifico" dei dati analitici ad essi associati al fine di promuovere approcci multidisciplinari e sistemici basati su tecniche proprie della scienza dei dati (Intelligenza Artificiale, Business Intelligence, ecc.), con ricadute importanti sul SSN, soprattutto attraverso la messa a punto e validazione di strumenti decisionali clinici per la realizzazione di nuovi percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali e/o per l'applicazione di programmi terapeutici/riabilitativi individuali in un contesto di medicina personalizzata in riabilitazione.

*NET4HEALTH - NETWORK for HEALTH management*

*Ministero dello Sviluppo Economico (MISE) - Direzione Generale per gli Incentivi alle Imprese; Divisione VII – Interventi per ricerca e sviluppo F/050383/01-03/X32*

### **H2020-SC1-2019-Two-Stage-RTD**

*REVERT – taRgeted thErapy for adVanced colorEctal canceR paTients*

Topic: SC1-BHC-02-2019 – Systems approaches for the discovery of combinatorial therapies for complex disorders – GRANT AGREEMENT n. 848098 — Directorate-General for Research and Innovation People Healthy Lives

Durante il periodo in esame, il Coordinatore – con il contributo dell'Assemblea Generale e del Consiglio Direttivo – ha provveduto alla stesura della valutazione d'impatto sulla protezione dei dati (DPIA) dei dati personali derivanti dal progetto REVERT. Il documento, teso ad evidenziare il processo di descrizione del trattamento, valutandone la necessità e la proporzionalità e gestendo eventuali rischi per i diritti e le libertà delle persone derivanti dal trattamento, è stato condiviso con il Responsabile della protezione dei dati dell'IRCCS San Raffaele, che ha espresso

parere favorevole sulla correttezza de suo svolgimento. Il livello di conformità delle misure di sicurezza è stato discusso nell'Assemblea Generale e confermato tra i Contitolari partecipanti al progetto REVERT mediante la sottoscrizione dell'Accordo di Contitolarità nel Trattamento dei dati (JCA). Il DPIA ed il JCA sono stati discussi nel corso di numerosi web meetings e approvati in via definitiva nell'Assemblea Generale tenutasi in presenza a Roma nel Novembre 2022.

Nel frattempo è proseguita l'implementazione del database DataBase REVERT (RDB), che ha visto la partecipazione di tutti i partner attraverso l'inserimento dei dati retrospettivi relativi alle informazioni cliniche, istologiche e molecolari dei pazienti disponibili presso le biobanche/centri clinici coinvolti nel progetto. Nel corso del 2022, è stata creata un'applicazione mobile (App) per il progetto REVERT in grado di consentire l'utilizzo di un modello ML per ottenere una previsione relativa alle possibilità di sopravvivenza del paziente monitorato, offrendo al tempo stesso la possibilità salvare i dati inseriti nel rispetto della privacy e della sicurezza dei dati. La modellazione e lo sviluppo dell'App sono stati eseguiti utilizzando un set di dati sul carcinoma metastatico del colon-retto e modelli sperimentali tipo Naïve Bayes, Random Forest, Decision Trees, Gradient Boosted Trees, Logistic Regression e SVM. Sulla base di questi modelli, è stato, infine, creato un modello python e un server Java che comunicano con un'applicazione mobile Android. Questa applicazione consente facili adattamenti futuri a più modelli sviluppati in maniera specifica sul set di dati RDB.

Per quanto riguarda gli aspetti biomolecolari, nel periodo di rendicontazione sono state eseguite diverse attività in linea con i compiti programmati. In particolare, i partner sono progrediti nell'identificazione di alterazioni dei geni coinvolti nel cancro del colon-retto (CRC) e nella costruzione di un algoritmo denominato 7-Gene Algorithm costituito dai profili di mutazione dei sette geni: KRAS, BRAF, ERBB2, MAP2K1, TSC2, TP53 e APC. Tale algoritmo ha mostrato la massima accuratezza nel distinguere i pazienti con o senza progressione di malattia in risposta al trattamento rispetto a tutti gli altri algoritmi basati su mutazioni geniche testati, come determinato utilizzando l'analisi di regressione logistica. Nel complesso, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'algoritmo 7-Gene è caratterizzato da un'elevata precisione nel prevedere la risposta al trattamento per i pazienti affetti da mCRC ed è un candidato ideale per la costruzione di modelli predittivi, come ipotizzato nella proposta di progetto REVERT. Nel corso del progetto REVERT, sono state pubblicate in totale 9 pubblicazioni su riviste open access.

## **PO FESR Sicilia 2014-2020**

### **Azione 1.1.5 "Sostegno all'avanzamento tecnologico delle imprese attraverso il finanziamento di linee pilota e azioni di validazione precoce dei prodotti e di dimostrazione su larga scala"**

*NUVACAL-BC – Baicalina e Curcumina per lo sviluppo di nutraceutici, adiuvanti per vaccini, cosmeceutici e alimenti funzionali.*

Decreto Dirigenziale DDG 3200/5S del 28.10.2019.

Commessa di Ricerca per l'IRCCS San Raffaele Roma per lo svolgimento di attività sperimentali tramite la Biobanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM).

Il progetto ha come obiettivo principale lo studio della capacità di alcune sostanze nutraceutiche di ridurre la severità dell'infiammazione cronica e migliorare lo stato antiossidante attraverso la valutazione dell'inibizione del fattore di trascrizione NF-kB. In tale contesto, si deve sottolineare l'importanza della BioBIM che, durante l'intera durata del progetto garantirà la disponibilità di un gran numero di campioni "normalizzati", nei quali i bias derivanti dalle variabili relative alla raccolta del campione, alla preparazione o alla

conservazione stessa, siano stati eliminati. Le attività svolte dalla BioBIM nell'ambito del progetto NUVACAL hanno, tuttavia, riguardato non solo la fornitura di campioni biologici, ma anche lo studio sperimentale delle qualità nutraceutiche di alcune sostanze. In questa fase del progetto, in particolare, è stata effettuata un'analisi delle proprietà antitumorali e antivirali di un estratto di foglie di *Orobancha crenata* (OCLE), una pianta parassitaria commestibile, nota nella medicina popolare per i suoi numerosi effetti benefici sulla salute umana. I risultati ottenuti hanno dimostrato come l'incubazione con OCLE per 24 ore possiede un effetto inibitorio dose-dipendente sulla sopravvivenza di cellule MCF-7, con un aumento del rilascio di LDH. OCLE, inoltre, ha mostrato un'attività di scavenging dei radicali liberi e ha aumentato significativamente i livelli di tiolo non proteico nella stessa linea cellulare MCF-7. OCLE, infine, si è mostrato in grado di inibire efficacemente la replicazione di HSV-1, HSV-2, CoxB1 e CoxB3. I risultati ottenuti sono stati oggetto di pubblicazione sulla rivista open-access *Cells* (doi: 10.3390/cells11101696).

## LABORATORIO DI GENOMICA UMANA FUNZIONALE

### Rete RIN

Le malattie neurodegenerative, tra cui la malattia di Alzheimer (AD), la malattia di Parkinson (PD) e lo spettro della sclerosi laterale amiotrofica-demenza frontotemporale (ALS-FTD), rappresentano una delle principali cause di morbidità e mortalità nelle popolazioni anziane, con un elevato onere socio-economico. Una caratteristica comune di queste condizioni è rappresentata dal progressivo declino delle funzioni cognitive, dal lieve deterioramento cognitivo (MCI) alla demenza, che si verifica in una percentuale variabile di pazienti a seconda della malattia. Tuttavia, anche all'interno dello stesso disturbo, esiste un'elevata variabilità interindividuale nella comparsa, nella gravità e nel tasso di progressione del fenotipo cognitivo, probabilmente alla base dell'esistenza di traiettorie fisiopatologiche distinte.

Ad oggi, nonostante gli sforzi massicci, la ricerca di strategie terapeutiche volte ad arrestare o rallentare il processo neurodegenerativo è in gran parte fallita. Ciò è probabilmente giustificato da ragioni concomitanti, tra cui la complessità biologica delle malattie, una selezione inappropriata dei pazienti e un'errata tempistica del trattamento. Un gran numero di studi sui meccanismi patogenetici alla base della neurodegenerazione ha evidenziato molteplici vie (tra le quali: aggregazione proteica, compromissione dei sistemi di clearing cellulare, danno mitocondriale e neuroinfiammazione), suggerendo che una strategia terapeutica derivante da un approccio combinato potrebbe avere maggiori possibilità di successo. Inoltre, la capacità di stratificare i pazienti in sottogruppi omogenei sulla base di specifiche combinazioni di biomarcatori clinici, biochimici e genetici è un risultato essenziale per un'adeguata selezione dei pazienti per gli studi e per il monitoraggio dell'efficacia dei nuovi trattamenti.

Dati preliminari: ci si propone di sfruttare coorti ben caratterizzate di pazienti con decadimento cognitivo lieve (MCI, n=450) o pre-MCI (n=100) (NET-2011-02346784; Rossini et al, 2021), nonché PD (n=315), PD-MCI (135) (Litman et.al, 2011), SLA (n=100) e SLA-FTD (100), per i quali sono già disponibili campioni biologici (DNA, plasma). In sottoinsiemi selezionati di pazienti delle varie coorti, sono già state eseguite o sono in corso alcune indagini genetiche e/o biochimiche nell'ambito di progetti paralleli (RC 2021 - controlli e coorte NET-2011-02346784; RC 2021 progetto PARKNET3, coorte PD e PD-MCI). Questi includono lo screening delle mutazioni per i più comuni geni di AD o PD, il sequenziamento della GBA, il test per l'espansione della C9orf72, la misurazione dei livelli plasmatici di  $\alpha$ -sinucleina,  $\beta$ -amiloide 1-40,

1-42, Tau e pTau e della catena leggera del neurofilamento (NFL), nonché la concentrazione e le dimensioni delle vescicole extracellulari (EVs).

Gli obiettivi del presente studio sono: 1) estendere questi studi genetici e sui biomarcatori per generare un insieme omogeneo di dati in tutte le coorti; 2) implementare il tutto con ulteriori indagini in sottogruppi selezionati, tra cui: i) un'analisi mirata dei fattori infiammatori dal punto di vista biochimico (multiplex) e genetico; ii) una caratterizzazione più approfondita dei riarrangiamenti genetici complessi che coinvolgono il gene GBA mediante strategie di sequenziamento long-read; e iii) un'indagine esplorativa mediante tecniche proteomiche e metabolomiche. I dati clinici, di imaging, genetici e biochimici saranno caricati sulle piattaforme RIN disponibili, che saranno implementate per garantire l'inclusione dei dati biochimici e l'integrazione senza problemi dei dati clinici (REDCap), di imaging (XNAT) e genetici (VCF annotati). Queste piattaforme consentiranno una facile estrazione di dati multimodali che potranno alimentare direttamente un approccio più sofisticato di analisi statistica non supervisionata basata sull'intelligenza artificiale. L'obiettivo finale sarà quello di scoprire nuove e inaspettate combinazioni di predittori di traiettorie specifiche a livello individuale. Si ritiene che l'identificazione di profili distinti consentirà di orientare l'approccio terapeutico secondo i principi della medicina di precisione.

Schema del piano sperimentale: Il progetto sarà articolato in cinque WP, che coinvolgeranno in modo variabile gli IRCCS partecipanti alla rete.

WP1 - Completamento dell'analisi di GBA e C9orf72 su tutte le coorti reclutate

WP2 - Completamento dell'analisi dei biomarcatori plasmatici ( $\beta$ -amiloide, Tau, pTau, GFAP, NFL,  $\alpha$ -sinucleina, EVs) in tutte le coorti reclutate.

WP3 - Indagini genetiche esplorative: i) esplorare il peso delle varianti di rischio attraverso il sequenziamento dell'esoma e la successiva analisi di un pannello virtuale di geni coinvolti nella neuroinfiammazione in un sottogruppo di pazienti (ad esempio 100 pazienti con e 100 pazienti senza varianti GBA? altre coorti?); ii) sequenziamento a lettura lunga (PacBio) di pazienti portatori di riarrangiamenti GBA-locus.

WP4 - Indagini biochimiche esplorative: i) Multiplex, marcatori infiammatori ii) analisi proteomica basata su Olink e spettrometria di massa; ii) analisi metabolomica mirata e non mirata mediante LC-HRMS.

WP5 - Analisi statistica convenzionale e non supervisionata, analisi dei big data

Fattibilità: La rete RIN, con la sua organizzazione in Istituti Virtuali (ad esempio Parkinson, Demenze e prossimi disturbi del motoneurone), garantisce da un lato che i dati clinici e i campioni reclutati dalla rete siano stati raccolti seguendo procedure operative condivise e standardizzate; dall'altro, l'armonizzazione delle analisi genetiche e biochimiche tra gli istituti partecipanti consentirà la rapida generazione di una grande quantità di dati omogenei, suscettibili di essere messi in comune a fini statistici.

## **LABORATORIO DI ENDOCRINOLOGIA CARDIOVASCOLARE**

### **Miur - PRIN: Progetti di ricerca di rilevante interesse nazionale**

*Novel molecular players of hypoxia/inflammation impinging on lipid homeostasis in obesity and related diseases: Theranostic implications.*

L'obesità è dannosa per la salute umana e aumenta il rischio di sviluppare patologie come diabete e malattia cardiaca. La condizione di obesità è associata allo sviluppo di infiammazione e di ipossia del tessuto adiposo (AT). L'ipossia è causata da insufficiente vascolarizzazione che

localmente non riesce a trasportare ossigeno in modo adeguato all' AT che ha subito un'alterata espansione nel soggetto obeso. E' noto che elevata infiammazione e ipossia portano a disregolata secrezione di adipochine, ad alterata funzione delle cellule staminali residenti nell' AT, e a difettosa attivazione termogenica di AT, con conseguente ulteriore espansione delle masse adipose.

Obiettivo del progetto è approfondire i meccanismi molecolari che determinano lo sviluppo di infiammazione e ipossia che giocano un ruolo rilevante nello sviluppo di AT disfunzionante nell'obesità e in patologie associate ad obesità come il carcinoma epatico.

L'ipotesi alla base del progetto è che infiammazione ed ipossia determinano alterazioni funzionali dell'AT e favoriscono lo sviluppo di obesità e patologie ad essa correlate. A questo scopo viene effettuata un'analisi di fattori coinvolti nello sviluppo di infiammazione, ipossia, attivazione della lipolisi e della termogenesi nell'AT. Si valuta specificamente l'espressione e l'attività di NF-kB, HIF-1, ATGL, FOXO1, FOXC2, Recettore Mineralcorticoide (MR) e Recettore Glucocorticoide (GR) in cellule staminali di AT, nel tessuto adiposo di differenti depositi da soggetti obesi e non-obesi, in modelli murini prone a sviluppare obesità e steatoepatite non alcolica. In particolare, delle cinque unità di ricerca partecipanti al progetto, il laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare analizza il ruolo dei recettori dei corticosteroidi MR e GR nella modulazione dei "pathway" molecolari regolati, nell'AT, dagli altri fattori menzionati.

Questi studi potrebbero aprire la strada all'impiego di antagonisti di MR nel contrastare infiammazione e ipossia dell'AT, e quindi nell'ostacolare le disfunzioni dell'AT e lo sviluppo di obesità e patologie correlate.

Lo studio si prefigge di analizzare il ruolo di MR nel regolare infiammazione e ipossia nell'AT di topi WT maschi sottoposti a dieta obesogena contenente l'antagonista di MR Spironolattone. Si prefigge inoltre di analizzare l'espressione del fattore attivato da ipossia HIF-1 e dei geni "target", come il gene vascular endothelial growth factor (VEGF), la cui espressione è indotta da HIF-1.

Viene inoltre analizzato se il blocco di MR da parte di spironolattone modula l'attività trascrizionale di NF-kB e l'espressione di adipochine infiammatorie nell'AT e l'espressione della lipase ATGL, nota per regolare la lipolisi e l'infiammazione locale nell'AT.

Il secondo obiettivo consiste nell'analizzare l'espressione di HIF-1, VEGF, NF-kB, FOXO1 e ATGL anche nell'AT dei topi WT maschi trattati con CORT118335 (contenuto nel cibo), un antagonista "combinato" dei recettori MR e GR. Precedenti studi effettuati nel laboratorio mostrano che il trattamento con CORT118335 è efficace nel contrastare lo sviluppo di obesità e insulino-resistenza. Queste analisi mostrano se il blocco combinato di MR e GR può contrastare lo sviluppo di infiammazione e ipossia dell'AT, proteggendo quindi i topi da alterazioni del metabolismo glucidico e dell'AT.

Valutare l'espressione dei marker menzionati di infiammazione e ipossia dell'AT in topi knock out per MR nei macrofagi. L'assenza di MR nel macrofago è nota indurre un fenotipo macrofagico antinfiammatorio (M2). Questi esperimenti chiariranno il contributo di MR nei macrofagi all' infiammazione e all' ipossia dell'AT.

Precedenti studi preclinici effettuati dal gruppo di ricerca hanno mostrato che topi wild type trattati con antagonisti di MR o con l'antagonista combinato di MR e GR risultano resistenti all'obesità e ad alterazioni del metabolismo glucidico. Ci si aspetta quindi che il blocco farmacologico di MR o il blocco combinato di MR e GR possa contrastare l'infiammazione locale nell'AT e l'ipossia derivante da incontrollata espansione dell'AT. Ci si aspetta quindi di osservare una ridotta espressione dei geni menzionati HIF-1, VEGF, NF-kB, FOXO1 e ATGL (coinvolti in "pathway" correlate a infiammazione e ipossia) nell'AT dei topi trattati con Spironolattone o

CORT118335. Analogamente ci si attende di osservare una ridotta espressione di marker infiammatori e di ipossia nell'AT dei topi KO per MR specifico del macrofago.

Il progetto mira quindi a stabilire se i menzionati trattamenti farmacologici possano rappresentare una valida strategia per contrastare l'insorgenza e l'aggravamento di disfunzioni metaboliche a carico del tessuto adiposo e del metabolismo glucidico.

Nello studio sono utilizzati topi maschi WT sottoposti a dieta obesogena (HFD) e trattati in parallelo con antagonisti del recettore mineralcorticoide (MR) e topi transgenici mancanti di MR nell'adipocita (topi adipo MR) o nel macrofago (topi mac MR) anch'essi sottoposti a dieta obesogena. Su tali gruppi di animali è stato effettuato un test di tolleranza al glucosio tramite iniezione intraperitoneale di glucosio e successiva misurazione dei livelli di glucosio circolanti. Sono state effettuate analisi di real-time PCR (utilizzando Mx3000P light cycler, Stratagene) e analisi di western blot per valutare l'espressione di geni e proteine coinvolti nel "signaling" molecolare regolato da MR e ATGL. Sono state impiegate inoltre tecniche di immunoistochimica per analizzare la morfologia del tessuto (presenza di grasso ectopico) e la localizzazione di specifiche proteine.

L'obiettivo della ricerca consiste nell'analizzare in particolare il ruolo di MR nella regolazione della funzione dell'adipocita trigliceride lipase (ATGL), coinvolta nella modulazione del processo di lipolisi e quindi nel metabolismo dei lipidi.

In topi C57BL/6 wild type (wt), a cui è stata somministrata dieta obesogena, il co-trattamento con antagonisti di MR (MRA) contrastava lo sviluppo di obesità e dell'alterato metabolismo glucidico. In particolare, gli MRA reprimevano l'espansione del tessuto adiposo bianco e determinavano attivazione metabolica del tessuto adiposo bruno interscapolare (BAT), mostrando quindi un'azione antiobesogena. Al livello del BAT, il trattamento con MRA promuoveva l'espressione di geni specifici dell'adipocita bruno, stimolando l'attività dell'AMP-activated protein Kinase (AMPK) che, a sua volta, aumentava l'attività di ATGL, con conseguente riduzione delle dimensioni delle gocce lipidiche intracellulari e con aumentata espressione della proteina mitocondriale UCP1. L'aumento dei livelli di UCP1 indicava un potenziamento dell'attività termogenica del BAT, probabilmente dovuto a rilascio di acidi grassi derivanti dai trigliceridi intracellulari a seguito dell'attivazione della lipase ATGL. In colture di adipociti bruni murini (T37i) il trattamento con MRA, o con l'inibitore di AMPK iodotubercidina, o con l'inibitore specifico di ATGL Atglistatin, riduceva l'espressione di UCP1 dimostrando che il trattamento con MRA è in grado di modulare il "pathway" molecolare MR-AMPK-ATGL-UCP1.

Il ruolo di MR nella modulazione dell'infiammazione del tessuto adiposo è stato studiato in topi transgenici mancanti di MR nell'adipocita (topi adipo MR) o nel macrofago (topi mac MR) e sottoposti a dieta obesogena. Con tale dieta entrambi i gruppi hanno guadagnato peso e hanno sviluppato ampie masse adipose, come pure un'alterata tolleranza al glucosio, in misura paragonabile a topi di controllo (wt) esprimenti MR nell'adipocita e nel macrofago. Tali esperimenti hanno dimostrato che l'assenza di MR nell'adipocita non altera il differenziamento dell'adipocita, né l'espressione di marcatori infiammatori nel tessuto adiposo, né protegge dalle alterazioni del metabolismo glucidico causate da dieta obesogena. Analogamente, in topi mac MR l'assenza di MR nei macrofagi non protegge dall'alterata espansione e dalle disfunzioni del metabolismo glucidico indotte da dieta obesogena. Gli esperimenti su entrambi questi modelli suggeriscono che l'assenza di MR nell'adipocita maturo e nel macrofago non preserva la funzione del tessuto adiposo in condizioni di dieta obesogena. D'altra parte, sia in topi wt che in colture di preadipociti murini in differenziamento, il trattamento con MRA contrasta la maturazione dell'adipocita bianco ma promuove l'adipogenesi "bruna", suggerendo che il blocco di MR modula la funzione della cellula adiposa agendo su pathway molecolari attive durante il differenziamento. In particolare, in preadipociti bruni della linea cellulare T37i, il trattamento

con MRA durante il differenziamento stimola l'attivazione del pathway MR-AMPK-ATGL con conseguente aumentata espressione di UCP-1 e potenziamento della funzione termogenica.

### **Progetti di ricerca sponsorizzati da privati**

*Studio randomizzato controllato, per la valutazione dello schema nutrizionale metabolico chetogenico in soggetti con emicrania episodica ad alta frequenza*

Il controllo del peso corporeo è un cardine del trattamento efficace dell'emicrania poiché è stato dimostrato che il rischio di emicrania cronica è aumentato del 9% in soggetti in sovrappeso e del 15% in quelli obesi.

La fisiopatologia sembra attribuibile ad un aumento del rilascio di CGRP (peptide correlato al gene della calcitonina) e di citochine proinfiammatorie da parte degli adipociti.

La dieta chetogenica (Very Low Calory Ketogenic Diet – VLCKD), è un regime fortemente ipocalorico (< 800 Kilocalorie) che si basa sulla drastica riduzione nell'intake di carboidrati (di solito < 50 g/die), associata ad una riduzione dei grassi esogeni (30 g di olio extra-vergine di oliva) e caratterizzata da un introito proteico compreso tra 1.2 e 1.5 g/kg di peso corporeo ideale. Questa fase è seguita dalla progressiva reintroduzione dei pasti convenzionali proteici, e successivamente dei carboidrati a basso indice glicemico.

Tali programmi di alimentazione controllata, che comportano di fatto la riduzione dei glucidi e dei lipidi, associata al consumo di proteine ad alto valore biologico, permettono di ridurre rapidamente la massa grassa attraverso complesse reazioni biochimiche ed ormonali che favoriscono la lipolisi. Le VLCKDs forniscono un valore medio di proteine compreso tra 1.2 e 1.5 g per kg di peso corporeo ideale al giorno (allo scopo di preservare la massa magra), in aggiunta alle razioni giornaliere raccomandate di minerali e vitamine, oligoelementi e acidi grassi essenziali. In tali percorsi dietetici sono inoltre raccomandati almeno 10 gr/die di grassi in modo da stimolare la contrazione della colecisti ed una quantità di carboidrati, che non deve superare i 50 gr/die, utili al fine di mantenere la glicemia entro i range di normalità, ottenendo una chetogenesi controllata. La VLCKD ha effetti importanti sullo stato di attivazione del sistema immunitario. E' noto infatti che il tessuto adiposo, producendo adipochine, svolge un'azione di controllo delle cellule dell'immunità innata e adattativa. Individui obesi o con problemi di cattiva alimentazione hanno sistemi immunitari prone allo sviluppo di patologie autoimmunitarie o di infiammazione cronica. Inoltre la VLCKD esercita importanti effetti sull'attività neuronale ed è impiegata nel trattamento dell'epilessia da quasi un secolo.

L'utilità della VLCKD è stata evidenziata anche in diverse patologie neurologiche quali malattia di Parkinson, demenza di Alzheimer, tumori cerebrali e autismo, grazie all'influenza che esercita sulla plasticità neuronale, sulla modulazione dell'equilibrio tra neurotrasmettitori inibitori ed eccitatori e sugli effetti neuroprotettivi attraverso la produzione di corpi chetonici e la riduzione dei livelli di glucosio ematico

Diverse evidenze sperimentali supportano l'impiego della VLCKD nel controllo dell'emicrania. Sono stati osservati ad esempio: la riduzione della cortical spreading depression, il miglioramento del metabolismo energetico neuronale, il contrasto della neuroinfiammazione, la riduzione dell'espressione ippocampale di TNF $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e COX2, la riduzione della traslocazione nucleare di NF $\kappa$ B nell'ippocampo, la riduzione della produzione mitocondriale di ROS (Reactive Oxygen Species: importanti molecole di segnale che mediano lo stress ossidativo ed il danno cellulare) e la riduzione dei livelli di glutammato grazie all'attivazione del metabolismo dell'astrocita.

La VLCKD si è dimostrata efficace nel trattamento dell'epilessia farmaco-resistente e altre patologie neurologiche (quali, ad esempio, il morbo di Parkinson e forme di demenza tra le

quali la demenza di Alzheimer), e ci sono evidenze che dimostrano la sua efficacia anche nel trattamento dell'emicrania. Considerando inoltre l'effetto negativo dell'obesità sull'emicrania, un regime dietetico che preveda un basso introito calorico giornaliero, può dimostrarsi utile sia nel controllo del peso corporeo che nel miglioramento dell'emicrania. In particolare potrebbe ridurre la frequenza degli eventi emicranici grazie alla restrizione calorica e alla chetosi metabolica controllata. Lo scopo di questo studio è di valutare l'impatto di uno schema nutrizionale VLCKD rispetto ad una dieta bilanciata ipocalorica non chetogenica (HBD), sull'andamento dell'emicrania ad alta frequenza, in virtù non solo delle capacità di indurre calo ponderale, ma anche di migliorare il metabolismo energetico neuronale, riducendone l'ipereccitabilità, contrastando la neuroinfiammazione e aumentando l'efficienza della trasmissione e della plasticità sinaptiche. Infatti la VLCKD promuove la biogenesi mitocondriale che si accompagna un metabolismo mitocondriale più efficiente e a un'aumentata produzione energetica.

In questo studio randomizzato controllato si intende investigare come influisca il regime alimentare della VLCKD rispetto alla dieta di controllo, sull'andamento dell'emicrania ad alta frequenza nei pazienti arruolati, valutando primariamente:

- la variazione del numero dei giorni di emicrania e della durata degli attacchi (espressa in ore)

Si valutano anche:

- la perdita di peso e l'indice di massa corporea (BMI),
- l'immunofenotipo con particolare riferimento alle cellule T infiammatorie e regolatorie, in risposta al trattamento dietetico (VLCKD vs dieta di controllo)
- l'impatto della VLCKD sui parametri ematici per la valutazione della funzionalità renale ed epatica
- il quadro metabolico, elettrolitico e ormonale.
- i livelli di aldosterone.

La qualità della vita e il grado di disabilità misurati con test SF-36, MIDAS, HIT-6 e VAS non mostrava differenze significative tra i due gruppi al momento dell'arruolamento.

Primary outcome:

1. Cambiamento nella frequenza degli eventi emicranici. Sono utilizzati due differenti test (Migraine Disability Assessment Score Questionnaire (MIDAS) and Headache Impact Test (HIT-6)) per stabilire quanto gli eventi emicranici influiscano sulla vita dei pazienti e misurare l'impatto dell'emicrania sulle loro attività quotidiane. Inoltre è prescritto di tenere un diario degli eventi emicranici.

Secondary outcomes:

2. Cambiamento nella durata degli episodi emicranici  
Saranno utilizzati due differenti test (Migraine Disability Assessment Score Questionnaire (MIDAS) and Headache Impact Test (HIT-6)) per stabilire quanto gli eventi emicranici influiscano sulla vita dei pazienti e misurare l'impatto dell'emicrania sulle loro attività quotidiane. Inoltre sarà prescritto di tenere un diario degli eventi emicranici.
3. Calo ponderale e indice di massa corporea (BMI)

Ad ogni visita viene effettuata una valutazione delle misure antropometriche (peso, circonferenze vita e fianchi)

4. Cambiamento nei parametri immunologici  
Il sistema immunitario determina la suscettibilità degli individui sovrappeso/obesi alle patologie infiammatorie, pertanto saranno caratterizzate le sottopopolazioni linfocitarie dei pazienti.
5. Cambiamento della qualità della vita



Sono utilizzati due differenti test (Health Survey-36 (SF-36) and Visual Analog Scale for pain (VAS)) per determinare l'impatto dell'emicrania sulla qualità della vita.

#### 6. Cambiamento nel consumo di analgesici

La VLCKD potrebbe dimostrarsi efficace per un rapido miglioramento a breve termine degli eventi emicranici in pazienti in sovrappeso, e rappresentare un valido strumento terapeutico nei pazienti che soffrono di emicrania episodica ad alta frequenza.

Presso gli ambulatori dell'IRCCS San Raffaele sono stati arruolati 57 soggetti con i seguenti criteri:

Criteri di inclusione:

- BMI >27 kg/m<sup>2</sup>
- insorgenza degli eventi emicranici <50 anni con frequenza mensile di 8-14 giorni negli ultimi 3 mesi
- assenza di terapia di profilassi per emicrania nei 3 mesi precedenti
- firma del consenso informato
- assenso a seguire le procedure prescritte dallo studio comprese le visite di controllo
- test urinario di gravidanza negativo
- utilizzo di metodi contraccettivi per l'intera durata dello studio
- consenso da parte di tutti i partecipanti allo studio di non rendere pubbliche le informazioni circa lo studio in essere

Criteri di esclusione:

- BMI > 35 kg / m<sup>2</sup>;
- trattamento di profilassi per emicrania nei 3 mesi precedenti
- trattamento con antidepressivi o sostanze neurolettiche durante lo svolgimento dello studio (controlli compresi)
- trattamento con diuretico non risparmiatore di potassio durante lo studio (incluse visite di controllo)
- utilizzo o impianto di stimolatori utilizzati per le emicranie
- emicrania con o senza uso eccessivo di farmaci, cefalee muscolo-tensive, cefalee a grappolo, emicranie sporadiche, emicrania di origine oftalmica, emicrania di base definita in base alla classificazione ICHD-3 beta nei tre mesi precedenti
- traumi cranici
- problemi psichiatrici che possano influenzare l'aderenza al trattamento
- diabete mellito di tipo I o di tipo II trattato con terapia insulinica
- facenti uso di supplementi che influiscano sul peso corporeo
- facenti uso di sostanze che contengano zuccheri nelle loro composizioni
- stato di gravidanza o allattamento
- abuso di alcol
- altre patologie neurologiche, cardiovascolari, epatiche, respiratorie, ematologiche, autoimmuni, o altre alterazioni dei parametri di test di laboratorio che possano compromettere lo studio.

I pazienti così arruolati verranno randomizzati in due gruppi paralleli che riceveranno per 3 mesi due regimi dietetici differenti: lo schema nutrizionale VLCKD o la dieta ipocalorica bilanciata non chetogenica HBD con pasti convenzionali.

Lo schema nutrizionale per la terapia chetogenica controllata è diviso nei tre step seguenti:

1° step: VLCKD della durata di 4 settimane in cui verranno assunti 5 pasti sostitutivi (3 masticabili e 2 liofilizzati).

2° step: VLCKD della durata di 4 settimane ed a sua volta suddiviso in due fasi: 2a) in cui verranno assunti un pasto proteico convenzionale, 3 prodotti masticabili ed un prodotto liofilizzato. 2b) in cui verranno assunti 2 pasti proteici convenzionali, 2 prodotti masticabili ed un prodotto liofilizzato.

3° step: low calorie diet (LCD) con pasti sostitutivi) della durata di 4 settimane anch'esso suddiviso in 2 fasi:

3a) reinserimento di latticino a colazione, un solo prodotto masticabile, un frutto come spuntino;

3b) reinserimento di una porzione di legumi a pranzo o a cena 3 volte a settimana, una porzione di cereali (pane o pasta) a pranzo, un prodotto masticabile.

Il gruppo di controllo segue un regime dietetico ipocalorico bilanciato (HBD) a basso indice glicemico, non chetogenico, senza assunzione di pasti sostitutivi. Al termine delle 12 settimane dei due regimi dietetici i soggetti di entrambi i gruppi di trattamento proseguiranno con una dieta a basso indice glicemico (hypocaloric balanced diet (HBD), non chetogenica, senza assunzione di pasti sostitutivi per ulteriori 12 settimane.

A tempi predefiniti, i soggetti sono sottoposti ad esami ematici per la valutazione della funzionalità renale ed epatica, il quadro metabolico, elettrolitico, ormonale ed immunofenotipico.

Lo studio ha arruolato 57 pazienti, 29 hanno intrapreso il percorso VLCKD (Very Low Calorie Ketogenic Diet), 28 pazienti sono stati arruolati nel gruppo controllo HBD (Human Being Diet).

Nel gruppo di pazienti che ha seguito il protocollo VLCKD, 4 pazienti (13% del campione) hanno interrotto lo studio (drop-out), mentre nel gruppo controllo (HBD) 14 pazienti (50% del campione) hanno interrotto lo studio prima del termine.

Al momento dell'arruolamento non c'erano differenze statisticamente significative tra i due gruppi in termini di età, sesso, BMI ed esami ematici.

La frequenza dell'emicrania (misurata come giorni/mese) era simile fra i due gruppi di studio, se pur leggermente maggiore nel gruppo di pazienti che ha seguito la VLCKD.

La durata dell'attacco di emicrania era simile tra i due gruppi.

Tutti i pazienti arruolati avevano sospeso la terapia di profilassi da almeno tre mesi al momento di iniziare il percorso alimentare. Tutti i pazienti assumevano solo terapia al momento del bisogno per l'attacco di emicrania.

La frequenza dell'emicrania (espressa in giorni/mese) si è significativamente ridotta nel gruppo di pazienti che ha seguito la VLCKD, riducendo i giorni di emicrania di circa 6 giorni al mese, rispetto ai circa 2 giorni al mese nel gruppo controllo.

Nessuna significativa variazione è avvenuta nel corso dello studio in termini di intensità o durata dell'attacco di emicrania.

Al tempo V5, il confronto del response rate (-20, -50%) tra i due gruppi non ha mostrato differenze significative, tuttavia nel gruppo VLCKD il 42.9% ha ridotto la frequenza dell'emicrania del 50%, mentre nel gruppo HBD il 38.9% ha raggiunto lo stesso risultato.

Al tempo V6, il response rate -50% ha raggiunto il 69.2% nel gruppo VLCKD e il 40% nel gruppo HBD.

In media, il calo ponderale, la riduzione del BMI e delle circonferenze vita e fianchi è stato il doppio nel gruppo VLCKD rispetto al gruppo controllo, sia a V5 che a V6 (il gruppo VLCKD aveva ormai inserito tutti i cibi convenzionali).

Per quanto riguarda l'intensità degli attacchi di emicrania e il grado di disabilità percepito, nessuna differenza significativa è risultata durante il periodo dello studio nei due gruppi, dopo valutazione tramite i seguenti test: MIDAS, HIT-6 e VAS.

La qualità della vita, valutata tramite SF-36, ha evidenziato un miglioramento in alcuni ambiti (attività fisica, salute generale, vitalità, attività sociali) solo nel gruppo VLCKD.

Infine, il gruppo VLCKD ha registrato una maggiore aderenza al percorso dietetico rispetto al gruppo controllo.

I pazienti che hanno intrapreso il percorso VLCKD non hanno registrato variazioni significative delle analisi ematiche, in particolare dei valori di creatinina o degli elettroliti.

A V5 (corrispondente al momento di conclusione della chetosi e all'inizio della reintroduzione dei carboidrati a basso indice glicemico), il valore medio della chetonemia misurato su sangue capillare era  $0.86 \pm 0.56$ .

Nessuna differenza significativa è stata registrata per quanto concerne gli indici infiammatori (proteina C reattiva, NLR, PLR).

Nel gruppo VLCKD, nel corso dello studio, sono state registrate riduzioni significative di alcuni valori dell'emocromo (globuli bianchi, piastrine), mentre l'immunofenotipo non si è sostanzialmente modificato.

Nel corso dello studio, nessun effetto avverso serio è stato registrato nei due gruppi.

Nel gruppo che ha seguito la VLCKD, effetti avversi comuni come crampi, peggioramento della cefalea, dolori muscolari, spossatezza, costipazione ed ipotensione, sono stati registrati limitatamente alla prima fase della dieta (prime 4 settimane).

I pazienti che hanno interrotto il percorso di VLCKD hanno riferito di aver abbandonato per insoddisfazione legata al calo ponderale atteso, scarsa tolleranza alla restrizione dei carboidrati, scarsa variabilità nelle scelte alimentari, difficoltà di conciliare la dieta con la vita sociale. Una paziente ha interrotto lo studio per positività al test di gravidanza.

Nel gruppo controllo (HBD), le ragioni che hanno spinto i pazienti ad interrompere precocemente lo studio sono state le seguenti: insoddisfazione per il calo ponderale raggiunto, mancanza di tempo per organizzare i pasti, scarsa disponibilità a modificare le proprie abitudini alimentari.

Questo studio randomizzato controllato ha dimostrato che la dieta chetogenica a basso contenuto calorico (VLCKD) rappresenta un valido strumento nella prevenzione dell'emicrania ad alta frequenza in pazienti in sovrappeso.

Infatti, nel corso dello studio, la frequenza degli attacchi di emicrania si è ridotta del 50% in quasi circa la metà del campione a V5, mantenendosi tale anche dopo la reintroduzione dei cibi convenzionali (V6).

L'outcome principale dello studio (riduzione della frequenza dell'emicrania del 20% rispetto all'inizio) è stato così raggiunto al termine dello stesso.

Il calo ponderale è stato maggiore nel gruppo che ha seguito la VLCKD rispetto al gruppo controllo, dimostrando la superiorità della VLCKD rispetto alla dieta ipocalorica bilanciata in termini di riduzione di BMI e di distribuzione del grasso corporeo (circonferenze vita e fianchi).

E' noto, tuttavia, che il percorso VLCKD, rappresenti un percorso alimentare fortemente restrittivo (utilizzo di pasti sostitutivi e rinuncia al cibo convenzionale per le prime settimane) che implica una forte motivazione tale da garantire la piena adesione al percorso. D'altro canto si segnala come principali fattori di abbandono al percorso dietetico il mancato raggiungimento del calo ponderale atteso ma soprattutto la scarsa capacità di adattamento al nuovo regime alimentare.

In termini di effetti avversi, i pazienti dei due gruppi non hanno registrato effetti avversi seri.

I pazienti che hanno seguito la VLCKD non hanno registrato modifiche sostanziali dei valori di creatinina (filtrato renale) e degli elettroliti sierici.

Il profilo infiammatorio non si è modificato in modo significativo nel corso dello studio, probabilmente a causa dei tempi relativamente troppo brevi dello studio.

In definitiva, l'uso della VLCKD con l'aggiunta di una maggior quota di L-carnitina si conferma essere un valido strumento per la prevenzione dell'emicrania ad alta frequenza, in particolare perché consente di ridurre la terapia di profilassi e di intervenire solo con farmaci per la gestione dell'attacco acuto.

*Effetti della dieta chetogenica sullo sviluppo di aterosclerosi in topi Knockout per l'apolipoproteina E*

L'obesità è una malattia cronica multifattoriale caratterizzata da un accumulo di grasso viscerale e sottocutaneo, che determina una predisposizione alle malattie cardiometaboliche. Si ritiene che molteplici meccanismi, tra cui anomalie nel metabolismo dei lipidi, insulino-resistenza, infiammazione, disfunzione endoteliale, squilibrio nella secrezione di adipochine e attivazione dell'inflammasoma, siano alla base della relazione tra obesità e aterosclerosi. L'aterosclerosi è la principale causa alla base delle malattie cardiovascolari (CVD). L'aterosclerosi rappresenta una delle principali cause di mortalità e morbilità a livello mondiale ed è caratterizzata da uno stato infiammatorio cronico in cui i vasi sanguigni sono infiltrati da lipidi e leucociti che determinano la formazione di placche aterosclerotiche. La maggior parte degli eventi cardiaci acuti è associata a eventi trombotici dovuti alla rottura della placca. Comprendere come i nutrienti possano influenzare la funzione cellulare, il metabolismo e lo stato di salute generale in un modello animale, fornisce una base scientifica rigorosa per identificare un approccio dietetico che potrebbe ridurre e possibilmente aiutare a far regredire la CVD contribuendo al mantenimento di un corretto e salutare stile di vita. I modelli animali di CVD, comprese le malattie cardiache e aterotrombotiche, forniscono importanti informazioni sulla progressione e fisiopatologia delle CVD e sono diventati strumenti essenziali per valutare nuove strategie terapeutiche, per prevedere o prevenire le complicanze. Sebbene abbiano dei limiti, i topi con modificazioni genetiche che esacerbano i fenotipi CVD indotti dalla dieta, sono la scelta più comune per simulare la malattia umana. I topi mancanti di apolipoproteina E (ApoE<sup>-/-</sup>) sviluppano lesioni in qualsiasi stadio dell'aterosclerosi e sono paragonabili a quelle che si osservano nell'uomo. Generalmente, i topi ApoE<sup>-/-</sup>, sviluppano spontaneamente l'aterosclerosi e questo processo è accelerato con una dieta aterogena (ricca di grassi e colesterolo). La severità dell'aterosclerosi può essere valutata a livello delle arterie carotide, polmonare, femorale e brachiocefalica e anche della radice aortica. In particolare, la radice aortica rappresenta un sito anatomico soggetto a sviluppare lesioni aterosclerotiche nei topi. Per questo motivo è prassi comune valutare la formazione di placche aterosclerotiche in questa regione. Diversi studi hanno dimostrato che l'aldosterone (aldo), il ligando naturale del recettore dei mineralcorticoidi (MR), è implicato nello sviluppo dell'aterosclerosi. Studi effettuati nel nostro laboratorio hanno dimostrato che l'infusione di aldosterone in topi ApoE<sup>-/-</sup> alimentati con una dieta aterogena, accelera lo sviluppo di lesioni aterosclerotiche della radice aortica inducendo la formazione di placche infiammate e ricche di lipidi.

Nell'uomo, la composizione dei regimi dietetici, l'apporto calorico e i modelli di alimentazione, sono da considerarsi tra i principali fattori che influenzano l'invecchiamento e le malattie croniche. Le scelte nutrizionali da sole, o in combinazione con altri fattori legati allo stile di vita, possono influire sul rischio di sviluppare CVD, in parte, influenzando l'infiammazione cronica di basso grado legata alla salute cardiovascolare. Il consumo di un basso contenuto di grassi saturi e ad alto contenuto di grassi insaturi, ad esempio, determina una minore incidenza di CVD. Negli ultimi anni l'attenzione si è puntata il dito sui carboidrati come corresponsabili nell'insorgenza di CVD e altre malattie metaboliche. Infatti, un elevato consumo di carboidrati insieme a regimi alimentari ad alto indice glicemico o carico glicemico è costantemente associato ad un alto rischio di CVD. Sulla base di queste evidenze, gli interventi dietetici si stanno affermando come terapie potenzialmente efficaci nei confronti dell'insorgenza di alcune malattie cardiovascolari. Il potenziale vantaggio delle terapie nutrizionali risiede nel fatto che sono in grado di ridurre l'infiammazione e il danno ossidativo e potenzialmente anche ridurre il rischio di sviluppare malattie cardiovascolari. Le diete a basso contenuto di carboidrati, comprese le diete chetogeniche (KD), che sono definite da un basso o molto basso di carboidrati (di solito <50 g/giorno), vengono adottate allo scopo di revertire i disturbi metabolici e potenzialmente anche l'insorgenza delle malattie cardiovascolari. In seguito al

costante aumento dei tassi di obesità a livello mondiale, le diete chetogeniche a bassissimo contenuto calorico (VLCKD) sono diventate molto popolari. I moderni piani VLCKD forniscono un pasto sostitutivo nutrizionalmente equilibrato. Un'importante restrizione calorica porta a rapide riduzioni del grasso epatico, determinate dalla lipolisi epatica e dalla riduzione della deposizione ectopica di trigliceridi. Ciò consente una più efficiente ossidazione degli acidi grassi (FA) e una migliore sensibilità all'insulina a breve termine. A medio termine, le VLCKD possono ridurre il grasso pancreatico e aumentare la secrezione di insulina, oltre a migliorare la sensibilità all'insulina del muscolo scheletrico. La migliore sensibilità all'insulina combinata alla perdita di peso, dovrebbe apportare benefici al sistema cardiovascolare. Nell'uomo, le terapie a base di KD sono efficaci nell'indurre la perdita di peso (media  $\leq 5\%$  del peso corporeo a 6 mesi). Il principio alla base delle KD è rappresentato dall'esaurimento delle riserve di glicogeno e dall'attivazione dell'utilizzo degli acidi grassi per produrre corpi chetonici come fonti di energia. Gli effetti delle diete chetogeniche sulla funzione miocardica e vascolare non sono ancora stati evidenziati.

Ipotesizziamo che la KD possa proteggere dallo sviluppo dell'aterosclerosi attraverso l'azione dei corpi chetonici sul sistema cardiovascolare, in termini di ridotta formazione di placca aterosclerotica, effetto antinfiammatorio all'interno della placca. Che possa ridurre la proliferazione delle cellule muscolari lisce e migliorare la disfunzione endoteliale. La KD può rappresentare un valido approccio terapeutico non farmacologico nel trattamento delle malattie cardiovascolari legate all'obesità.

È noto che l'infiammazione vascolare e lo stress ossidativo svolgono un ruolo cruciale nel favorire l'insorgenza di CVD. Studi preclinici sulle diete chetogeniche hanno rivelato che i corpi chetonici esercitano proprietà antinfiammatorie e antiossidanti che possono preservare la funzione dei vasi e attenuare lo sviluppo dell'aterosclerosi. Si ipotizza che un intervento precoce con un programma VLCKD possa rappresentare un valido approccio non farmacologico per prevenire l'aterosclerosi e le malattie cardiovascolari in soggetti con obesità.

Questo studio consentirà:

- di ottenere nuove intuizioni sugli effetti della KD sul processo aterogenico utilizzando un modello murino pronò all'aterogenesi;
- di caratterizzare il ruolo dei corpi chetonici nella regolazione della funzione vascolare caratterizzando il loro impatto sull'immunofenotipo;
- di convalidare la VLCKD come una strategia nutrizionale efficace in grado di contrastare lo sviluppo di aterosclerosi.

Tramite l'analisi del modello sperimentale aterogeno rappresentato da topi ApoE<sup>-/-</sup> trattati con aldosterone e alimentati con dieta chetogenica ci si aspetta di osservare:

- una riduzione della formazione di placche aterosclerotiche e dell'infiammazione;
- un miglioramento della disfunzione endoteliale;
- una riduzione del livello di citochine pro-infiammatorie circolanti.

L'obesità è una malattia cronica multifattoriale che determina la predisposizione a malattie cardiometaboliche aumentando il rischio di sviluppare aterosclerosi e malattie cardiovascolari (CV). Modificare lo stile di vita, compresa l'alimentazione e l'attività fisica, rappresenta una prima linea di terapia. Le prove attuali suggeriscono che le diete chetogeniche (KD) contrastano l'insorgenza di sindrome metabolica e malattie cardiovascolari migliorando la composizione corporea, la pressione sanguigna, il controllo della glicemia e il metabolismo dei lipidi. Tuttavia, gli studi volti a valutare gli effetti benefici delle KD sulla funzionalità del sistema cardiovascolare, sono ancora agli albori. Questo progetto mira a valutare le azioni della KD sulla funzione cardiovascolare e sullo sviluppo della placca in un modello murino soggetto ad aterosclerosi. Il progetto potrebbe rivelare se le diete chetogeniche possono essere utilizzate

come approccio non farmacologico per prevenire disfunzioni e complicanze cardiometaboliche in soggetti a rischio di sviluppare patologie cardiovascolari.

In topi ApoE<sup>-/-</sup> maschi di otto settimane, viene impiantata una minipompa osmotica (modello Alzet 1004) contenente un veicolo per via sottocutanea (etanolo/soluzione salina) o aldosterone (6 µg/topo/giorno) per 4 settimane. Al momento dell'impianto della minipompa, i topi sono sottoposti a dieta chetogenica (90,5 % kcal da grasso (grasso anidro), 0,4 % kcal da carboidrati e 9,1 % da proteine; n = 12) o dieta aterogena (AD) (42 % kcal da grasso (grasso di latte anidro), 42,8 % da carboidrati, 15,2 % kcal da proteine; n = 12). Dopo 4 settimane, sono raccolti campioni di sangue periferico che verranno utilizzati per quantificare i livelli di beta-idrossibutirrato e per valutare l'infiammazione sistemica, una caratteristica chiave associata all'aterosclerosi, utilizzando un pannello di citochine infiammatorie. All'endpoint, i topi sono sottoposti a eutanasia e quindi perfusi con soluzione salina tamponata con fosfato, e vengono espunti i seguenti tessuti: cuore, aorta, depositi adiposi bruni e bianchi e milza. La valvola aortica è incorporata in OCT. Le criosezioni di radici aortiche incorporate vengono utilizzate per la colorazione con Oil-Red O, picosirius red e con anticorpi anti-Mac3 al fine di quantificare lipidi, core necrotico, contenuto di collagene e cellule infiammatorie attivate nella radice aortica a livello della valvola aortica. La colorazione in pixel che è positiva per il componente di interesse, è normalizzata sull'area complessiva della placca. Le immagini vengono raccolte e analizzate utilizzando il software ImagePro Premier (Media Cybernetics). Gli effetti della dieta chetogenica sulle funzioni vascolari (vasocostrizione, vasodilatazione e funzione endoteliale) sono valutati nell'arteria mesenterica dei topi ApoE<sup>-/-</sup> alimentati con KD o dieta aterogena, mediante miografia a filo (wire myography). Durante la miografia, gli anelli mesenterici (derivati da tutti i gruppi sperimentali) sono inoltre incubati con beta-idrossibutirrato (il corpo chetonico più abbondante nei mammiferi) per studiare l'effetto vascolare diretto dei corpi chetonici. Inoltre, caratterizzeremo la milza e gli archi aortici (regione anatomica ricca di placche aterosclerotiche) al fine di valutare l'infiammazione sistemica e della placca e aterosclerotica. Gli splenociti sono ottenuti mediante rottura meccanica della milza, seguita da diverse procedure di purificazione, mentre gli archi aortici saranno separati dalla porzione apicale del cuore e saranno digeriti con collagenasi per ottenere un pool di cellule immunitarie. Le cellule immunitarie, ottenute con queste procedure, sono utilizzate per l'analisi citofluorimetrica attraverso un pannello completo di anticorpi. Vengono analizzate diverse sottopopolazioni di linfociti, cellule T helper (Th), cellule T citotossiche/soppressorie, cellule natural killer, cellule B. Inoltre, analizzeremo l'abbondanza delle cellule T regolatorie anti-infiammatorie (Treg) e delle cellule pro-infiammatorie Th1 e Th17.

I campioni di aorta vengono utilizzati per valutare i marker di disfunzione endoteliale e di infiammazione attraverso l'analisi qRT-PCR.

I topi trattati con aldosterone ed alimentati con HFD dopo 4 settimane hanno mostrato un incremento di peso statisticamente significativo rispetto ai topi trattati con aldosterone ma alimentati con la dieta chetogenica. Inoltre questi ultimi hanno avuto un miglioramento della tolleranza al glucosio rispetto ai topi trattati con la dieta ad alto contenuto di grasso (42%). Dopo le 4 settimane, prima del sacrificio, ai topi è stato prelevato il sangue periferico dal plesso mandibolare. In seguito ad eutanasia i topi sono stati perfusi con soluzione salina tamponata con fosfato e sono stati espunti i seguenti tessuti: cuore, aorta, depositi adiposi bruni e bianchi e milza. La valvola aortica è stata incorporata in OCT. Le criosezioni a livello della valvola aortica, sono state colorate con Red Oil al fine di quantificare il contenuto di lipidi e con picosirius red per analizzare il contenuto di collagene.

I risultati ottenuti mostrano una riduzione della grandezza della placca aterosclerotica e del contenuto dei lipidi nei topi APOE KO trattati con aldosterone e alimentati con dieta chetogenica rispetto ai topi APOE KO trattati con aldosterone ma alimentati con una dieta ad

alto contenuto di grasso. Questi risultati mostrano un impatto positivo della chetosi nella prevenzione dello sviluppo della aterosclerosi.

Inoltre la dieta chetogenica determina una significativa riduzione della espressione genica dei markers pro infiammatori (ICAM-1, VCAM-1, IL-6 TNF- $\alpha$  e MCP-1) con concomitante upregolazione dei markers anti-infiammatori (Arg-1, RETNLA) a livello nel tessuto aortico dei topi APOE KO trattati con aldosterone e alimentati con dieta chetogenica rispetto ai topi APOE KO trattati con aldosterone ma alimentati con una dieta ad alto contenuto di grasso.

Questo studio identifica la dieta chetogenica come un potenziale approccio nutrizionale per prevenire lo sviluppo di aterosclerosi in soggetti con alto rischio cardiovascolare. Infatti abbiamo dimostrato che la dieta chetogenica determina una diminuzione dell'infiammazione vascolare e riduce le lesioni aterosclerotiche in topi APOE (proni allo sviluppo di aterosclerosi) trattati con aldosterone

### *Finerenone and non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: potential systemic beneficial effects through blockade of the mineralocorticoid receptor in liver*

Il progetto si propone di studiare gli effetti del Finerenone sulla sensibilità insulinica, sulla deposizione di grasso ectopico e sul profilo lipidico plasmatico in un modello di topi diabetici. In particolare lo studio si propone di evidenziare gli effetti del Finerenone sulla deposizione di grasso e sulla fibrosi nel fegato di topi diabetici alimentati con una dieta priva di metionina e colina che li rende proni a sviluppare la Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) e a lungo termine la steatosi epatica non alcolica (NASH). I risultati potrebbero essere utili ad evidenziare una potenziale azione biologica del Finerenone sul fegato che potrebbe portare a benefici clinici in pazienti diabetici.

L'espressione del recettore mineralcorticoide in un'ampia gamma di tessuti suggerisce un ruolo importante di questo recettore in diversi contesti fisiologici e fisiopatologici, come la sindrome cardio-metabolica, lo stress ossidativo, l'infiammazione e la fibrosi epatica. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che il blocco di MR con il Finerenone è in grado di migliorare parametri metabolici come l'attivazione del tessuto adiposo bruno in un modello di obesità indotto dalla dieta. Il sistema Renina-Angiotensina-Aldosterone è coinvolto nella patogenesi della NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease). Infatti è stato dimostrato che il blocco di MR con l'eplerenone determina un miglioramento nella steatosi e nella fibrosi epatica. In accordo con questi dati, nel nostro laboratorio è stato dimostrato che topi wild type alimentati per 12 settimane con una dieta con moderato contenuto di grassi (high fat diet, HFD, 45% di calorie da grassi) mostrano steatosi epatica associata ad obesità e che il blocco farmacologico del recettore mineralcorticoide è in grado di prevenire lo sviluppo di steatosi.

La NAFLD è caratterizzata da un eccessivo accumulo di grassi nel fegato dovuto a disordini metabolici che includono diabete di tipo 2, obesità e malattie cardiovascolari. Esiste infatti una relazione fisiopatologica tra la NAFLD e il diabete di tipo 2. Quest'ultimo determina un incremento del grasso nel fegato tale da portare ad un peggioramento della patologia denominata steatosi epatica non alcolica (NASH) caratterizzata da una condizione più grave in cui il fegato è soggetto a processi infiammatori, di cicatrizzazione e necrosi tissutale che alterano in modo definitivo la funzionalità dell'organo. La complicanza peggiore nei pazienti con NAFLD è la fibrosi epatica. La dieta ad alto contenuto di grassi è utilizzata per indurre la NAFLD associata all'obesità e all'insulino resistenza, tuttavia la gravità della patologia in termini di steatosi, infiammazione e fibrosi dipende dal modello animale, dalla durata della somministrazione della dieta e dalla composizione della dieta stessa.

I topi db/db rappresentano un buon modello per studiare la sindrome metabolica associata alla steatosi epatica non alcolica. Un recente studio ha dimostrato che i topi db/db alimentati con

una dieta priva di metionina e colina (dieta MCD) sono un modello alternativo per lo studio della progressione della NAFLD verso la NASH. Infatti i topi db/db sono obesi, iperglicemici, insulino resistenti e mostrano una iperleptinemia basale. Nonostante ciò non presentano né steatosi e né fibrosi epatica. Se invece vengono alimentati con una dieta MCD sviluppano velocemente steatosi e fibrosi epatica. Infatti la colorazione di sezioni di fegato con ematossilina & eosina ha mostrato presenza di steatosi con marcata infiammazione e accumulo di collagene. Un altro studio ha dimostrato che topi db/db di 8–10 settimane alimentati con una dieta MCD per 4 settimane sviluppano steatosi epatica. Infine Wortham e colleghi hanno dimostrato che topi db/db di 12 settimane alimentati per due settimane con una dieta MCD mostrano una severa steatosi epatica rispetto sia a topi wild type alimentati sempre per 2 settimane con la stessa dieta che a topi db/db alimentati con una dieta normale.

In questo contesto topi obesi/diabetici rappresentano un valido modello per studiare la funzione del recettore mineralcorticoide nella fisiopatologia della fibrosi e dell'accumulo di grasso nel fegato. L'antagonismo di MR con il Finerenone potrebbe rappresentare una nuova terapia farmacologica per bloccare la progressione della malattia attraverso la riduzione dell'infiammazione e/o della fibrosi epatica.

La crescente diffusione del diabete mellito di tipo 2 rappresenta un serio problema di salute pubblica. Chiaramente, oltre all'adozione di uno stile di vita più sano, l'impiego di terapie farmacologiche mirate a bloccare quei fattori che promuovono lo sviluppo di alterazioni metaboliche porterebbe ulteriori benefici terapeutici.

L'attivazione di MR, nel tessuto adiposo come al livello dell'apparato cardiovascolare, determina patologie che hanno un forte impatto sulla salute. La steatosi epatica non alcolica (NAFLD), più comunemente conosciuta come malattia da fegato grasso, rappresenta oggi la forma più diffusa di epatopatia cronica nei Paesi Occidentali. Approssimativamente ha una prevalenza del 25% nella popolazione adulta e di questi circa il 30% evolve in NASH (steatosi epatica non alcolica). Queste percentuali sono destinate a crescere ancora di più nei prossimi anni, divenendo così un importante problema di salute pubblica da affrontare. La maggior parte dei pazienti con NAFLD presentano molteplici fattori di rischio cardiovascolare. Il nostro scopo principale è quello di investigare gli effetti del blocco del recettore mineralcorticoide sulla fibrosi e sulla deposizione di grasso nel fegato. L'antagonismo di MR con il Finerenone potrebbe rappresentare una nuova terapia farmacologica con l'obiettivo di arrestare la progressione della malattia attraverso la riduzione dell'infiammazione e/o della fibrosi epatica

Lo scopo dello studio è quello di analizzare i potenziali effetti benefici del blocco farmacologico di MR con il Finerenone sullo sviluppo di NAFLD in topi diabetici (db/db). Sulla base dei dati ottenuti in vivo si procede all'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nella fibrogenesi e nella sintesi de novo di acidi grassi in una linea cellulare di epatociti murini.

Al fine di valutare l'effetto protettivo del Finerenone nello sviluppo della NAFLD/NASH in topi diabetici si analizzano i seguenti gruppi:

- topi maschi db/db di 8 otto settimane di età da alimentare con dieta normale per 4 settimane
- topi maschi db/db di 8 otto settimane di età da alimentare con dieta normale addizionata con il Finerenone per 4 settimane
- topi maschi db/db di 8 otto settimane di età da alimentare con una dieta priva di metionina e colina per 4 settimane 10
- topi maschi db/db di 8 otto settimane di età da alimentare con una dieta priva di metionina e colina addizionata con il Finerenone per 4 settimane

Al termine dello studio gli animali vengono sacrificati tramite dislocazione cervicale e viene disseccato il fegato che è diviso per essere:



- fissato immediatamente in paraformaldeide al 4% overnight e successivamente incluso in OCT e conservato a -80°C per le analisi istochimiche;
- congelato in aliquote per essere utilizzato per le analisi di real time PCR sia per qRT-PCR che per western blot.
- In real time PCR è valutata l'espressione di citochine proinfiammatorie

Sulla base dei dati ottenuti dall'analisi dello studio in vivo si procederà all'analisi dei meccanismi molecolari coinvolti nella fibrogenesi e nella sintesi de novo di acidi grassi in una linea cellulare di cellule stellate epatiche (LX2).

Lo studio è iniziato nella seconda metà del 2022 con l'acquisto del modello murino e delle diete commerciali per la realizzazione dell'esperimento pilota.

## **LABORATORIO DI FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA DEL DOLORE**

### **Contributo della Fondazione ISAL e collaborazione scientifica con la Fondazione**

#### *I markers Bio-Psico- Sociali nel dolore cronico*

Il dolore cronico rappresenta una condizione difficile, poiché, essendo disabilitante e intrattabile, è causa di stress e sofferenza. Ogni anno, i sistemi sanitari nazionali europei spendono risorse economiche su farmaci e terapie, spesso senza alcun risultato chiaro e permanente (Wooden SR. et al 2017; Ruhe AK et al. 2017). Le linee guida terapeutiche standard non sono abbastanza chiare nella definizione di una strategia adeguata da seguire in condizioni di dolore. Analgesici oppiacei come la morfina sono i pilastri della gestione del dolore, in condizioni che vanno dal dolore acuto a quello cronico, con oltre 300 milioni di prescrizioni per oppiacei scritte annualmente in tutto il mondo. Inoltre, la loro utilità clinica è spesso ostacolata dallo sviluppo della tolleranza analgesica e dall'ipersensibilità dolorosa, nota anche come iperalgesia indotta dalla morfina (Lauro et al. 2016). Lo sviluppo della tolleranza al trattamento con morfina richiede dosi crescenti per ottenere un equivalente sollievo dal dolore. Con un trattamento prolungato, lo sviluppo dell'ipersensibilità indotta dalla morfina contrasta l'effetto terapeutico di tali aumenti di dose (Mao et al. 1995). Inoltre, pur mantenendo il controllo del dolore cronico, il trattamento con oppioidi porta a effetti collaterali debilitanti come un over-sedazione, ridotta attività fisica, depressione respiratoria, stitichezza e persino dipendenza. Una migliore comprensione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della patogenesi della "malattia da stato del dolore" è cruciale per lo sviluppo di efficaci strategie terapeutiche, per mantenere l'efficacia degli oppiacei durante il dosaggio cronico senza generare tolleranza o effetti collaterali inaccettabili. Ad ogni modo, si può pensare che il problema risieda anche nella mancanza di dati statistici sulla dose giusta per l'utilizzo del farmaco e l'efficacia a lungo termine. L'assenza di test oggettivi e marker biologici, per monitorare i fattori di rischio e lo sviluppo del dolore, porta a una considerazione ingannevole e negativa del consumo di oppioidi. È stato studiato che un'eccessiva risposta infiammatoria svolge un ruolo chiave nella patofisiologia del dolore cronico e diversi oppioidi o la diversa somministrazione di oppioidi mostra vari effetti sul sistema immunitario come la stimolazione immunitaria o l'immunosoppressione, o entrambi. Questa evidenza permette alla ricerca di studiare un approccio innovativo per controllare lo sviluppo e la progressione della malattia (Morgan et al. 2011). Al giorno d'oggi nessuno ha studiato se l'uso di farmaci analgesici oppioidi genera un fattore protettivo o peggiora le condizioni del paziente in base alla loro azione immunosoppressiva; se per ottenere un'azione protettiva, che si esplicita attraverso l'interazione con il sistema immunitario, sono necessari regimi di dosaggio diversi da quelli che consentono una semplice gestione del dolore; se esiste una tempistica standardizzata per il

trattamento da somministrare, al fine di evitare lo sviluppo della cronicizzazione patologica indipendente dall'operazione chirurgica effettuata.

Le profonde interazioni tra sistema nocicettivo-immunitario e oppioide e la presenza di un recettore oppioide periferico, estratto dal sangue, su cui i sistemi esprimono le loro interazioni, apre nuovi scenari sulla possibilità di avere un trattamento guidato da marker biologici, che definiscono uno standard terapeutico.

L'obiettivo di questo studio consiste nell'analizzare i recettori oppioidi espressi sulle membrane dei linfociti di sangue periferico, per valutare se possono essere identificati come marker idonei per lo sviluppo del dolore cronico di diversa eziologia al fine di identificare una terapia standard.

Per lo studio sono stati arruolati pazienti con osteoartrite, fibromialgici e controlli sani (arruolati presso l'Università degli studi di Roma "La Sapienza" - Policlinico Umberto I, firmando un modulo di consenso informato specifico, in seguito ad approvazione del comitato etico della Sapienza). Ad ogni paziente è stato prelevato un campione di sangue. L'espressione dei recettori oppioidi è stata determinata tramite FACS e western blotting.

Brevemente, una parte del sangue periferico è stato incubato con specifici anticorpi coniugati con fluorocromo, in combinazione con anticorpi che riconoscono i recettori oppioidi. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati lisati utilizzando la BD FACS Lysing Solution per 15 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 1500 RPM per 5 minuti. Il pellet risultante è stato acquisito e analizzato attraverso l'utilizzo del citofluorimetro LSR Fortessa X-20 (BD Science) utilizzando il software CellQuest.

L'espressione dei recettori oppioidi attraverso western blotting, è stata valutata, utilizzando cellule periferiche mononucleari (PBMCs), separate dal sangue attraverso il Ficoll e incubate con anticorpi specifici per i recettori  $\kappa$  e  $\mu$ .

I dati preliminari hanno evidenziato una diminuzione significativa della percentuale dei recettori oppioidi  $\mu$  sulla superficie dei linfociti B e NK in pazienti con fibromialgia e osteoartrite rispetto ai pazienti sani. Nessuna variazione invece è stata osservata nella percentuale dell'espressione dei recettori  $\kappa$  su queste cellule. Analizzando, invece, l'espressione dei recettori  $\mu$  e  $\kappa$  in cellule T totali, T citotossiche e T helper, non è stata osservata nessuna variazione nella percentuale di espressione di questi recettori, rispetto ai pazienti sani. In questo anno, grazie alla collaborazione tra ISAL e San Raffaele, è stata inoltre approfondita la percentuale di linfociti esprimenti il recettore  $\mu$ , sulle cellule NK, osservata nei pazienti fibromialgici arruolati nel follow up ad un anno dallo studio pilota (in press). Si è osservato che i risultati sono paragonabili a quelli precedenti: diminuita percentuale dell'espressione dei recettori  $\mu$  nelle cellule NK. Saranno necessari studi futuri per confermare i dati ottenuti e, in particolare, valutare quale sotto-popolazione dei linfociti B sia coinvolta maggiormente nel dolore cronico e studiare il ruolo delle cellule NK.

Questa ricerca clinica ha lo scopo di documentare se la realizzazione degli obiettivi citati è concreta e se i recettori oppioidi situati sulle membrane cellulari sono marker biologici idonei per il trattamento farmacologico. E' stato proposto un metodo per analizzare se l'oppioide possa modulare i linfociti suggerendo i recettori oppioidi come marcatori biologici per prevenire il dolore cronico.

## **LABORATORIO DI IMMUNOPATOLOGIA SINAPTICA**

### **Fondazione Italiana Sclerosi Multipla (FISM)**

*I genotipi del virus di Epstein-Barr nella sclerosi multipla ed il loro ruolo funzionale nell'eziologia della malattia*

In uno studio condotto su persone con sclerosi multipla (SM) e controlli è stata identificata l'associazione tra varianti genomiche del virus di Epstein-Barr (EBV) e la SM, rafforzando l'idea che EBV contribuisca allo sviluppo della malattia. Analizzando una regione del DNA virale che codifica per l'antigene nucleare 2 (EBNA2), è stato mostrato che il rischio di sviluppare la SM è significativamente correlato alla presenza dell'allele 1.2 e ad una sotto rappresentazione dell'allele 1.3B nel gruppo dei pazienti (Mechelli et al. 2015).

Oltre a EBNA2, altri loci del complesso genoma virale possono influire sulla patofisiologia della malattia. In uno studio esplorativo, dove sono stati interamente sequenziati i genomi di EBV derivati da linee cellulari linfoblastoidi spontanee (spLCL) ottenute da persone con SM e da donatori sani (HD), sono state individuate altre varianti virali che potrebbero essere correlate con l'insorgenza della malattia (Chaira et al. 2016).

L'obiettivo del progetto è confermare i dati sull'associazione degli alleli di EBNA2 con la SM, definendone anche il ruolo funzionale, e di accertare la significatività statistica dell'associazione di altre possibili varianti genomiche. Sono state arruolate 390 persone con SM e 215 controlli, sottoposti a prelievo ematico da cui sono state isolate le cellule B (potenzialmente infettate dal virus). Il DNA estratto dalle cellule B di 370 persone con SM e da 199 controlli è stato analizzato tramite digital droplet PCR (ddPCR) che permette l'identificazione di varianti del genoma virale utilizzando specifiche sonde fluorescenti. Questo sistema è veloce, preciso ed accurato, e particolarmente adatto per le analisi genotipiche condotte su grandi popolazioni. L'analisi dei dati ha confermato l'associazione statisticamente rilevante tra l'allele 1.2 e la SM ( $p=0.0008$ ) e una maggiore frequenza di co-infezioni di diversi alleli di EBV nel sangue di persone con SM rispetto ai controlli ( $p=0.031$ ). Inoltre, è stato rilevato un maggior numero di campioni in cui non è stato possibile identificare gli alleli di EBNA2 nel gruppo dei controlli rispetto al gruppo SM ( $p=0.0021$ ), suggerendo che il numero di copie virali presenti nei controlli sia ridotto rispetto alle persone con SM e confermando dati di letteratura che mostrano un'alterazione nella capacità di controllare l'infezione da parte di persone con SM.

Oltre alle varianti alleliche di EBNA2, sono state selezionate altre varianti singole su altri 4 geni del genoma virale: LMP1, BPLF1, BCRF2 and BHLF1, che svolgono funzioni nelle diverse fasi dell'infezione. Sebbene la variante selezionata nella regione codificante di LMP1 non abbia mostrato una diversa distribuzione tra persone con SM e controlli, le varianti presenti sulle altre regioni genomiche hanno mostrato una maggiore frequenza nelle persone con SM rispetto ai controlli. Per poter identificare il possibile ruolo funzionale delle varianti di EBNA2, sono stati valutati i livelli di espressione sia dei geni virali che di quelli cellulari in linee linfoblastoidi spontanee ottenute da persone con SM ed infettate dall'allele di rischio (1.2) e da altri alleli non predisponenti ed identificati nella popolazione generale (1.3B e B95-8). È stato utilizzato il sistema NextSeq 500 (Illumina) per sequenziare gli RNA messaggeri di 5 linee infettate dal tipo 1.2, 4 infettate dal tipo 1.3B e 4 dal virus di laboratorio B95-8. Dal confronto tra i vari gruppi è stata individuata una serie di geni che risultano differentemente espressi tra le varie condizioni. Attraverso una validazione con ddPCR su una popolazione indipendente di linee spLCLs, è stato possibile dimostrare che le varianti trovate sul gene EBNA2 sono in grado di modulare l'espressione di geni cellulari che partecipano a funzioni importanti nella patogenesi della malattia, come la presentazione dell'antigene e la migrazione delle cellule B.

## **LABORATORIO DI CITOFUORIMETRIA**

Studio EoAG

*Analisi citofluorimetrica dell'attività eosinofila mediata dall'espressione dei marcatori di membrana cellulare in soggetti con asma grave: caratterizzazione basale e verifica dei cambiamenti indotti dalla terapia con farmaci biologici*

In collaborazione con Campus Universitario Biomedico e con un finanziamento erogato da Glaxo Smith Kline.

Lo studio EoAG nasce dall'idea di valutare lo stato di attivazione degli eosinofili in pazienti asmatici, per verificare possibili correlazioni tra il fenotipo espresso dagli eosinofili e un particolare endotipo asmatico; inoltre si propone di verificare il valore prognostico dell'analisi fenotipica degli eosinofili e la possibile modificazione del fenotipo degli eosinofili in seguito a trattamento con farmaci biologici.

Il laboratorio di citofluorimetria partecipa allo studio avendo il ruolo di analizzare il fenotipo degli eosinofili; a questo scopo, i prelievi di sangue di pazienti afferenti al Campus Biomedico sono marcati con anticorpi diretti verso le principali molecole di attivazione ed identificazione degli eosinofili. I pazienti sono sottoposti a prelievo un mese prima dell'inizio del trattamento, all'inizio del trattamento, a tre mesi e a un anno. Lo studio è in cieco per quanto riguarda l'analisi e la raccolta dati da parte del laboratorio di citofluorimetria.

Al 31/12/2022 sono stati reclutati 106 pazienti. I primi dati raccolti mostrano che nei soggetti con asma grave, che mostrano una più alta frequenza di episodi di esacerbazione, si osserva un aumento dell'espressione del CD294 (CRTH2, recettore associato con la risposta infiammatoria di tipo 2) e di CCR3 (recettore per la chemochina eotassina, che indirizza gli eosinofili verso i siti infiammati).

Si prevede un reclutamento di 160 pazienti, dei quali 80 saranno trattati con farmaco biologico e 80 con terapie convenzionali.

## **LABORATORIO DI BIOINGEGNERIA DELLA RIABILITAZIONE**

### **Progetti di ricerca sponsorizzati da privati**

*Meccatronica avanzata per l'umanizzazione nella assistenza e la personalizzazione delle cure: un approccio multidominio integrato per la valutazione e la riabilitazione di pazienti con ictus in fase sub-acuta.*

Con contributo della Fondazione Roma al Consorzio MEBIC.

Il presente progetto propone l'implementazione e la validazione di una piattaforma integrata di meccatronica avanzata per la riabilitazione della postura e del controllo degli arti inferiori e superiori, e per la predizione di outcome riabilitativi attraverso l'analisi avanzata multidominio di dati elettrofisiologici, biomeccanici, clinici e funzionali.

L'esperienza maturata da questo progetto porta allo sviluppo di conoscenze di ingegneria biomedica e di percorsi innovativi nel campo della riabilitazione basata su nuove tecnologie. Tali percorsi potranno integrarsi nell'attività di validazione, fattibilità, e gradimento delle persone coinvolte ed effetto delle nuove procedure tecnologiche proposte.

I soggetti coinvolti con esito di ictus ischemico rispondono ai criteri di seguito riportati.

Criteri di inclusione:

- ictus cronico;
- primo ictus unilaterale ischemico con deficit dell'arto superiore e/o inferiore;
- diagnosi verificata mediante imaging cerebrale (MRI);
- funzione cognitiva sufficiente per comprendere le istruzioni sperimentali;
- valutazione dell'ictus con punteggio scala Chedoke-McMaster superiore a 1.

Criteri di esclusione:

- disfunzione bilaterale,
- deficit sensoriali gravi dell'arto superiore paretico,
- deterioramento cognitivo o disfunzione comportamentale,
- rifiuto o incapacità di firmare il consenso informato
- altri gravi problemi medici presenti.

I soggetti arruolati effettuano un percorso di riabilitazione dell'arto superiore e inferiore attraverso una piattaforma robotizzata per la riabilitazione della postura e un esoscheletro per la valutazione della funzionalità bimanuale degli arti superiori. Quando possibile, i soggetti vengono sottoposti ad una sessione di registrazione elettroencefalografica (EEG) con un sistema a 64 canali ed elettromiografica (EMG) negli istanti precedenti alla terapia, durante un task motorio sperimentale robot assistito e subito successivamente. Il percorso di valutazione prevede lo screening clinico tramite le maggiori scale cliniche validate (ad esempio: Fugl-Meyer Assessment; Barthel Index; Frenchay Arm Test; Modified Ashworth Scale).

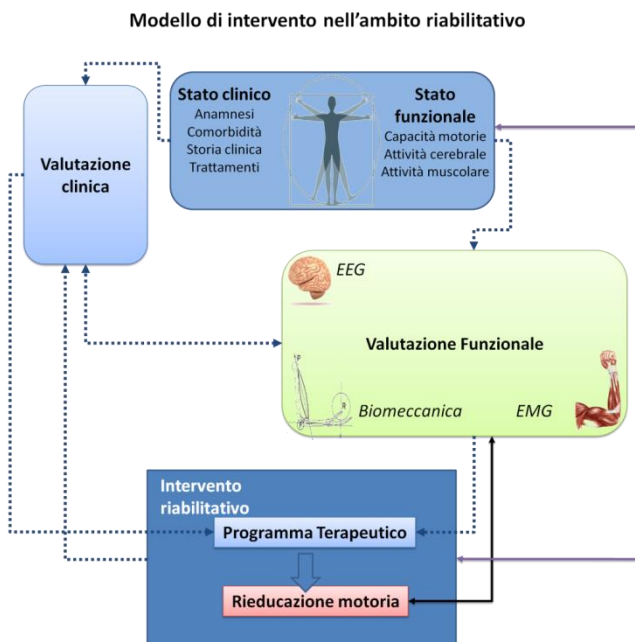
Parallelamente, al paziente vengono somministrati i test funzionali Box & Blocks per l'arto superiore e 6 minutes walking test (6MWT, Pereira et al) per l'arto inferiore, tali test sono normalmente utilizzati all'interno delle linee guida cliniche. Inoltre, attraverso la piattaforma mecatronica KINARM Exoskeleton e la piattaforma mecatronica Hunova si valuta la condizione neuromotoria del paziente prima, dopo e durante il trattamento di riabilitazione, misurando oggettivamente i parametri biomeccanici dell'arto inferiore e superiore.

La seguente tabella descrive le valutazioni a cui sono sottoposti i soggetti sperimentali, gli strumenti utilizzati e i domini di interesse.

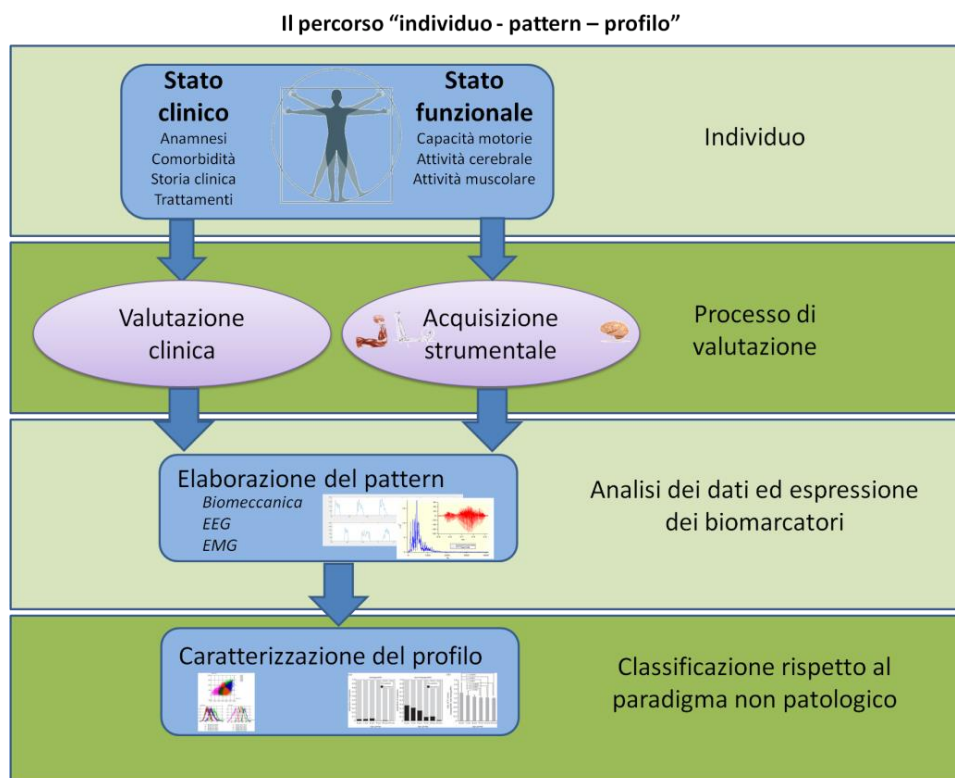
	Strumento di valutazione	Dominio
Valutazioni Cliniche	Fugl-Meyer	Compromissione sensorimotoria
	Barthel Index	Attività quotidiane
	Frenchay Arm Test	Controllo motorio arto superiore
	Modified Ashworth Scale	Iper tono
Valutazioni funzionali	Box & Blocks	Destrezza manuale
	6MWT	Capacità funzionale residua
Valutazioni elettrofisiologiche	EEG	Connettività cerebrale Risposta corticale
	EMG	Sinergie
		Timing di attivazione Coerenza spettrale
Valutazioni Biomeccaniche	Report KINARM	Caratteristiche arto superiore
	Report Hunova	Rischio cadute e caratteristiche arto inferiore

L'analisi delle performance, la schedulazione e la progettazione dei task riabilitativi personalizzati attraverso un approccio multidominio basato prevalentemente su dati elettrofisiologici (EEG, EMG) e biomeccanici e sugli indici di natura clinica è di fondamentale importanza per correlare le informazioni di natura diversa in un'unica piattaforma intelligente. L'obiettivo ultimo è quello di creare protocolli adattativi in ambito riabilitativo utilizzando le recenti tecnologie dell'intelligenza artificiale (AI), Machine Learning e Reti neurali. In altre parole l'adattabilità di un processo di riabilitazione rappresenta la possibilità di cambiare le caratteristiche di un esercizio o di un processo riabilitativo più complesso per ottimizzare l'efficacia e l'aderenza e minimizzare l'affaticamento o il dolore. La plasticità di un intervento

riabilitativo tecnologico si basa sulla valutazione in tempo reale di specifiche grandezze biometriche (biomeccaniche o elettrofisiologiche), cliniche e di caratteristiche fisiche della performance dell'esercizio (percentuale di errori, aderenza, ecc) e, agendo direttamente sull'esercizio, permette di cambiare direttamente obiettivi, caratteristiche resistive delle ortesi robotiche, velocità di esecuzione, difficoltà cognitive. Tale schema è descritto dalla figura seguente.



L'insieme di operazioni volte alla regolazione delle caratteristiche fisiche e di performance degli strumenti riabilitativi definite dalla valutazione clinica, funzionale e biometrica del paziente, fanno parte del processo fondamentale di personalizzazione dell'intervento terapeutico. La figura seguente descrive il percorso Individuo - Pattern - Profilo descritto.



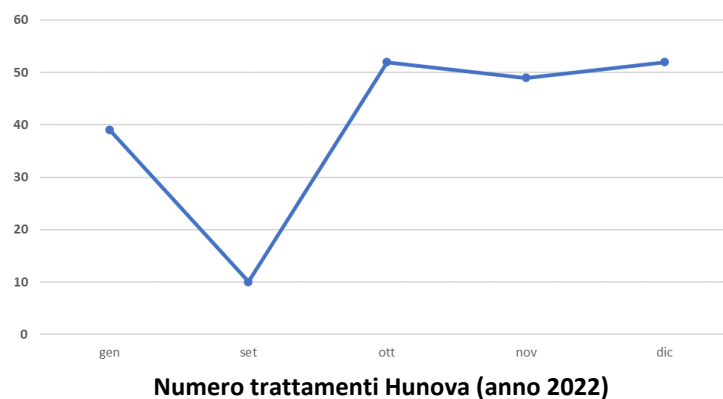
La Tabella riporta la specifica della strumentazione acquistate per il progetto di ricerca, con il contributo della Fondazione Roma.

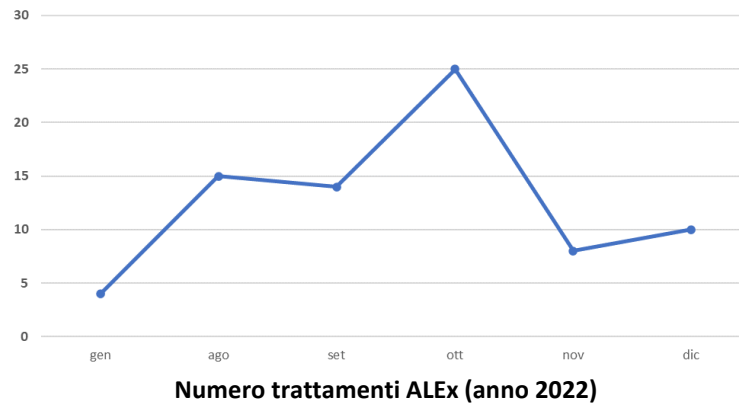
Descrizione	Fornitore	Modello	Produttore
Stimolatore transcranico a corrente continua	Brain Products	DC-Stimulator Plus	neuroConn
EEG Ricerca 63 ch	Brain Products	LiveAmp System	Brain Products
Eye Tracker	Brain Products	Pro Spectrum	Tobii
Holter EEG	Micromed	Morpheus	Micromed
Pedana con seduta robotizzata	EMAC	Hunova	Movendo
Escoscheletro bimanuale per arti superiori	Wearable Robotics	ALEx RS	Wearable Robotics
Escoscheletro bimanuale per arti superiori	Wearable Robotics	ALEx RS	Wearable Robotics
Escoscheletro bimanuale per arti superiori	Wearable Robotics	ALEx RS	Wearable Robotics

Dal momento della messa in servizio dei dispositivi, sono stati sottoposti a trattamento 61 pazienti con un totale di 402 trattamenti.

Mediante l'utilizzo di ALEx RS, risultano 200 trattamenti per 26 pazienti totali trattati; Hunova Movendo Technologies ha visto la riabilitazione di 35 pazienti trattati per un totale di 202 trattamenti.

Nelle figure successive si illustrano i trattamenti mensili nell'anno 2022 con i robot sopra citati.





Inoltre, è stato sviluppato, implementato e validato il protocollo di acquisizione per la valutazione multidominio durante un gesto motorio dell'arto superiore in pazienti con ictus. Uno studio preliminare ha dimostrato la fattibilità delle acquisizioni e la solidità della valutazione multidominio, la correttezza dell'interconnessione e la sincronia tra segnali di natura diversa (elettrofisiologici, biomeccanici, comportamentali).

Sono stati acquisiti i dati di due gruppi di controllo per la sperimentazione finale: un gruppo di pazienti con esiti di ictus che hanno svolto terapia non robotica (22 pazienti) e un gruppo di soggetti sani (16 soggetti). È stato dimostrato come lo studio dell'attivazione corticale corrispondente alla desincronizzazione evento-correlata dei ritmi cerebrali durante un gesto motorio sia un indice valido per evidenziare il trend normale e confrontarlo con quello patologico, su cui identificare eventuali recuperi funzionali in seguito al trattamento.

Le piattaforme di mecatronica acquisite nel corso del presente progetto e specificate nella sezione sopra, hanno permesso uno studio pilota sugli effetti delle due strumentazioni sul percorso neuro riabilitativo dei pazienti con ictus.

Per questo studio sono stati reclutati 57 pazienti di cui 35 assegnati alla terapia con la piattaforma Hunova Movendo Technologies, 20 all'esoscheletro bimanuale ALEX e 2 che hanno effettuato una terapia mista con le due piattaforme. 5 pazienti non hanno concluso il protocollo di valutazione e sono stati esclusi dall'analisi in particolare 2 con terapia Movendo Technologies, 2 con ALEX e 1 assegnato alla terapia mista.

La scala clinica Modified Barthel Index all'ammissione del soggetto al protocollo riabilitativo (Barthel ingresso; BI) è risultata in notevole miglioramento rispetto all'ultima sessione riabilitativa (Barthel Uscita; BU).

Tutti i soggetti hanno mostrato un importante miglioramento in termini di deambulazione, cura personale e mobilità. I due approcci robotici, Movendo Technologies e ALEX, non mostrano differenze nel recupero motorio funzionale dei pazienti reclutati. Stratificando l'analisi per il tipo di supporto robotico utilizzato, si notano miglioramenti statisticamente significativi tra la prima seduta e l'ultima.





Il Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana, è istituito in seguito alla Deliberazione Regione Lazio n. 301 del 03/10/2013, alla modifica alla DGR n. 146 del 12/06/2013 e al Decreto Ministero della Salute 08 febbraio 2013.

Il Comitato Etico è composto da 20 membri effettivi e da 3 membri a chiamata la cui competenza e qualifica professionale corrisponde a quanto richiesto dalla normativa vigente (D.M. 18/03/98 e successivi) e alle esigenze dell'IRCCS San Raffaele Pisana, in relazione alle competenze scientifico-metodologiche e bioetiche. Il Presidente ed il Vice Presidente vengono eletti dai membri effettivi nel corso della seduta di insediamento.

### **Comitato Etico IRCCS San Raffaele Pisana**

Il compito del Comitato Etico è garantire la correttezza formale, metodologica ed etica delle sperimentazioni, la fattibilità delle stesse e, secondo la normativa italiana, l'adeguatezza degli accordi economico-organizzativi, tutelando i diritti delle persone che vi partecipano. Il Comitato Etico ha, inoltre, il compito di verificare che l'impostazione formale e metodologica delle sperimentazioni cliniche sia in linea con la normativa vigente. Il Comitato Etico verifica che i soggetti coinvolti nella sperimentazione non siano sottoposti a indagini o terapie non necessarie per la loro patologia, o che le indagini o terapie previste arrechino danno, o sofferenza, o non comportino dei rischi. I trial clinici comprendono sia studi sponsorizzati da aziende farmaceutiche e/o da associazioni scientifiche sia studi spontanei interni mirati al miglioramento dell'assistenza.

Il comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Roma è stato istituito in seguito alla Deliberazione Regione Lazio n. 301 del 03/10/2013, alla modifica alla DGR n. 146 del 12/06/2013 e al Decreto Ministero della Salute 08 febbraio 2013.

Il Comitato è attualmente composto da 18 membri effettivi e da 3 membri a chiamata la cui competenza e qualifica professionale corrisponde a quanto richiesto dalla normativa vigente e alle esigenze dell'IRCCS San Raffaele Roma, in relazione alle competenze scientifico-metodologiche e bioetiche. Il Presidente ed il Vice Presidente vengono eletti dai membri effettivi nel corso della seduta di insediamento.

Le riunioni plenarie si svolgono, di norma, con cadenza mensile. In casi in cui sia provata l'urgenza del parere da parte del Comitato Etico, sono previste riunioni telematiche che possono avvenire con tempistiche differenti da quelle delle riunioni plenarie.

Sul portale istituzionale, nella pagina dedicata, sono riportati l'elenco dei nomi e delle qualifiche dei componenti e i dati del Comitato Etico. E' inoltre possibile scaricare i file che riguardano: a) le indicazioni per il pagamento degli oneri; b) gli indicatori di performance ; c) le indicazioni per la sottomissione della documentazione; d) indicazioni per la sottomissione della convenzione.

## **SPERIMENTAZIONI CLINICHE**

### **Area Cefalee e Dolore Neuropatico**

GSK 201190 Zoster 049 ext 006-022: A phase III b, open, label, multi-country, multi-centre, long-term follow-up study (ZOE-LFTU) of studies 110390 and 113077 (ZOSTER-006/022) to assess the prophylactic efficacy, safety, and immunogenicity persistence of GSK Biologicals' Herpes Zoster subunit (HZ/SU) vaccine and assessment of 1 or 2 additional doses on a 0 or 0.2-month schedule in 2 subgroups of older adults.

CAMG334A240: A 12-month prospective, randomized, interventional, global, multi-center, active-controlled study comparing sustained benefit of two treatment paradigms (erenumab qm vs. oral prophylactics) in adult episodic migraine patients.

NOVARTIS (CAMG334AIT04) NEW ERA: Italian National study on quality of life and healthcare impact in a real-World Erenumab treated migraine population (NEW ERA study).

AMGEN 20170703: A phase 4, Randomized, Double-blind, placebo-controlled, parallel-group study to evaluate the efficacy and safety of erenumab in adults with chronic migraine and medication overuse headache.

AMGEN 2019008: Comprehensive Assessment of Erenumab Efficacy in Subjects with High Frequency Episodic Migraine With at Least 1 Previously Failed Preventive Treatment: a Global, Double-blind, Placebo-controlled Phase 4 Study.

Teva UNITE/TV48125-MH-40142: A parallel, multicenter study, randomized, double-blind, placebo controlled, followed by an open label phase to investigate the efficacy and the safety of fremanezumab for the preventive treatment of migraine in patients with major depressive disorders.

TEVA TV48125-CNS-30082\_30083\_30084 (SPACE): Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, a gruppi paralleli, che confronta efficacia, sicurezza e tollerabilità della somministrazione sottocutanea di Fremanezumab verso Placebo per il trattamento preventivo di emicrania episodica in pazienti pediatrici da 6 a 17 anni di età.

Lundbeck 18898A: Interventional, randomized, double-blind, parallel-group, placebo-controlled study with an extension period to evaluate the efficacy and safety of eptinezumab for the prevention of migraine in patients with unsuccessful prior preventive treatments (DELIVERY): 3 screenati, 2 screening failure.

Progetto per la costituzione del nuovo registro italiano dell'emicrania (Italian miGRAINE rEgistry – NEW, I-GRAINE-NEW).

TEVA PEARL. Studio osservazionale Pan-Europeo sull'efficacia di fremanezumab nei pazienti con emicrania cronica o episodica nel mondo-reale: studio PEARL.

LUNDBECK LUN 19386A (ALLEVIATE): Studio interventistico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato con placebo ad avvio ritardato per valutare l'efficacia e la sicurezza di eptinezumab in pazienti con cefalea a grappolo episodica.

Lundbeck: Interventional, randomized, double-blind, parallel-group, placebo controlled delayed-start study to evaluate the efficacy and safety of eptinezumab in patients with chronic Cluster Headache. 5 pazienti arruolati.

Studio sull'efficacia e tollerabilità della terapia metabolica chetogenica nella profilassi dell'emicrania episodica ad alta frequenza

Galcanezumab per la prevenzione dell'emicrania episodica o cronica in pazienti trattati presso centri cefalee italiani: uno studio di coorte retrospettivo in un contesto reale (studio REALIT).

Protocol I5Q-MC-B004: preventive Treatment of migraine: Outcomes for Patients in real-world Healthcare systems (TRIUMPH).

Allergan3101-312-002: A PHASE 3, MULTICENTER, OPEN-LABEL 52-WEEK EXTENSION STUDY TO EVALUATE THE LONG-TERM SAFETY AND TOLERABILITY OF ORAL ATOGEPANT FOR THE PREVENTION OF MIGRAINE IN PARTICIPANTS WITH CHRONIC OR EPISODIC MIGRAINE. 6 pazienti.

Lundbeck 19386A: Interventional, randomized, double-blind, parallel-group, placebo controlled delayed-start study to evaluate the efficacy and safety of eptinezumab in patients with episodic Cluster Headache (ALLEVIATE).

Lundbeck 19385A: Interventional, randomized, double-blind, parallel-group, placebo controlled delayed-start study to evaluate the efficacy and safety of eptinezumab in patients with chronic Cluster Headache.

NOE-TGN-201: A Phase II / III, multicentre, 8-week run-in phase followed by a 12-week, prospective, parallel-group, double-blind, randomized withdrawal, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of daily 1.5 to 3.5 mg basimglurant in patients with pain associated with trigeminal neuralgia with suboptimal response to their current anti-pain therapy.

Biohaven Pharmaceutical clinical research study with the BHV-3000/BHV-3500.

A Phase 4 Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Rimegepant in Migraine Prevention with Multiple, Dosing Regimens.

A Phase 3, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Rimegepant in Migraine Prevention in Children and Adolescents  $\geq 6$  to  $<18$  years of age.



## **Area di Ricerca Cefalee e Dolore Neuropatico**

Unità per la Terapia del Dolore, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Università di Roma “La Sapienza”, Prof. Giorgio Cruccu.

Validazione di protocolli diagnostici e clinici (DN4) per il dolore cronico e neuropatico; studio neurofisiologico delle vie termiche e nocicettive nella regione trigeminale mediante stimolazione Nd-YAP-laser nei pazienti con dolore cefalico episodico e cronico; riabilitazione del dolore cronico.

Centro dei Disordini del Movimento, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Policlinico Umberto I, Università di Roma “La Sapienza”, Prof. Alfredo Berardelli, Prof. Giovanni Fabbrini.

Collaborazione clinica e scientifica

UTN-Unità di Trattamento Neurovascolare, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Policlinico Umberto I, Università di Roma “La Sapienza, Dr. Danilo Toni.

Collaborazione clinica e scientifica

Istituto Superiore di Sanità, Roma, Dott. Nicola Vanacore.

Università degli Studi di Bari, Dipartimento di Scienze Mediche di Base, Neuroscienze e Organi di Senso Prof. Emilio Jirillo, Prof. Gianfranco Gennarini.

Rete per il gruppo di studio per il registro dell'emicrania cronica (IGRAINE REGISTRY): creazione di una rete di collaborazione per la raccolta dei dati del registro dell'emicrania cronica (24 centri): Centro Cefalee e Neuroalgologia, Istituto di Neurologia, Fondazione IRCCS "Carlo Besta" (Dott.ssa Licia Grazzi), Neurologia e Stroke Unit, Ospedale Regionale della Valle d'Aosta U. Parini (Dr.ssa Chiara Lia), Centro Cefalee, Unità di Neurologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (Dott.ssa Paola Torelli), Centro Cefalee e Neurosonologia, Neurologia, Campus Bio-Medico Hospital, Roma (Dott. Fabrizio Vernieri) , Dipartimento di Neurologia, San Filippo Neri Hospital, Roma (Dott. Antonio Carnevale), Neurologia, Ospedale San Bortolo, AULSS 8 Veneto (Dott. Francesco Perini), IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova (Dott.ssa Cinzia Finocchi), IRCCS Istituto delle scienze Neurologiche di Bologna, Bologna (Dott.ssa Sabina Cevoli), Dipartimento di Biomedicina, Neuroscienze e Diagnosi Avanzata (BIND), Università di Palermo (Dott.ssa Cecilia Camarda), Centro Cefalee, Istituto di Neurologia, Ospedale San G. Moscati Hospital, Avellino (Dott. D'Onofrio), Centro Cefalee, Unità di Neurologia e patologie neuromuscolari, Dipartimento di emergenza Ospedale Universitario G. Martino, Messina (Dott. Massimo Autunno), Centro Cefalee, Azienda Ospedaliero-Universitaria Mater domini, Catanzaro (Dott. Francesco Bono), Centro Cefalee, Dipartimento di Neurologia e Stroke Unit, Ospedale S. Carlo Borromeo, ASST santi Paolo e Carlo, Milano (Dott. Fabio Frediani), Centro Cefalee, Dipartimento di Scienze Neurologiche - ASST Spedali Civili of Brescia, (Dott.ssa Renata Rao), Centro Cefalee SOC Neurologia, Ospedale Cardinal Massaia Asti (Dott. Marco Aguggia), Unità di Neurologia, Ospedale Morgagni-Pierantoni, Forlì (Dott.ssa Silvia Strumia) , Centro Cefalee, Dipartimento di Neuroscienze, Scienze riproduttive e dentali, Università Federico II di Napoli (Dott. Roberto De Simone), Centro Cefalee, Dipartimento di Medicina Avanzata e Scienze Chirurgiche, Università Campania Luigi Vanvitelli, Napoli (Dott. Antonio Russo), Istituto Auxologico Italiano, IRCCS, Dipartimento di Neurologia- Stroke Unit e Laboratorio di Neuroscienze, Milano (Dott. Stefano Messina), Centro Cefalee, San Raffaele Milano (Dott. Bruno Colombo), ASL5 Ghilarza- Cefalee (Dott. Patrizia Balsamo), Centro Cefalee, Ospedale Salvini, Garbagnate Milanese (Dott. Alfonso Coppola), Centro Cefalee Donna, Università di Torino (Dott. Gianni Allais).

## **Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare**

Laboratorio di Morag Young (Hudson Institute of Medical Research, Clayton, Victoria, Australia), esperta della funzione del Recettore Mineralcorticoide (MR) nel sistema cardiovascolare. Il laboratorio del Dr. Young rsuppota gli studi del laboratorio nel caratterizzare gli effetti metabolici dell'antagonismo di MR impiegando modelli murini transgenici knockout per MR e metodiche di analisi del metabolismo.

Laboratorio della Prof.ssa Iris Jaffe (Tufts Medical Center, Boston, USA), massima esperta mondiale sugli effetti vascolari di MR, in studi sul ruolo di MR nell'ipertensione arteriosa e nell'invecchiamento vascolare.

Sono attivi rapporti di collaborazione scientifica con il gruppo di ricercatori partecipanti ai progetti ERA-NET e MATCH. In questo contesto il Laboratorio collabora attivamente con la Prof.ssa Tanja Zeller e il Dott. Mahir Karakas (University Heart Centre, Amburgo, Germania), con il Dott. David-Alexandre Tregouet (INSERM, Parigi, Francia) e con il Prof. Tim Beißbarth (University Medical Center Göttingen).

Il Laboratorio diretto dal Prof. Frederic Jaisser (Centre de Recherche des Cordeliers, Parigi, Francia), esperto del ruolo di MR a livello renale.

Prof. Antonio Paoli (Università degli Studi di Padova) esperto di nutrizione e terapia chetogenica.





## UNIVERSITÀ TELEMATICA SAN RAFFAELE ROMA

L'Università Telematica San Raffaele Roma, istituita con decreto del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca dell'8 maggio 2006, è un Ateneo non statale, legalmente riconosciuto, che rilascia titoli di studio equipollenti e con il medesimo valore legale di quelli rilasciati dalle Università tradizionali.

L'offerta didattica è erogata in modalità E-Learning, attraverso l'utilizzo di internet e delle nuove tecnologie digitali. Gli studenti possono pertanto accedere alla piattaforma didattica in qualsiasi momento ed in qualunque luogo, abbattendo ogni vincolo spazio-temporale e offrendo in tal modo la fruizione del materiale didattico anche a coloro che, per ragioni fisiche, geografiche o lavorative, ne sarebbero esclusi.

La lezione ex cathedra viene in sostanza sostituita da lezioni registrate e disponibili online 24 ore su 24 e integrata con specifico materiale didattico: slides, materiale illustrativo, problemi e discussioni in linea. Per garantire inoltre un alto livello qualitativo, le lezioni online sono integrate da attività seminariale e di laboratorio.

I Corsi di Studio sono legati ai settori in cui il primato del "Made in Italy" è riconosciuto a livello internazionale: design e moda, alimentazione e gastronomia, nutrizione umana, scienze motorie e sport.

Il rapporto vitale con i settori industriali e sportivi di riferimento garantisce agli studenti una relazione proficua con il mondo produttivo e il mercato del lavoro anche attraverso la possibilità di accedere a stage professionalizzanti nelle realtà più qualificate. Esperti e professionisti del mondo dell'industria e dello sport assicurano un percorso di studio che valorizza l'apprendimento teorico e la formazione pratica.

I Corsi di Studio sono articolati in: I livello, al termine del quale si ottiene la Laurea; II livello, al termine del quale si ottiene la Laurea magistrale; III livello per la formazione post-laurea (master per laureati di II livello e dottorati di ricerca), corsi di perfezionamento. La durata dei Corsi di Studio è misurata in crediti formativi universitari (CFU), pari a 60 per ciascun anno di corso. Sono inoltre previste possibilità di approfondimenti trasversali ai quattro cicli di studi attraverso i master universitari (di I o di II livello), che hanno un carattere prevalentemente professionalizzante.

L'attività scientifica e di ricerca dell'Ateneo comprende i seguenti prodotti della ricerca:

- Pubblicazioni scientifiche nazionali ed internazionali che abbiano rilevanza accademica e diffusione nella comunità scientifica, carattere di scientificità.
- Tutte le pubblicazioni non accademiche con ISBN/ISSN, che si rivolgono ad un pubblico più eterogeneo rispetto a quello accademico.
- Convegni scientifici, organizzati da una comunità scientifica di riferimento o da enti/istituzioni/associazione di professionisti, nonché network universitari e associazioni accademiche che abbiano ad oggetto tematiche scientifiche e la cui discussione avvenga tramite presentazioni di paper (su invito o submission), nonché esposizione di poster, paper o relazioni su invito.
- Partecipazioni a convegni in qualità di relatore e/o di redattore del contributo a convegni nazionali o internazionali organizzati all'interno del proprio ambito scientifico di riferimento, nonché da associazioni di categoria o ordini professionali. Lo scopo di tali convegni è l'aggiornamento continuo e la partecipazione del ricercatore per permettere, attraverso una condivisione del proprio know how, il miglioramento delle conoscenze globali in relazione a determinati ambiti di riferimento.

- e) Convegni/Seminari/Corsi, quale l'attività a cui il ricercatore partecipa in qualità di partecipante, ai fini di un aggiornamento professionale/scientifico per il miglioramento della propria attività di ricerca/didattica attinente all'Ateneo.
- Partecipazione a varie attività nel campo della ricerca, quali ad esempio partecipazione a: editorial board di riviste nazionali/internazionali; scientific board nell'ambito di book series promosse da editori internazionali e per prodotti editoriali; attività di coordinamento nell'ambito di special issues di riviste o book series; attività di referaggio per riviste accademiche e/o per convegni scientifici.

### **Corsi di laurea Triennale**

- Corso di Studio in Scienze dell'Amministrazione e dell'Organizzazione
- Corso di Studio in scienze Motorie
- Corso di Studio in Moda e Design Industriale
- Corso di Studio in Scienze dell'Alimentazione e Gastronomia

### **Corsi di laurea Magistrale**

- Corso di Studio in Scienze della Nutrizione Umana.  
Il Corso è articolato in due Curricula specifici: uno con indirizzo classico Nutrizione Umana ed uno con indirizzo Nutraceutica.
- Corso di Studio in Management e Consulenza Aziendale.  
Il corso si articola su quattro curricula specifici:
  - Management e consulenza aziendale;
  - Economia e Management della Sanità e dell'Innovazione Tecnologica
  - Banking and Finance
  - Economia e management delle organizzazioni sportive
- Corso di Studio in Scienze e Tecniche delle Attività Motorie Preventive e Adattate.

### **Master**

- Master di I livello in "Preparazione Fisica Controllata" IV EDIZIONE
- Master di I° livello in "Green Economy & Digitalizzazione dei Sistemi Produttivi"
- Master di I° livello in "Gestione delle maxiemergenze in ambito extra-ospedaliero"
- Master I° livello in "Management delle professioni sanitarie e Funzioni di Coordinamento" VII edizione
- Master di I livello in "Digital manager 4.0: ICT e Innovazione" IV edizione
- Master di I livello in "Digital manager 4.0: ICT e Innovazione" IV edizione ON LINE
- Master di I livello in "Metodologie Didattiche Innovative"
- Master di II° livello in "Ecografia clinica in ambito internistico, pediatrico ed interventistico"
- Master di II° livello in "Psicodiagnostica Clinica e Forense"
- Master di II° livello in "Psicodiagnostica e Valutazione Psicologica"

- Master di II° livello in “Management dei servizi sanitari e Direzione di strutture complesse”
- Master di II° livello in Tourism Strategy and Management II ED.NE
- Master di II° livello in “Valutazione e Trattamento dei Disturbi Primari di Linguaggio”
- Master di II° livello in “Scienza e Management delle Aziende e delle Amministrazioni Pubbliche”
- Master di II° livello in “Psicologia Scolastica”
- Master di II° livello in “Psicologia Pediatrica”
- Master di II° livello in “Psicologia dell’Emergenza e Psicotraumatologia”
- Master di II° livello in “Neuropsicologia Clinica”
- Master di II° livello in “Medicina D'emergenza/Urgenza e Pronto Soccorso”
- Master di II° livello in “Medicina Estetica e Rigenerativa”
- Master di II° livello in “Intelligence, Investigation and Security”
- Master di II° livello in “Fitoterapia Clinica e Erboristeria”
- Master di II° livello in “Dermatologia Clinica Avanzata”
- Master di II° livello in “Criminologia Clinica e Scienze Forensi”
- Master di II° livello in “ABA (Applied Behavior Analysis) Analista del Comportamento dell’età Evolutiva”
- Master di II° livello in “ABA (Applied Behavior Analysis) Analista del Comportamento degli Adolescenti e degli Adulti”
- Master di II° livello in “ABA (Applied Behavior Analysis)”
- Master di I° livello in “Riabilitazione ortopedica delle patologie cronico-degenerative, traumatiche e work related”
- Master di I° livello in “Autismo: valutazione, trattamento ed interventi evidence-based-clinico”
- Master di I° livello in “Riabilitazione Cognitiva”
- Master di I° livello in “Neuropsicologia dell’età Evolutiva”
- Master di I° livello in “Logopedia in Età Evolutiva”
- Master di I° livello in “La Neuroriabilitazione e le Neuroscienze dell’età Evolutiva”
- Master di I° livello in “CAA – COMUNICAZIONE AUMENTATIVA E ALTERNATIVA”

### **Corsi di Perfezionamento**

- Corso di Perfezionamento in "Digital Marketing & Social Communication"
- Corso di perfezionamento in "Diritto bancario e finanziario" - Finance Law Academy II edizione
- Corso di Perfezionamento in “Alta formazione in terapie avanzate delle cefalee”

## ATTIVITÀ DI FORMAZIONE

---

## CORSI ECM

Nel corso dell'anno 2022 sono stati effettuati i seguenti corsi ECM:

- La legge n. 24/2017 nella prassi sanitaria – 35 crediti ECM
- La gestione della disfagia neurogena e post-chirurgica: possiamo fare meglio? - 9 crediti ECM
- Raccomandazioni, modalità di intervento e protocolli nella gestione delle aree riabilitativo assistenziali di base - 25,6 Crediti ECM
- Igiene delle mani e il COVID 19 – 4,6 Crediti ECM
- L'intervento precoce nelle disabilità dello sviluppo dal concepimento ai 100 giorni di vita – 7 crediti ECM
- Io, Robot: l'uso della robotica nella pratica riabilitativa – 7 Crediti ECM



L'IRCCS San Raffaele è una struttura sanitaria specializzata per la riabilitazione. In data 01/02/2005 ha ottenuto il riconoscimento di Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico per la disciplina della riabilitazione motoria e sensoriale. La missione dell'Istituto riguarda l'area della riabilitazione motoria e sensoriale in differenti aree della medicina (Cardiologia, Pneumologia, Neurologia, Ortopedia, Pediatria/disabilità dello sviluppo).

L'attività assistenziale dell'IRCCS San Raffaele si espleta su 298 posti letto, con le seguenti Unità Operative:

- Riabilitazione Neuromotoria
- Riabilitazione Pediatrica e delle disabilità dello sviluppo
- Riabilitazione Cardiologica
- Riabilitazione Respiratoria

Inoltre, sono presenti due moduli di Medicina Interna, anche a supporto delle Unità operative di riabilitazione nei vari ambiti.

All'interno dell'IRCCS sono attivi i seguenti Laboratori e Servizi:

- Laboratorio di Neurofisiopatologia
- Laboratorio per lo Studio delle Posture e del Movimento (Gait Analysis)
- Laboratorio per lo Studio della Funzionalità Cardiaca
- Laboratorio per lo Studio della Funzionalità Respiratoria
- Laboratorio di Patologia Clinica e Biotecnologie Avanzate
- Laboratorio di Robotica Riabilitativa
- Servizio di Diagnostica per Immagini
- Otorinolaringoiatria
- Terapia Occupazionale
- Endoscopia digestiva
- Rieducazione funzionale

L'Istituto costituisce quindi un nodo fondamentale della rete assistenziale della Regione Lazio, garantendo inoltre una presa in carico riabilitativa per numerosi pazienti che provengono da fuori regione stante la riconosciuta eccellenza in alcuni settori.

I reparti di riabilitazione intensiva dell'IRCCS San Raffaele prendono in carico patologie neurologiche, ortopediche, cardiologiche, respiratorie e pediatriche. L'efficacia e l'eccellenza dei percorsi riabilitativi attuati nell'Istituto sono evidenziati dai valori di modified Barthel Index (mBI) in ingresso e in uscita dalla struttura: per i reparti di riabilitazione neuromotoria, in media, i pazienti che hanno afferto all'IRCCS San Raffaele hanno avuto una mBI in ingresso pari a 33,16 e in uscita pari a 75 nel 2021.

Nel 2022, la mBI media in ingresso era di 35,23, mentre in uscita era pari a 79,6.

#### *Riabilitazione Neuromotoria*

La Riabilitazione Neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele è specializzata nella riabilitazione dei pazienti affetti dalle seguenti patologie/condizioni:

- Ictus Cerebrale
- Malattia di Parkinson
- Sclerosi Multipla
- Tumori Cerebrali
- Post Trauma lieve/moderato
- Postumi di artroprotesi di anca/ ginocchio

- Postumi di osteosintesi femore
- Patologia vertebrale
- Amputazione

Il reparto di degenza ordinaria è dotato di 156 posti letto, mentre il reparto di Day Hospital gestisce 17 posti letto.

In ambito neuromotorio, l'IRCCS San Raffaele è struttura di eccellenza nella cura e ricerca della Malattia Cerebrovascolare (Ictus ischemico e/o emorragico) e delle malattie neurodegenerative (Malattia di Parkinson, parkinsonismi atipici degenerativi e secondari) a Roma e nella Regione Lazio. L'Istituto lavora in sinergia con altri istituti con l'obiettivo di prendere in carico il paziente tenendo conto di tutti gli aspetti della malattia e di migliorare la qualità dell'assistenza, attraverso percorsi diagnostico-terapeutici, in accordo con le linee guida di trattamento medico, infermieristico e riabilitativo. I reparti di riabilitazione neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele sono un punto di riferimento nel panorama regionale e nazionale per la verifica e messa a punto delle terapie farmacologiche e riabilitative della Malattia di Parkinson e della Malattia Cerebrovascolare.

Le tre Unità Operative di Riabilitazione Neuromotoria intensiva dell'IRCCS San Raffaele sono parte della rete dei servizi sanitari di riabilitazione di I livello (riabilitazione estensiva) e di servizi di assistenza domiciliari, semiresidenziali e residenziali. Le sinergie con tale rete di servizi permettono un ritorno a casa (o in struttura idonea) in tempi adeguati della persona con disabilità, garantendo il completamento del percorso riabilitativo secondo protocolli ben definiti e il continuum assistenziale in generale.

I reparti di Riabilitazione Neuromotoria hanno una collaborazione di rete assistenziale con le seguenti strutture:

- Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini (Roma)
- Azienda Ospedaliera San Giovanni Addolorata (Roma)
- Azienda Ospedaliera Universitaria Sant'Andrea (Roma) - Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I (Roma)
- Casa di Cura Aurelia Hospital (Roma)
- Casa di cura Villa Tiberia (Roma)
- Casa di Cura Villa Valeria (Roma)
- Complesso Integrato Columbus (Roma)
- European Hospital (Roma)
- Ospedale Cristo Re (Roma)
- Ospedale CTO Andrea Alesini (Roma)
- Ospedale Fatebenefratelli Gemelli Isola Tiberina (Roma)
- Ospedale San Carlo di Nancy (Roma)
- Ospedale San Pietro-Fatebenefratelli (Roma)
- Ospedale Sandro Pertini (Roma)
- Ospedale Sant'Eugenio (Roma)
- Policlinico Tor Vergata (Roma)
- Policlinico Universitario Campus Bio-Medico (Roma)
- Policlinico Universitario Fondazione Agostino Gemelli (Roma)
- Presidio Ospedaliero San Filippo Neri (Roma)
- Presidio Ospedaliero Santo Spirito in Sassia (Roma)

Nell'ambito della medicina riabilitativa neurologica si segnala la particolare rilevanza dell'attività in tre settori:



## 1. Centro Malattia di Parkinson, Parkinsonismi e Disturbi del Movimento

Il gruppo di ricerca del Centro Malattia di Parkinson, Parkinsonismi e Disturbi del Movimento dell'IRCCS San Raffaele è multidisciplinare, in accordo con le direttive dell'European Parkinson's Disease Association (EPDA), ed è fondato sulla collaborazione di neurologi (con particolare attenzione alla neuro-farmacologia), fisioterapisti, logopedisti, terapisti occupazionali, psicologi e infermieri. L'assistenza ambulatoriale è garantita con continuità durante la settimana, con particolare riguardo al rapporto individuale tra medico e paziente (oltre 1400 visite annue). La possibilità di ricovero, sia in regime di ricovero ordinario sia in regime di Day Hospital, per riabilitazione motoria dei pazienti con aggravamento acuto delle condizioni cliniche, offre un'opportunità aggiuntiva di sostegno e miglioramento della qualità della vita di questi pazienti. I pazienti afferenti al Centro hanno inoltre l'opportunità di partecipare ai numerosi protocolli clinico-sperimentali, sia di natura farmacologica/interventistica che osservazionale, atti a validare l'efficacia di trattamenti innovativi e ad approfondire gli aspetti eziopatogenetici della Malattia di Parkinson. Tutti i trial di sperimentazione clinica vengono condotti in accordo con le Good Clinical Practices. Si riportano a seguire 3 risultati/prodotti destinati ai pazienti del Centro: - un libro dedicato ai pazienti: "Slow life – manuale pratico per vivere meglio con il Parkinson" ; - un libro dedicato agli aspetti nutrizionali e alla sua interferenza con l'efficacia del trattamento farmacologico, e alle alterazioni del sistema gastroenterico, sintomo non-motorio tra i più rilevanti nei pazienti con Malattia di Parkinson; - l'iniziativa del Programma CO-PARK, nata da un protocollo di Intesa tra Roma Capitale e l'IRCCS San Raffaele nel 2020: piattaforma online rivolta agli utenti in assistenza domiciliare, pazienti e ai loro Caregiver. La piattaforma permette l'accesso ai contenuti multimediali e consente di avere un aiuto specialistico e multidisciplinare attraverso la fruizione gratuita di video-tutorial di fisioterapia, logopedia e supporto psicologico. Nel biennio 2021-2022 hanno usufruito gratuitamente e portato a termine il progetto riabilitativo 168 pazienti. Il progetto è ancora attivo.

## 2. Centro di Robotica Riabilitativa

Il Centro di Robotica Riabilitativa dell'IRCCS San Raffaele è stato progettato con l'obiettivo di fornire terapie di riabilitazione evolute utilizzando l'assistenza di robot e tecnologie avanzate; di garantire l'eccellenza nei trattamenti, la personalizzazione degli interventi, la valutazione oggettiva del recupero e il miglioramento della qualità di vita; di implementare protocolli di ricerca e assicurare l'avanzamento delle conoscenze nel campo della robotica e bio-robotica applicata alla riabilitazione; di contribuire all'empowerment del paziente e dei caregiver attraverso il coinvolgimento attivo nel processo di cura, la comunicazione aperta e disponibile e la rete di supporto di un team multidisciplinare. Tradizionalmente, la riabilitazione per i pazienti con deficit persistenti si è concentrata sulla terapia fisica, occupazionale e logopedica, oltre che sulla prevenzione delle complicanze mediche. Tuttavia, le nuove strategie di riabilitazione riconosciute dalla letteratura scientifica contemporanea includono terapie activity-based basate sull'attività ad alte dosi, l'addestramento specifico ad alta intensità e l'environmental enrichment. La tecnologia riabilitativa che permette di utilizzare al meglio queste strategie è indubbiamente basata sull'applicazione della robotica, dei sistemi di realtà virtuale immersiva o non immersiva, di sistemi informatici per la somministrazione di terapie. Il Centro di Robotica Riabilitativa è equipaggiato con i più moderni robot e dispositivi medici avanzati. Sono inclusi robot a effetto finale per la

terapia del movimento articolare, esoscheletri per la riabilitazione degli arti inferiori e superiori, dispositivi robotici per la valutazione e riabilitazione del tronco e della postura, tecnologie di realtà virtuale per rendere gli esercizi di riabilitazione più coinvolgenti e motivanti. I dispositivi ad alta tecnologia utilizzati per la riabilitazione sono in grado di monitorare costantemente i progressi dei pazienti e acquisire dati dettagliati sulle loro prestazioni. Questi dati sono utilizzati per regolare e ottimizzare costantemente il piano di riabilitazione del paziente, garantendo un trattamento altamente personalizzato. Nonostante l'uso di robot, infatti, le palestre del Centro di Riabilitazione Robotica Riabilitativa sono sempre supervisionate, dirette e gestite da professionisti sanitari altamente qualificati; uno staff di fisioterapisti, ricercatori, fisiatristi, neurologi, medici specialisti e bioingegneri fornisce assistenza di eccellenza e aggiunge la possibilità di effettuare valutazioni funzionali ad alta tecnologia all'interno del processo riabilitativo. Tale possibilità è significativa, in quanto completa la visione di un approccio riabilitativo basato sulle evidenze e sulla personalizzazione delle cure. I dispositivi disponibili presso il Centro possono essere suddivisi rispetto agli approcci tecnologici che implementano in: robot a effetto finale, robot esoscheletrici, dispositivi in ambiente virtuale (realtà immersiva o meno), strumenti di valutazione. Un'ulteriore suddivisione può essere definita con attenzione al distretto motorio che tali dispositivi vanno a riabilitare: arti inferiori, arti superiori 28 (spalla/braccio/mano); oppure rispetto alla funzione motoria: cammino, forza, presa e manipolazione, funzioni cognitivo-motorie, propriocezione, equilibrio e postura. Altri dispositivi sono utilizzati esclusivamente con funzione di valutazione dello stato funzionale del paziente, e si tratta di strumenti di valutazione elettrofisiologica (EEG, EMG), biomeccanica (IMU) e comportamentale.

Tipologia	Campo di applicazione
ROBOT ESOSCHELETRICI	Parker – Indego Esoscheletro per la riabilitazione del cammino overground  Marsi Bionics – Atlas 2030 Esoscheletro pediatrico per la riabilitazione del cammino overground con sospensione del peso  Wearable Robotics - ALEx RS Robot esoscheletrico bimanuale per la riabilitazione neuromotoria degli arti superiori attraverso serious games.  Hocoma - Armeo Power Robot esoscheletrico per la riabilitazione neuromotoria degli arti superiori attraverso serious games.
ROBOT AD EFFETTORE FINALE	Reha Technology – G-EO System: dispositivo robotico ad effetto finale per la valutazione e riabilitazione del cammino.  Movendo Technologies – Hunova

	<p>Sistema robotico di pedana e seduta per la valutazione e riabilitazione del tronco, degli arti inferiori, della postura e dell'equilibrio.</p> <p>Tyromotion - Amadeo Robot ad effetto finale per la riabilitazione della mano attraverso serious games.</p> <p>Humanware - Motore Robot planare ad effetto finale per la riabilitazione neuromotoria di spalla e braccio attraverso serious games.</p> <p>Hocoma – Erigo Verticalizzatore con sistema robotico di movimentazione degli arti inferiori</p>
SISTEMI DI RIABILITAZIONE IN AMBIENTE VIRTUALE	<p>Khymeia – Oak Sistema di riabilitazione della postura e dell'equilibrio attraverso pedana stabilometrica sensorizzata e serious games</p> <p>Biodex - Balance Pedana stabilometrica con controllo periferico della seduta.</p> <p>Khymeia - Vrrs Evo Sistema di realtà virtuale non immersiva per la riabilitazione. Il sistema fa uso di serious games, sensori aptici e pedane stabilometriche.</p> <p>Meta - Oculus Quest 2 Visore Realtà virtuale per riabilitazione neuromotoria e cognitiva</p> <p>BTS – Nirvana Sistema "Cave" di realtà virtuale proiettata con serious games.</p>
SISTEMI DI TELERIABILITAZIONE	<p>Khymeia – Telecockpit Sistema di teleriabilitazione per la gestione di device con sistemi aptici per la riabilitazione neuromotoria e logopedica</p>
STRUMENTI DI VALUTAZIONE FUNZIONALE	<p>EGI - Geodesic 400 Sistema di acquisizione elettroencefalografica ad alta densità (128 elettrodi)</p> <p>Captiks – Move-It Network di sensori accelerometrici, magnetometrici e giroscopici indossabili per la valutazione della biomeccanica del movimento in ambiente ecologico</p> <p>BTS – FreeEMG 1000 Sistema per l'acquisizione dell'elettromiografia di superficie per 16 sensori e 2 elettrogoniometri</p> <p>Targeted Box &amp; Block e Pointing Task Sistemi di valutazione del test Box &amp; Blocks e del Pointing task progettati per la misura multimodale delle risposte comportamentali, elettrofisiologiche e biomeccaniche.</p> <p>Versatek - F-scan Solette per la valutazione della pressione del piede durante il cammino</p>

### 3. Centro per la diagnosi, cura e trattamento del dolore neuropatico e delle Cefalee

Il Centro per la diagnosi, cura e trattamento del dolore neuropatico e delle Cefalee dell'IRCCS San Raffaele è un centro italiano di III livello che si occupa della diagnosi, trattamento e ricerca sulle cefalee, dalle forme più comuni (emicrania senza aura, emicrania con aura, cefalea a grappolo, cefalea di tipo tensivo, etc.) a quelle più rare, sia in età pediatrica che nell'adulto. L'eccellenza assistenziale è frutto della ricerca traslazionale in ambito genetico, clinico e neurofisiologico e si esprime in ambito terapeutico e gestionale. Considerando l'impatto delle cefalee sulla popolazione (35.47% dell'intera popolazione mondiale - dati ufficiali OMS) dal punto di vista della disabilità (Lancet Neurol.2019 Nov;16(11):877-89), attività di assistenza e cura di tale patologie è fondamentale per il miglioramento della qualità della vita dei pazienti. Il Centro per le cefalee dell'IRCCS San Raffaele ha un'esperienza pluridecennale nella clinica, nella sperimentazione farmacologica e nella ricerca, conta su specialisti altamente qualificati e dedicati a tempo pieno. L'approccio clinico al paziente prevede la sua totale presa in carico diagnostica e terapeutica, non trascurando tuttavia i fondamentali aspetti di informazione e sensibilizzazione sulla patologia cefalalgica. Il Centro è punto di riferimento nazionale ed internazionale per le nuove terapie sperimentali per l'emicrania (es. anticorpi monoclonali anti CGRP) e per l'applicazione delle più recenti tecniche di prevenzione dalla Tossina botulinica alla neurostimolazione non invasiva (GammaCore, Cefaly).

La necessità di studiare i molteplici aspetti clinici e assistenziali di una patologia cronica, complessa e invalidante quale l'emicrania ha gettato le basi all'istituzione del Registro Italiano sull'emicrania – I-GRAINE: "Italian Migraine Registry. L'IRCCS è coordinatore dello studio I-GRAINE che prevede il coinvolgimento di 42 centri per istituire un registro clinico sulle cefalee.

#### Cardiologia Riabilitativa

La Cardiologia Riabilitativa dell'IRCCS San Raffaele è specializzata nella riabilitazione dei pazienti affetti dalle seguenti patologie cardiovascolari:

- postumi recenti di infarto miocardico;
- angioplastica coronarica e chirurgia cardiaca;
- scompenso cardiaco cronico;
- trapianto cardiaco;
- patologie vascolari periferiche o sottoposti a chirurgia vascolare.

Il reparto di degenza ordinaria è dotato di 51 posti letto, di cui 9 destinati al monitoraggio dei pazienti ad alta complessità e instabili emodinamicamente. Il reparto di Day Hospital gestisce 13 posti letto, sui quali ruotano circa 26 pazienti al giorno.

La maggioranza dei pazienti afferenti ai reparti sono classificabili come 'complessi'. Il 99,7% dei pazienti proviene per trasferimento diretto da ospedali per acuti (il 6% circa da fuori regione) in media in 4° o 5° giornata dall'intervento chirurgico o dall'evento acuto, anche se in circa il 20% dei post chirurgici, il ricovero avviene già in 2° o 3° giornata dall'intervento grazie alla presenza di una zona semintensiva dedicata strutturalmente e strumentalmente adeguata (9 posti letto per pazienti ad alta complessità) e di personale sanitario esperto e dedicato.

Il Centro di Cardiologia Riabilitativa ha un'esperienza decennale nel trattamento di pazienti con scompenso cardiaco con attività assistenziale e di ricerca che lo hanno reso centro di riferimento per tale tipo di patologia a livello nazionale come risulta dal Programma Nazionale Esiti (sia in termini di mortalità a 30 giorni sia di tasso di ri-ospedalizzazione a 30 giorni). Tali risultati si sono resi possibili grazie alla tipologia dell'attività assistenziale che conta su

personale specializzato facente parte di un team multidisciplinare che prevede la presenza medici specialisti in cardiologia, geriatri, internisti, endocrinologi, infettivologi e pneumologi, assieme a nutrizionisti, psicologi e fisioterapisti. Tutto il personale è stato formato attraverso periodi di training in Italia e all'estero e partecipa attivamente all'attività di ricerca in tale settore. L'attività di ricerca prevede l'applicazione dei risultati ottenuti attraverso la ricerca di base (muscolo periferico, endocrinologia cardiovascolare, metabolismo cardiaco, colture cellulari) ai quotidiani protocolli di trattamento riabilitativi cui i pazienti con scompenso cardiaco vengono sottoposti. Il paziente può inoltre essere seguito, una volta dimesso dal regime di ricovero, sul territorio o a domicilio attraverso un sistema di tele monitoraggio/teleassistenza associato a sessioni programmate di teleriabilitazione.

Si segnala che il Prof. Volterrani, responsabile del Centro di Cardiologia Riabilitativa ha i seguenti ruoli nelle società scientifiche nazionali e internazionali:

- Segretario del Board della Heart Failure Association (HFA) dell'European Society of Cardiology (ESC)
- Presidente della ITAHFA (Italian Heart Failure Association)
- Membro dei seguenti gruppi di lavoro della HFA: Education, Digital Health & Patient Care, Advocacy Regulatory Affairs, Exercise Physiology and Training, Digital Health Committee.

Tutti i pazienti seguiti presso il Centro, vengono trattati per ciascuna patologia o comorbilità secondo le più recenti linee guida nazionali e internazionali, come si può evincere dai piani diagnostico terapeutici depositati presso il Reparto di Cardiologia. Si riportano le seguenti Linee Guida che sono state adottate presso l'Istituto San Raffaele:

- 2021: ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure; PMID: 34447992 DOI: 10.1093/eurheartj/ehab368
- 2022: Head-to-head comparison between recommendations by the ESC and ACC/AHA/HFSA heart failure guidelines; PMID: 35579428 DOI: 10.1002/ejhf.2542
- 2022: ESC Guidelines for the management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death; PMID: 36017572 DOI: 10.1093/eurheartj/ehac262

La Cardiologia Riabilitativa dell'IRCCS San Raffaele implementa innovazione assistenziale in particolare nella cardiodiagnostica:

- RMN cardiaca per lo studio della funzionalità cardiaca;
- TAC per l'indagine morfologica delle coronarie con strumentazione di ultima generazione che consente: applicabilità a pazienti con aritmie o tachicardia; velocità di esecuzione ;all'interno di un singolo battito cardiaco; post-processing automatico con il supporto dell'intelligenza artificiale.
- laboratorio di ecocardiografia centralizzato, con postazioni autonome e devices portatili;
- monitoraggio avanzato per aritmie e fenomeni ischemici esteso a tutto l'ambito cardiovascolare;
- valutazione della funzione endoteliale non invasiva;
- ambulatorio per lo studio del sistema nervoso autonomo, della portata cardiaca e delle resistenze polmonari non invasiva;
- centro servizi di telemedicina: monitoraggio, counseling e teleriabilitazione dei pazienti a domicilio;
- piattaforma centrata sul paziente, con programmi educazionali, forum, social network e app in ambito scompenso cardiaco.

La Cardiologia Riabilitativa ha una rete di collaborazione con le strutture per acuti per la presa in carico precoce dei pazienti cardio-operati. I pazienti ricoverati sono prevalentemente

pazienti post-chirurgici (69,47%), pazienti con insufficienza del cuore sinistro (19,26%) e pazienti con scompenso cardiaco congestizio (8,40%).

La rete di assistenza è basata sulle collaborazioni con le seguenti strutture:

- Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini (Roma)
- Azienda Ospedaliera Universitaria Sant'Andrea (Roma)
- Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I (Roma)
- European Hospital (Roma)
- Ospedale Generale Madre Giuseppina Vannini Figlie di San Camillo (Roma)
- Ospedale Policlinico Casilino (Roma)
- Ospedale Sandro Pertini (Roma)
- Policlinico Tor Vergata (Roma)
- Policlinico Universitario Campus Bio-Medico (Roma)
- Policlinico Universitario Fondazione Agostino Gemelli (Roma)

In particolare, è attiva una collaborazione di attività assistenziale in rete con l'Azienda Ospedaliera Universitaria Sant'Andrea (Roma) per l'ottimizzazione del management dello Scompenso Cardiaco Acuto: dal dipartimento d'emergenza alla cardiologia riabilitativa. L'obiettivo della collaborazione è dimostrare che la continuità gestionale dello scompenso cardiaco dalla fase acuta (dipartimento d'emergenza) a quella territoriale, passando per la parte riabilitativa, migliora la qualità di vita dei pazienti, riduce la durata della degenza, la mortalità e il numero delle ri-ospedalizzazioni a breve e lungo termine.

#### Riabilitazione Respiratoria

La Riabilitazione Respiratoria dell'IRCCS San Raffaele è basata su un percorso multidisciplinare di presa in carico di pazienti sintomatici con patologie respiratorie croniche o post-acute. Tale percorso è adattato individualmente e progettato per ottimizzare la condizione fisica e i sintomi e per migliorare la qualità della vita e la partecipazione alle attività sociali.

Nel biennio 2021-2022 sono stati ricoverati nell'Unità di Pneumologia Riabilitativa dell'IRCCS San Raffaele 624 pazienti affetti da malattia polmonare cronica in fase di scompenso e di questi circa il 25% erano sottoposti a ventilazione meccanica non invasiva e, in quota sensibilmente inferiore invasiva, con una o più delle seguenti caratteristiche:

- provenienza da Unità Operativa Complessa di Rianimazione, Terapia Intensiva, Terapia Intensiva o sub-intensiva Respiratoria, Medicina o Pronto Soccorso;
- in trattamento con ventilazione Meccanica Non Invasiva per un periodo maggiore alle 96 ore consecutive;
- allettamento obbligato;
- necessità di monitoraggio continuo.

L'assistenza di pazienti con tale complessità è gestita dall'Istituto con un considerevole impegno economico e di risorse umane, strumentali e organizzative per perseguire i seguenti obiettivi:

- controllo delle complicanze cardio-respiratorie;
- stabilizzazione del quadro clinico;
- definizione della terapia medica più appropriata secondo i suggerimenti delle linee-guida ufficiali;
- definizione del percorso di svezzamento (ove possibile);
- definizione del percorso di decannulazione (ove possibile);
- stratificazione prognostica;
- miglioramento della capacità funzionale allo sforzo fisico e l'autosufficienza;
- miglioramento della qualità della vita;

- attivazione di un caregiver e/o di un percorso di assistenza domiciliare integrato (ADI);
- impostazione dell'attività al follow-up (Riabilitazione a lungo termine).

Nell'ambito della Pneumologia Riabilitativa, l'approccio riabilitativo dell'IRCCS San Raffaele è di tipo globale all'interno di percorsi assistenziali appropriati. Per ottenere un progetto fattibile ed efficace, i pazienti sono inseriti in programmi individualizzati personalizzati sulla base delle esigenze e delle situazioni in cui versano. Fondamentale per la definizione appropriata del programma è la valutazione clinica e funzionale specifica d'organo. A tale scopo si utilizzano misure di funzione, disabilità e partecipazione/relazione validate e riconosciute dalla comunità scientifica internazionale.

L'inquadramento diagnostico-valutativo, effettuato nei primi giorni di degenza, analizza non solo le variabili cliniche, ma anche quelle psicologiche e sociali che possono aver influenzato lo sviluppo della malattia. L'approccio al paziente coinvolge un'équipe multidisciplinare (medico pneumologo, infermiere professionale, fisioterapista, psicologo, consulenti esterni), che valuta il paziente, seguendone il lavoro e l'esito terapeutico. Il medico pneumologo, in particolare, si occupa della valutazione clinica, delle complicanze presenti, delle terapie e del recupero dello stato di salute del paziente; se lo staff medico lo ritiene necessario, può prescrivere l'esecuzione di ulteriori visite mediche specialistiche ed esami non compresi nella routine, al fine di poter impostare un adeguato e personalizzato programma terapeutico e riabilitativo.

Pazienti le cui condizioni di salute richiedano complessità e multidisciplinarietà dell'intervento riabilitativo, ma per i quali non siano necessarie l'osservazione clinica e l'assistenza a tempo pieno del regime di ricovero ordinario afferiscono alle prestazioni riabilitative in regime ambulatoriale. Il Programma di Riabilitazione Ambulatoriale è riservato a pazienti per i quali la continuità del trattamento riabilitativo riveste un preciso significato clinico e assistenziale. Il programma è articolato nelle seguenti fasi: 1) impostazione del progetto (assessment medico); 2) impostazione del programma (triage del fisioterapista respiratorio).

Nel 2022 è stato attivato nell'Istituto il **Programma di Riabilitazione Ambulatoriale Tecnologico** basato sull'utilizzo del parco macchine riabilitativo presente presso la struttura (robot per riabilitazione, sistemi per la valutazione e training dell'equilibrio, sistemi interattivi per la riabilitazione motoria e sensoriale...) in modo che pazienti necessitanti di intervento riabilitativo mirato potessero beneficiare di trattamenti personalizzati, motivanti, intensivi e innovativi grazie all'expertise di personale clinico altamente specializzato all'uso delle nuove tecnologie in riabilitazione.

#### Centro per le Disabilità dello Sviluppo e la Riabilitazione Pediatrica

Il Centro di Riabilitazione Pediatrica e delle Disabilità dello Sviluppo dell'IRCCS San Raffaele segue dal 1997 bambini (fin dai primi mesi di vita) e giovani adulti con Disabilità dello Sviluppo con un approccio multidisciplinare polispecialistico in una prospettiva di life span, considerando come obiettivo ultimo la qualità della vita.

Le principali categorie di patologie del Centro sono le seguenti:

- Paralisi cerebrali infantili
- Disabilità intellettiva (Sindrome di Down)
- Patologie del sistema nervoso centrale e periferico con disabilità dello sviluppo (epilessia, malformazioni, malattie neuromuscolari e neurodegenerative)
- Problemi relazionali e comportamentali di incerta eziologia
- Ritardi dello sviluppo e del linguaggio
- Disturbi specifici dell'apprendimento.

Il modello organizzativo del Centro per le disabilità dello sviluppo affianca alle attività riabilitative un'attenta sorveglianza medica polispecialistica con controlli mirati e di screening per offrire il miglior benessere fisico dei piccoli pazienti. I controlli medici sono mirati a prevenire le complicanze, controllare l'accrescimento e a seguire lo sviluppo emotivo dei bambini durante la loro crescita, fino all'età adulta.

Secondo la diagnosi del bambino, l'attività riabilitativa viene svolta in:

- regime di ricovero ordinario: 10 posti letto (stanze singole che prevedono l'accoglienza del genitore h24) dedicati alla riabilitazione intensiva, in genere post-operatoria. Nel 2021 sono stati dimessi 112 pazienti dei quali 46% provenienti da fuori regione. Nel 2022 sono stati dimessi 148 pazienti dei quali 57% provenienti da fuori regione;
- regime ambulatoriale ex-art 26 che ha accolto 124 bambini.

Per i casi che richiedono consulenze chirurgiche sono attive collaborazioni con centri clinici di riferimento, quali:

- IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù (Roma)
- Policlinico Universitario Fondazione Agostino Gemelli (Roma)
- Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico Umberto I (Roma)
- Ospedale Universitario di Basilea.

Per garantire la continuità assistenziale, le famiglie che afferiscono al Centro possono usufruire del teleconsulto nella fase di elaborazione del progetto educativo, di definizione del percorso riabilitativo e nel monitoraggio di tali percorsi. E' inoltre possibile eseguire a distanza un controllo sull'effetto delle terapie farmacologiche. Il vantaggio di utilizzare una cartella clinica elettronica (Magic) sviluppata all'interno dell'Istituto e in uso dal 2005 e di effettuare le visite tramite webcam, mediante teleconsulto, risiede nell'aver a disposizione tutti i dati relativi al bambino aggiornati, mentre si interagisce direttamente con la famiglia, con gli operatori coinvolti nel progetto riabilitativo e con gli educatori (contesto scolastico), consentendo al bambino e alla famiglia di rimanere nella zona di residenza, in un contesto familiare.

Dal 2020, sono state attivate terapie ambulatoriali psicologiche e logopediche in modalità da remoto, che stanno continuando in alcuni casi su richiesta dei pazienti. Grazie all'introduzione di strumentazione interattiva per l'attività motoria da remoto, è stato attivato un approccio di teleriabilitazione motoria e cognitiva per alcuni pazienti in aree remote. I ragazzi seguiti da remoto vengono inizialmente conosciuti in sede e saranno comunque rivalutati periodicamente con accessi nell'Istituto.

E' attiva una collaborazione con la Fondazione San Raffaele di Ceglie Messapica, dove la Responsabile Pediatra del Centro e la Fisiatra si recano regolarmente per consulenze in loco, creando una rete trans regionale tra gli Istituti.

Infine, vi sono collaborazioni con associazioni di pazienti che vengono seguite nell'ambito delle attività ambulatoriali, quali: Special Olympics Fondazione Theodora; Associazione Italiana Persone Down Amardown - Martina Franca (Ta); Il Melograno – Civitavecchia; L'albero dei Mille Colori dell'albero della vita - Fiumicino La fenice operosa – Sacrofano; Il colibrì – Fiumicino Ways; Prader Willi Italiana sindrome X fragile; ANANAS (Associazione Nazionale Aiuto per la Neurofibromatosi, amicizia e solidarietà) Scuola Viva Onlus; L'arte nel cuore Insieme Alatri Onlus; Associazione L'Arte nel Cuore Associazione Vedere Oltre.

Accanto alle attività riabilitative convenzionate con il SSN, vi è un ambulatorio "Privato Etico" per consulenze e per terapie riabilitative motorie-psicomotorie, logopediche, psicologiche, tra le quali si segnala un ambulatorio di neuropsicologia per la diagnosi e la certificazione dei disturbi dell'apprendimento. L'anno 2021 ha visto l'accesso di un totale di 666 pazienti per un



totale di 4666 trattamenti. Nell'anno 2022, 413 pazienti hanno usufruito dell'ambulatorio "Privato Etico" per un totale di 3728 trattamenti.

### Diagnostica per Immagini

L'introduzione nell'Istituto di una Tomografia Computerizzata (TC) di ultima generazione (GE Healthcare Revolution CT) e di una Risonanza Magnetica (RM) 3 Tesla (GE Healthcare SIGNA Hero) ha reso l'Area di Diagnostica per Immagini dell'IRCCS San Raffaele polo di eccellenza in tale ambito. La TC a 512 slice con risoluzione pari a 18 pl/cm, permette, nel campo della cardiologia, una valutazione dell'albero coronarico in modo non invasivo in pazienti affetti da coronaropatia, sospetta o accertata, e la valutazione della volumetria cardiaca in pazienti con disfunzione ventricolare e studi di perfusione.

La nuova RM a 3 Tesla per l'imaging avanzato è stata acquisita per l'eccellenza in diagnostica e ricerca. La nuova RM è dotata di avanzati algoritmi di ricostruzione basati su Deep Learning e applicazioni automatizzate che garantiscono scansioni molto più veloci e accurate: le immagini ottenute sono particolarmente nitide e applicazioni di Intelligenza Artificiale permettono diagnosi più accurate e aiutano a eliminare la necessità di biopsie non necessarie. L'insieme dei dati ottenibili dalla RM viene utilizzata nella pratica clinica indirizzata prevalentemente all'outcome riabilitativo. Nel 2020, è stata implementata la collaborazione nella rete internazionale della Siemens e attivata un software specifico che permette lo studio funzionale. E' attiva una collaborazione con la Neurochirurgia dell'Azienda Ospedaliera Sant'Andrea per i pazienti affetti da tumori cerebrali, portata avanti con la messa a punta di tecniche spettroscopiche e di perfusione cerebrale per consentire una più precisa caratterizzazione pre-operatoria del tumore e a seguire l'andamento della malattia in una fase post- chirurgica.

Si riportano qui di seguito gli indicatori del **Programma Nazionale Esiti** per l'IRCCS San Raffaele nel 2022: l'analisi dei dati evidenzia l'eccellenza assistenziale dell'Istituto rispetto alla media nazionale in termini di mortalità e riammissioni ospedaliere.

INDICATORE	N	% GREZZA	% ADJ	RR ADJ	P
Scompenso cardiaco congestizio: mortalità a 30 giorni	264	7.96	9.77	0.87	0.52
Scompenso cardiaco congestizio: riammissioni ospedaliere a 30gg	191	14.66	14.72	1.09	0.61
Ictus ischemico: mortalità a 30 giorni	47	6.38	-	-	-
Ictus ischemico: riammissioni ospedaliere a 30 giorni	45	11.11	-	-	-
BPCO riacutizzata: mortalità a 30 giorni	120	3.33	4.14	0.3	0.015
BPCO riacutizzata: riammissioni ospedaliere a 30 giorni	117	11.97	11.38	0.9	0.672
Mortalità a 30 giorni dal ricovero per embolia polmonare	7	0	-	-	-
Riammissioni a 30 giorni dalla dimissione dopo un ricovero per embolia polmonare	7	28.57	-	-	-
Ictus ischemico: mortalità a 1 anno	38	5.26	-	-	-
Ictus ischemico: MACCE a 1 anno	38	23.68	-	-	-

**Numero totale dei posti letto:**

Anno 2022						
R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.
225	27	252	30	0	16	298

**Numero totale dei ricoveri nel 2022:**

Anno 2022						
R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.
2090	469	2559	1363		270	4192

**Numero totale dei ricoveri per patologie relative alla richiesta di conferma:**

Anno 2021							Anno 2022						
R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.	R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.
1794	456	2250					2090	469	2559				

**Degenza media:**

Anno 2022							
R.O.	R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.
34,6	36,1	28,7	34,8	7,21		12,47	24

**Indice di occupazione dei posti letto:**

Anno 2022							
R.O.	R.O.	D.H.	Tot. Riab.	Med.*	Med. No-Cov*	Med.- Cov.	Tot.
84,7%	92,7%	82,2%		89,3%		56,9%	

**Efficacia del trattamento riabilitativo espressa in modified Barthel Index [0;100]:**

2022			
	Età media	Barthel ingresso media	Barthel uscita media
Riab NMA	69,17	37,0	81,4
Riab NMB	72,07	37,2	86,2
Riab NMC	72,67	31,7	71,7

2022					
	Età media	Barthel ingresso media	Barthel uscita media	5MWT ingresso media	5MWT uscita media
Riab Cardiologica	70,47	77,1	97,6	47,3	288,6
Riab Respiratoria	74,59	49,4	75,8	58,6	149,0

### Registri di malattia

Nel periodo 2021-2022 il Centro Malattia di Parkinson e Disturbi dei Movimenti ha proseguito le attività di assistenza e di ricerca per i pazienti con parkinsonismi atipici (come PSP, CBD e MSA). Inoltre, il Centro ha continuato l'osservazione della casistica di pazienti affetti da PSP, dedicando particolare attenzione all'analisi dei sintomi "non motori" grazie alla Non Motor Symptoms Scale, al Non Motor Symptoms Questionnaire e alla PSP Scale. Sono stati inclusi nella valutazione tutti i pazienti con diagnosi di probabile PSP, senza limitazione dell'età di esordio, con fascia età: 40-80 anni, ricoverati presso il reparto di riabilitazione neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele. Nel 2021/2022 ha visto l'arruolamento di 32 nuovi pazienti con PSP.

Il Centro Dolore Neuropatico e delle Cefalee è coordinatore dell'istituzione del Registro Italiano sull'emicrania (I-GRAINE: Italian Migraine Registry), che vede attualmente il coinvolgimento di 42 centri italiani, che ha raccolto finora i dati di 1160 soggetti.

### Centri di riferimento a livello regionale o nazionale presenti nell'IRCCS San Raffaele:

#### Scompenso cardiaco

L'IRCCS San Raffaele è un centro di riferimento per scompenso cardiaco, visto l'elevato numero di pazienti trattati e dimessi. Il responsabile del Dipartimento è coinvolto nell'elaborazione di linee guida a livello europeo.

#### Centro del Dolore Neuropatico e delle Cefalee

Il Centro del Dolore Neuropatico e delle Cefalee dell'IRCCS San Raffaele è centro di riferimento per il Lazio dell'Associazione Neurologica Italiana per la Ricerca della Cefalea – ANIRCEF.

#### Stroke

Dal 2019 la SIMFER ha promosso un Gruppo di Lavoro sulla revisione del Protocollo di Minima per l'Ictus Cerebrale (PMIC). I coordinatori scientifici dello studio sono il M. Franceschini, responsabile del gruppo di ricerca sulla robotica Riabilitativa dell'IRCCS San Raffaele, e C. Paolucci C.

Nel 2021 è stato pubblicato il risultato del gruppo di lavoro nell'articolo scientifico: *Cecchi, F. et al. Redefining a minimal assessment protocol for stroke rehabilitation: the new "Protocollo di Minima per l'Ictus"-PMIC2020. European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine. 2021 October;57(5):669-76; DOI: 10.23736/S1973-9087.21.06638-7.*



## Unità per la cura e la ricerca su Cefalee e dolore

L'Unità è il primo centro in Europa per numero di pazienti reclutati in trial clinici sugli anticorpi monoclonali antiCGRP. Ciò ha comportato un considerevole incremento del numero e della complessità dei pazienti afferenti, in alcuni casi anche da altre Nazioni Europee. Gli anticorpi contro CGRP o il suo recettore sono farmaci altamente specifici per il loro target, iniettati sottocute una volta al mese per alcuni mesi consecutivi, hanno una lunga emivita e le loro caratteristiche farmacocinetiche li rendono ideali per il trattamento cronico dell'emicrania e per minimizzare gli eventi avversi.

Presso il Centro sono regolarmente valutati pazienti a cui vengono prescritti gli anticorpi monoclonali, i pazienti in trattamento con anticorpi monoclonali reclutati sono ad oggi 1982.

## Area di Neuroscienze

Esoscheletro ATLAS in età pediatrica.

Nel corso del 2022 l'IRCCS ha acquistato il primo esoscheletro indossabile al mondo utilizzabile in età pediatrica (ATLAS 2030) e ne è iniziato l'utilizzo, in via sperimentale, per la riabilitazione del cammino di bambini con disturbo del controllo motorio (Paralisi Cerebrale Infantile e malattie neuromuscolari), secondo le attuali indicazioni del produttore.

L'utilizzo di nuove tecnologie robotiche in ambito pediatrico motiva i bambini e ne favorisce l'aderenza ai training riabilitativi, grazie anche alla componente ludico-motivazionale che le caratterizza. In particolare Atlas permette di eseguire training di riabilitazione intensivi e ripetibili che favoriscono l'attivazione dei meccanismi legati alla neuroplasticità cerebrale specifici dell'età pediatrica, favorendo l'apprendimento e l'acquisizione di adeguate strategie di controllo motorio, il mantenimento di adeguato range articolare, il controllo della spasticità e della forza, il miglioramento nella stabilità del tronco e della capacità ventilatoria e cardiovascolare.

Questo tipo di training prevede inoltre la stretta relazione tra il terapeuta e il bambino nella realizzazione di compiti motori task-oriented, che coinvolgono diversi sistemi funzionali (motorio-percettivo, cognitivo e relazionale) che facilitano l'attività e la partecipazione del bambino con l'obiettivo primario di migliorarne la qualità della vita.

**Direttore Scientifico****Massimo Fini**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 0652253406 Fax +39 06 52255668

Email: [massimo.fini@sanraffaele.it](mailto:massimo.fini@sanraffaele.it)**Direttore Sanitario****Amalia Allocca**

Via della Pisana, 235

Tel. +39 06 52252337

Email: [direzione.sanitaria@sanraffaele.it](mailto:direzione.sanitaria@sanraffaele.it)**Direttore Operativo****Alessio Cicirelli**

Via della Pisana, 235

Tel. +39 06 52252380

Email: [alessio.cicirelli@sanraffaele.it](mailto:alessio.cicirelli@sanraffaele.it)**Presidente Comitato  
Tecnico Scientifico****Enrico Garaci**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 0652252132 Fax +39 06 52252079

Email: [enrico.garaci@sanraffaele.it](mailto:enrico.garaci@sanraffaele.it)**Segreteria Scientifica  
Ufficio Ricerca****Astrid van Rijn****Michela Goffredo**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 06 52253405 Fax +39 06 52255668

Email: [astrid.vanrijn@sanraffaele.it](mailto:astrid.vanrijn@sanraffaele.it)[michela.goffredo@sanraffaele.it](mailto:michela.goffredo@sanraffaele.it)**Segreteria Direttore  
Scientifico****Margot Bastianutti**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 06 52253406 Fax +39 06 52255668

Email: [segreteriascientifica@sanraffaele.it](mailto:segreteriascientifica@sanraffaele.it)**Servizi Amministrativi Ricerca****Guido Poli****Claudia Vivarelli**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 06 52252471

Email: [guido.poli@sanraffaele.it](mailto:guido.poli@sanraffaele.it)[claudia.vivarelli@sanraffaele.it](mailto:claudia.vivarelli@sanraffaele.it)**Segreteria Comitato Etico****Lucia Gatta**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 06 66130406 Fax 06/66130407

Email: [lucia.gatta@sanraffaele.it](mailto:lucia.gatta@sanraffaele.it)**Biblioteca****Riccardo Fabrizi**

Via di Val Cannuta, 247

Tel/Fax +39 06 52252466

Email: [bibliotecapisana@sanraffaele.it](mailto:bibliotecapisana@sanraffaele.it)

**Grantfunding  
Editorial Office**

**Daniela Pernice**

Via di Val Cannuta, 247

Tel. +39 06 52253404 Fax +39 06 52255668

Email:[daniela.pernice@sanraffaele.it](mailto:daniela.pernice@sanraffaele.it)