

Progetto di ricerca scientifica

Titolo del progetto

La degenerazione assonale: dalla comprensione dei meccanismi molecolari precoci alla base della Sclerosi Laterale Amiotrofica allo sviluppo di nuovi biomarcatori

Data: 16/03/2026

Durata (*in anni*): 2 anni

Promotore / Luogo di svolgimento del progetto

Le attività di ricerca descritte nel presente progetto verranno realizzate all'interno dell' IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano.

Principal Investigator: Nilo Riva, MD, PhD

A) Informazioni Generali Sul Progetto

Titolo del progetto: La degenerazione assonale: dalla comprensione dei meccanismi molecolari precoci alla base della Sclerosi Laterale Amiotrofica allo sviluppo di nuovi biomarcatori

B) PREMESSA:

Il progetto mira a identificare nuovi biomarcatori e a definire, sul piano molecolare, i meccanismi alla base della degenerazione assonale nella SLA e nelle neuropatie periferiche. L'obiettivo finale è trasferire tali evidenze in ambito diagnostico e clinico, individuando biomarcatori prognostici e predittivi e nuove potenziali strategie terapeutiche per la SLA. L'integrazione tra ricerca di base e attività clinica rappresenta un elemento essenziale per la riuscita del progetto traslazionale.

Background

Le malattie neurodegenerative, tra cui la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), la malattia di Alzheimer e la malattia di Parkinson, rappresentano una delle principali sfide della medicina moderna. L'impatto economico di queste patologie è considerevole e comprende non solo i costi sanitari diretti, ma anche la perdita cronica di produttività dei pazienti e dei caregiver [1-3]. I costi sociali complessivi, ulteriormente aggravati dal profondo deterioramento della qualità della vita dei pazienti e delle loro famiglie, risultano quindi molto più elevati.

Il presente progetto si concentra in particolare sulla SLA, una malattia gravemente invalidante e rapidamente progressiva, tuttora priva di trattamenti risolutivi e di biomarcatori affidabili per la diagnosi precoce. I costi associati alla SLA sono proporzionalmente superiori rispetto ad altre malattie neurodegenerative, evidenziando la necessità di maggiori investimenti sia nel supporto clinico-assistenziale sia nella ricerca scientifica. Uno dei principali limiti della ricerca traslazionale in questo ambito risiede nella scarsa capacità predittiva dei modelli preclinici in vivo, che finora non hanno permesso di anticipare l'efficacia terapeutica nei pazienti. Risulta pertanto imprescindibile sviluppare piattaforme precliniche alternative per lo screening farmacologico e identificare nuovi biomarcatori in grado di migliorare il disegno degli studi clinici e la valutazione dell'efficacia dei trattamenti durante i trial.

La prevalenza della SLA è stimata in circa 5 casi per 100.000 individui, con una sopravvivenza media di 3-5 anni dall'esordio clinico [3-5]. Circa il 20% dei casi presenta un'ereditabilità definita (SLA familiare), con oltre 30 geni coinvolti. La maggior parte dei casi familiari è attribuibile a mutazioni nei geni *C9orf72*, *TARDBP*, *SOD1* e *FUS*. Mutazioni in questi geni sono osservate anche in una quota di casi sporadici. Dal punto di vista neuropatologico, la quasi totalità dei pazienti mostra una proteinopatia TDP-43, caratterizzata da deplezione nucleare e aggregazione citoplasmatica della proteina nei motoneuroni. Le mutazioni del gene *TARDBP*, responsabili di forme autosomiche dominanti, costituiscono quindi un modello rilevante per lo studio dei meccanismi molecolari alla base della malattia. Anche le mutazioni nel gene *SOD1* svolgono un ruolo cruciale nella SLA. L'identificazione precoce dei pazienti portatori è particolarmente importante, poiché Tofersen, farmaco mirato contro le mutazioni *SOD1*, ha ottenuto l'approvazione delle autorità regolatorie statunitensi ed europee, mostrando per la prima volta evidenze di efficacia nei trial clinici.[6] La diagnosi precoce dei soggetti mutati è dunque strategica per ottimizzare l'efficacia terapeutica, presumibilmente maggiore se il trattamento viene avviato nelle fasi iniziali della neurodegenerazione.

Numerose evidenze supportano l'esistenza di una fase presintomatica nella SLA, rilevabile nei portatori di mutazioni prima della comparsa dei sintomi clinici.[7, 8] L'identificazione di questa fase di transizione potrebbe consentire diagnosi precoci e interventi tempestivi con le terapie oggi disponibili.[8] In quest'ottica, individuare e monitorare longitudinalmente i soggetti geneticamente a rischio assume un valore strategico per la comprensione dell'esordio di malattia e per la pianificazione di studi clinici preventivi.

Il progetto qui proposto si colloca all'interno di questa prospettiva, integrando tecnologie avanzate e approcci multidisciplinari per studiare i meccanismi patogenetici della neurodegenerazione e per identificare strategie terapeutiche personalizzate, in linea con i principi della Medicina di Precisione. Inoltre, esso offrirà opportunità qualificanti di formazione e ricerca a giovani studiosi all'interno di un centro di Neuroscienze di rilevanza internazionale.

C) DESCRIZIONE DEL PROGETTO

Sommario e obiettivi generali

La degenerazione assonale, la perdita degli assoni periferici e le alterazioni della giunzione neuromuscolare rappresentano eventi precoci nella patogenesi della SLA, precedendo la degenerazione dei motoneuroni e la comparsa dei sintomi clinici [1, 2, 9]. In casi selezionati, la biopsia del nervo motorio si è dimostrata utile per la diagnosi differenziale precoce nei pazienti con quadri atipici di sindrome del motoneurone inferiore. [10-12] Essa può inoltre consentire una diagnosi specifica di neuropatie motorie e contribuire alla definizione dei meccanismi patogenetici. [11, 13, 14] Un nostro recente studio ha documentato la presenza di aggregazione della proteina TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) non solo nel sistema nervoso centrale [15], ma anche un'anomala localizzazione di TDP-43 negli assoni e nelle cellule di Schwann del sistema nervoso periferico.[16]. Questi risultati rafforzano l'ipotesi di un coinvolgimento precoce e diretto del sistema nervoso periferico nella SLA.

OBIETTIVI REALIZZATIVI (OR), ATTIVITÀ E METODOLOGIA

Obiettivi realizzativi (OR) specifici:

- **OR1. Individuazione di biomarcatori tissutali e di biofluidi con valore diagnostico e prognostico, e identificazione di nuovi target terapeutici di malattia.**
- **OR2. Individuazione di nuovi biomarcatori nei biofluidi di pazienti affetti da SLA .**

OR1 Individuazione di biomarcatori tissutali e di biofluidi con valore diagnostico e prognostico, e identificazione di nuovi target terapeutici di malattia.

Nonostante i numerosi sforzi dedicati all'identificazione di marcatori specifici della SLA, nessuno dei candidati finora proposti ha ottenuto approvazione per l'impiego clinico. L'individuazione di nuovi biomarcatori rappresenterebbe un avanzamento cruciale, in quanto faciliterebbe la diagnosi precoce e potrebbe accelerare l'avvio di eventuali terapie neuroprotettive. [9, 15, 16].

In questo Work Package valuteremo nuovi biomarcatori molecolari specifici per la SLA. In primo luogo, studieremo l'espressione e la localizzazione patologica di TDP-43 nei nervi motori e nella cute, un tessuto facilmente accessibile e idoneo anche a studi longitudinali. TDP-43 è noto per accumularsi a livello del sistema nervoso centrale dei pazienti con SLA e la sua presenza patologica nel sistema nervoso periferico è stata recentemente documentata.[14].

L'obiettivo successivo sarà lo sviluppo di una piattaforma traslazionale dedicata all'identificazione di nuovi attori molecolari coinvolti nei processi patogenetici della SLA. Integreremo dati di espressione genica provenienti da database pubblici, con l'obiettivo di selezionare biomarcatori e geni candidati altamente specifici per la malattia. I geni differenzialmente espressi nelle diverse condizioni sperimentali saranno analizzati mediante strumenti bioinformatici avanzati, che consentiranno di chiarire i processi biologici e le funzioni molecolari coinvolte. A tale scopo saranno condotte analisi di pathway e analisi di rete, utili per identificare nodi molecolari critici nella patogenesi.

Queste analisi forniranno nuove informazioni sui meccanismi alla base delle alterazioni patologiche osservate nei pazienti e costituiranno la base per lo sviluppo di approcci terapeutici innovativi e più mirati.

OBIETTIVO 2: Individuazione di nuovi biomarcatori nei biofluidi dei pazienti affetti da SLA

Obiettivo 2.1 L'obiettivo dell'OR2 è l'individuazione di nuovi biomarcatori nei pazienti affetti da SLA. Verrà condotta una valutazione multiparametrica dei diversi biomarcatori in soggetti con SLA sporadica (sALS) e in pazienti portatori di mutazioni patogenetiche associate alla SLA familiare (fALS). Tale approccio consentirà una profilazione clinica e molecolare dei pazienti nelle varie fasi della malattia, delineando i relativi profili patofenotipici.

I biomarcatori candidati identificati nell'OR1 saranno analizzati nel sangue e nel liquido cerebrospinale (CSF) dei pazienti affetti da SLA. Particolare attenzione sarà rivolta all'individuazione di biomarcatori misurabili nel sangue, tessuto facilmente accessibile e quindi di elevata tollerabilità e utilità clinica per il monitoraggio longitudinale. I livelli dei nuovi biomarcatori saranno confrontati con quelli dei neurofilamenti, attualmente considerati il biomarcatore di riferimento per la SLA e altre patologie neurodegenerative.[17]. Poiché i neurofilamenti aumentano in risposta a danno assonale o neuronale, essi non risultano specifici per una singola malattia, né tantomeno per la SLA.

Negli ultimi anni è emersa con chiarezza l'ampia eterogeneità clinica della SLA, che può manifestarsi con diversi gradi di debolezza motoria e con un possibile coinvolgimento extramotorio, incluse alterazioni cognitive e comportamentali osservate in una quota significativa di pazienti.[3] Parallelamente, gli studi genetici hanno evidenziato una notevole eterogeneità molecolare: nelle forme familiari di SLA sono stati identificati oltre 50 geni coinvolti, mentre nelle forme sporadiche una predisposizione genetica è rintracciabile in meno

del 10% dei pazienti. Una caratterizzazione fenotipica e genotipica approfondita è pertanto fondamentale per garantire la solidità scientifica del progetto [18, 19].

I livelli di espressione dei biomarcatori candidati saranno inizialmente valutati in una coorte pilota di circa 40 pazienti. I candidati più promettenti saranno successivamente studiati in una seconda coorte di validazione, già disponibile presso la biobanca dell'Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano. È inoltre previsto il reclutamento di ulteriori pazienti incidenti che saranno inclusi nelle analisi secondo le finalità del presente progetto di ricerca. Infine, verrà studiata l'espressione tissutale dei nuovi biomarcatori in campioni di pazienti affetti da SLA e in controlli, al fine di confermarne la rilevanza patologica.

Obiettivo 2.2: Come ulteriore studio esplorativo, effettueremo una valutazione clinica multiparametrica in soggetti sani portatori di mutazioni genetiche associate alla SLA, con l'obiettivo di identificare precocemente eventuali alterazioni correlate alle fasi iniziali della malattia. L'individuazione dei meccanismi molecolari e di biomarcatori accessibili in grado di rilevare tempestivamente la fase di fenocconversione consentirà di pianificare futuri interventi terapeutici nelle fasi più precoci, idealmente prima che la degenerazione assonale raggiunga uno stadio irreversibile.[7, 8]

Sviluppi futuri:

Tra le principali cause del fallimento di numerosi studi clinici sulla SLA figurano la limitata rilevanza biologica dei modelli cellulari e animali attualmente disponibili e la marcata eterogeneità fenotipica e genotipica dei pazienti. Per superare tali limitazioni, intendiamo generare e analizzare modelli cellulari derivati direttamente da singoli pazienti affetti da SLA.

Il primo passo consisterà nell'ottenere una caratterizzazione clinica e neurofisiologica approfondita dei pazienti inclusi nello studio, come descritto negli OR1 e OR2, unitamente a una genotipizzazione completa. A tutti i partecipanti con SLA sporadica e familiare sarà proposta una biopsia cutanea, da cui verranno ricavate colture primarie di fibroblasti. Da queste cellule sarà inoltre possibile generare cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSC), che potranno essere differenziate in neuroni, motoneuroni o cellule gliali.

L'obiettivo finale è lo sviluppo di modelli in vitro paziente-specifici, utili sia per approfondire i meccanismi patogenetici sia per valutare l'efficacia di nuovi potenziali composti farmacologici.

Sviluppo di nuove metodologie per lo screening farmacologico in vitro: Le colture primarie di fibroblasti rappresentano un primo modello biologico utile per studiare i meccanismi mediati da TDP-43 e per implementare piattaforme di screening farmacologico individualizzate. Il principale vantaggio di questi modelli risiede nella facile accessibilità del tessuto cutaneo e nella rapidità con cui è possibile ottenere cellule idonee alle analisi e ai test farmacologici.

Tuttavia, per disporre di modelli più rappresentativi delle cellule direttamente coinvolte nella patologia, verrà considerata anche la generazione di hiPSC e il loro differenziamento in motoneuroni, nonché lo sviluppo di modelli tridimensionali di unità motoria. Questi modelli 3D offriranno una rappresentazione più fedele della complessità anatomica e funzionale coinvolta nella SLA e costituiranno una piattaforma più robusta per lo studio dei meccanismi di malattia e per l'identificazione di terapie innovative.

D) TEMPISTICA E BUDGET

Proposta di Budget

	Anno 1	Anno 2
Contratti di ricerca	€ 24.500	€ 24.500
Analisi di multi-parametrica di biomarcatori tramite piattaforme multiplex	€ 8.000	€ 5.000
Analisi di nuovi biomarcatori a scopo esplorativo	Screening: Biomarcatore 1: € 1500 Biomarcatore 2: € 1500 Biomarcatore 3: € 1500	Validazione Biomarcatore 1: € 3000 Biomarcatore 2: € 3000 Biomarcatore 3: € 3000
Materiale di consumo	€ 3000	€ 2000
Costo delle pubblicazioni	€ 1000	€ 1500
Totale per anno	€ 41.000	€ 42.000
Budget totale: €83.000		

Cofinanziamento: le attività del presente progetto saranno eseguite presso l'Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano. Il progetto verrà cofinanziato da Grant attualmente in essere a carico del PI (Dott Nilo Riva), finanziati da PNRR e AriSLA. Il budget è ampiamente scalabile, ed il numero di nuovi biomarcatori, così come la dimensione campionaria, verranno modulate in base alle risorse disponibili. Per l'inizio di questo progetto, riteniamo necessaria una quota minima di € 25000

Giustificativo del Budget

Anno 1	
Contratti per Ricercatori	Borsa di Studio per un Senior Researcer (24.000 €/anno)
Materiale di consumo	Reagenti per Analisi Multiplex di biomarcatori (ELLA, SIMOA), ELISA per biomarcatori candidati, biologia molecolare e cellulare, istologia (microscopia elettronica, anticorpi) e reagenti ordinari (es. polveri chimiche, tamponi, etc)
Costi per pubblicazioni	Costo per pubblicazioni su riviste internazionali (quota d'invio, open access)
Anno 2	
Contratti per Ricercatori	Borsa di Studio per un Senior Researcer (24.000 €/anno)
Materiale di consumo	Reagenti per Analisi Multiplex di biomarcatori (ELLA, SIMOA), ELISA per biomarcatori candidati, biologia molecolare e cellulare, istologia (microscopia elettronica, anticorpi) e reagenti ordinari (es. polveri chimiche, tamponi, etc)
Costi per pubblicazioni	Costo per pubblicazioni su riviste internazionali

E) Svolgimento delle attività di ricerca: sostenibilità e possibili rimodulazioni delle strategie realizzative.

Il presente progetto si colloca in continuità con le attività scientifiche ad oggi sviluppati dal PI. Le numerose pubblicazioni già ottenute dal gruppo del PI sono a garanzia della fattibilità di questo progetto.

Grazie a questo progetto saremo in grado di realizzare di una piattaforma traslazionale che consenta un approccio integrato tra la ricerca clinica su paziente, le attività di ricerca in laboratorio e competenze in ambito neurobiologico. Gli studi qui realizzati ci consentiranno inoltre di generare dati preliminari grazie ai quali sarà possibile partecipare a Bandi competitivi e quindi ottenere nuovi finanziamenti per una completa e matura realizzazione delle progettualità qui descritte.

La validazione di nuovi biomarcatori, sia essi di attività di malattia o di tipo meccanicistico, potrebbe necessitare una attenta valutazione all'interno dell'intero spettro delle malattie dei motoneuroni; pertanto, il processo di validazione potrebbe essere esteso anche ad una seconda coorte di pazienti incidenti, che verrà reclutata per le finalità del presente progetto.

La natura traslazionale del progetto consentirà non solo di sviluppare nuove conoscenze, ma anche di dare una concreta possibilità alla crescita professionale di una nuova generazione di ricercatori nell'ambito delle malattie del motoneurone e della SLA.

F) BIBLIOGRAFIA

- [1]. Hardiman O, Al-Chalabi A, Chio A, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 **3**: 17085.
- [2]. Riva N, Agosta F, Lunetta C, Filippi M, Quattrini A. Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2016 **263**: 1241-1254.
- [3]. Riva N, Domi T, Pozzi L, *et al.* Update on recent advances in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol*. 2024 **271**: 4693-4723.
- [4]. Chio A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G, group Ps. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011 **82**: 740-746.
- [5]. Masrori P, Van Damme P. Amyotrophic lateral sclerosis: a clinical review. *Eur J Neurol*. 2020.
- [6]. Miller TM, Cudkowicz ME, Genge A, *et al.* Trial of Antisense Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*. 2022 **387**: 1099-1110.
- [7]. Benatar M, Granit V, Andersen PM, *et al.* Mild motor impairment as prodromal state in amyotrophic lateral sclerosis: a new diagnostic entity. *Brain*. 2022 **145**: 3500-3508.
- [8]. Benatar M, Wu J, McHutchison C, *et al.* Preventing amyotrophic lateral sclerosis: insights from pre-symptomatic neurodegenerative diseases. *Brain*. 2022 **145**: 27-44.
- [9]. Gentile F, Scarlino S, Falzone YM, *et al.* The Peripheral Nervous System in Amyotrophic Lateral Sclerosis: Opportunities for Translational Research. *Front Neurosci*. 2019 **13**: 601.
- [10]. Corbo M, Abouzahr MK, Latov N, *et al.* Motor nerve biopsy studies in motor neuropathy and motor neuron disease. *Muscle Nerve*. 1997 **20**: 15-21.
- [11]. Riva N, Gallia F, Iannaccone S, *et al.* Chronic motor axonal neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2011 **16**: 341-346.
- [12]. Riva N, Iannaccone S, Corbo M, *et al.* Motor nerve biopsy: clinical usefulness and histopathological criteria. *Ann Neurol*. 2011 **69**: 197-201.
- [13]. Quattrini A, Nemni R, Sferrazza B, *et al.* Amyloid neuropathy simulating lower motor neuron disease. *Neurology*. 1998 **51**: 600-602.
- [14]. Riva N, Clarelli F, Domi T, *et al.* Unraveling gene expression profiles in peripheral motor nerve from amyotrophic lateral sclerosis patients: insights into pathogenesis. *Sci Rep*. 2016 **6**: 39297.
- [15]. Brettschneider J, Del Tredici K, Toledo JB, *et al.* Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 2013 **74**: 20-38.
- [16]. Feneberg E, Gray E, Ansorge O, Talbot K, Turner MR. Towards a TDP-43-Based Biomarker for ALS and FTLT. *Mol Neurobiol*. 2018 **55**: 7789-7801.

- [17]. Falzone YM, Domi T, Agosta F, *et al.* Serum phosphorylated neurofilament heavy-chain levels reflect phenotypic heterogeneity and are an independent predictor of survival in motor neuron disease. *J Neurol.* 2020 **267**: 2272-2280.
- [18]. Scarlino S, Domi T, Pozzi L, *et al.* Burden of Rare Variants in ALS and Axonal Hereditary Neuropathy Genes Influence Survival in ALS: Insights from a Next Generation Sequencing Study of an Italian ALS Cohort. *Int J Mol Sci.* 2020 **21**.
- [19]. Pozzi L, Valenza F, Mosca L, *et al.* TBK1 mutations in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis: genetic and functional characterisation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2017 **88**: 869-875.



Dott. Nilo Riva, MD, PhD

IRCCS Carlo Besta Neurological Institute