

UNIVERSITA DEGLI STUDI DI PADOVA

Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE

Direttore: Ch.mo prof. Raffaele De Caro

TESI DI LAUREA

**Variazioni genetiche per il rischio
bipolare-schizofrenico e alterazioni ippocampali:
uno studio di risonanza magnetica strutturale**

Relatore: Prof. Fabio Sambataro

Candidato: Pietro Di Costanzo

Anno accademico 2021/2022

INDICE

1.	RIASSUNTO	1
2.	ABSTRACT	3
3.	INTRODUZIONE	5
4.	SCOPO DELLO STUDIO	33
5.	MATERIALI E METODI	34
6.	RISULTATI	43
7.	DISCUSSIONE.....	57
8.	CONCLUSIONE.....	63
9.	BIBLIOGRAFIA.....	65
10.	RINGRAZIAMENTI.....	72

1. RIASSUNTO

Presupposti dello studio:

Le più recenti scoperte nell'ambito delle Neuroscienze mettono in evidenza alterazioni genetiche, biologiche ed anatomiche comuni alla Schizofrenia e al Disturbo Bipolare. Tali evidenze sostengono l'ipotesi dello Spettro Bipolare-Schizofrenico, ovvero le due patologie sarebbero espressione eterogenea di un comune processo patologico. L'esistenza di alterazioni strutturali e funzionali della formazione ippocampale, specialmente a carico della sostanza grigia (volumetria) ma anche della sostanza bianca (ADC, FA), parzialmente condivise dai disturbi schizofrenico e bipolare è stato riportato da numerosi studi ; tuttavia rimane da chiarire se queste modificazioni possano essere effettivamente considerate un tratto *endofenotipico*, e in quel caso quali siano le varianti genetiche che ne possano determinarne la variabilità fra i diversi gruppi diagnostici appartenenti allo Spettro.

Scopo dello studio:

Il presente studio si propone identificare alterazioni della sostanza bianca ippocampale nei pazienti affetti da schizofrenia e disturbo bipolare tramite il *coefficiente di diffusione apparente (ADC)*, una misura della proprietà globali di diffusione delle molecole di acqua nel tessuto..

Il secondo scopo dello studio è verificare se polimorfismi genici a singolo nucleotide (SNP) associati con il rischio per queste patologie abbiano un effetto specifico e mediato dalla diagnosi sull'ADC ippocampale. Tali SNP sono i seguenti: CACNA1C *rs1006737* (G>A), *rs1625579* miR137 G>T, *rs4680* COMT G>A, *rs821616* DISC1 A>T, *rs1130233* AKT1 C>T, *rs12630592* GSK3B C>A, e *rs1144706* ZNF804A A>C.

Materiali e metodi:

È stato reclutato un campione di pazienti affetti da schizofrenia (n=31) e disturbo bipolare (n=16) e un campione di controlli sani (n=24). Per ciascun

soggetto reclutato nel campione è stato eseguito uno studio di Risonanza Magnetica cerebrale a tensore di diffusione (DTI), al fine di misurare l'ADC ippocampale. Sono stati inoltre genotipizzati i campioni salivari di pazienti e controlli, ricercando i sette SNPs candidati precedentemente associati a rischio genetico nello spettro bipolare-schizofrenico.

Risultati: È stato riscontrato un effetto significativo della diagnosi sull'ADC ippocampale (specialmente nell'emisfero sinistro) con un marcato aumento di quest'ultimo nei pazienti schizofrenici e bipolari rispetto ai controlli. Tra gli SNP analizzati, c'è stata una tendenza all'effetto del polimorfismo rs1625579 miR137 G>T sull'ADC ippocampale, tuttavia nessun gene ha dimostrato un effetto significativo dell'interazione genotipo* gruppo diagnostico.

Conclusioni: La schizofrenia e il disturbo bipolare sono caratterizzati da un'alterazione dell'ADC della formazione dell'ippocampo rispetto ai controlli sani. Il ruolo dei singoli polimorfismi e delle interazioni poligeniche nel determinare tali alterazioni non è ancora completamente compreso. Tuttavia, studi futuri chiariranno la natura di tali interazioni epistatiche e il loro ruolo nel determinare l'ADC della formazione dell'ippocampo, aprendo la strada a nuove possibili strategie di intervento terapeutico.

2. ABSTRACT

Assumptions of the study:

The most recent discoveries in the field of neuroscience highlight genetic, biological and anatomical alterations common to Schizophrenia and Bipolar Disorder. These evidences support the hypothesis of the Bipolar-Schizophrenic Spectrum, that is, the two pathologies would be the heterogeneous expression of a common pathological process. The existence of structural and functional alterations of the hippocampal formation, especially in the gray matter (volume) but also in the white matter (ADC, AF), partially shared by schizophrenic and bipolar disorders is a consolidated fact; however, it remains to be clarified whether these modifications can actually be considered an endophenotypic trait, as well as the genes and epistatic interactions that determine the variability between the different diagnostic groups belonging to the spectrum are not yet known.

Purpose of the study:

The present study aims first of all to ascertain the presence of an effect of the diagnosis on the hippocampal apparent diffusion coefficient (ADC), or to verify if there are differences between schizophrenic, bipolar and control patients.

The second purpose of the study is to verify whether some gene polymorphisms have an effect of the genotype and genotype * diagnosis interaction on hippocampal ADC.

These genes are as follows: rs1006737 CACNA1 G> A, rs1625579 miR137 G> T, rs4680 COMT G> A, rs821616 DISC1 A> T, rs1130233 AKT1 C> T, rs12630592 GSK3B C> A, and rs1144706 ZNF804A A.

Materials and methods:

A sample of patients with schizophrenia (n = 31) and bipolar disorder (n = 16) and a sample of healthy controls (n = 24) were recruited. A brain magnetic resonance imaging (MRI DTI) study was performed for each subject recruited in the sample, in order to measure total, left and right hippocampal ADC, Saliva samples from patients and controls were also analyzed, searching for seven SNPs associated in the literature with endophenotypic traits characteristic of the bipolar-schizophrenic spectrum.

Results: A significant effect of diagnosis was found on hippocampal ADC, especially in the left hemisphere, with a marked increase in the latter in schizophrenic and bipolar patients compared to controls. Among the SNPs analyzed, there was a tendency to the effect of polymorphism rs1625579 miR137 G>T on the hippocampal ADC, however no gene demonstrated a significant effect of the genotype* diagnostic group interaction.

Conclusions: Schizophrenia and bipolar disorder are characterized by an alteration of the ADC of hippocampal formation compared to healthy controls. The role of individual polymorphisms and polygenic interactions in determining such alterations is not yet fully understood.

However, future studies will clarify the nature of such epistatic interactions and their role in determining the ADC of hippocampal formation, paving the way for new possible therapeutic intervention strategies..

3. INTRODUZIONE

3.1 LO SPETTRO BIPOLARE SCHIZOFRENICO

Il concetto di *Spettro* (dal latino spectrum, deriv. Specere: guardare) trova origine in fisica come “un'apparente distinzione qualitativa derivante da un continuum quantitativo”, per es.: quando un fascio di luce bianca viene disperso da un prisma le parti che compongono il fascio si dispongono nell'ordine delle proprie lunghezze d'onda, ecco che quelle che vediamo sembrare entità singole sono in realtà parte di un Uno.(1)

Con questa analogia possiamo osservare i disturbi psichiatrici; patologie qualitativamente differenti per tipo di manifestazioni sintomatologiche ed intensità, possono essere intese come un continuum di varianti cliniche che sottendono processi neurobiologici comuni. Infatti, le più recenti scoperte nell'ambito delle neuroscienze mettono in risalto alterazioni genetiche, biologiche ed anatomiche comuni alla Schizofrenia e al Disturbo Bipolare. Tali evidenze sostengono l'ipotesi dello Spettro Bipolare-Schizofrenico, secondo cui le due patologie sarebbero espressione eterogenea di un comune processo patologico.

Sebbene questi dati siano recenti l'idea di spettro e continuum non lo sono; già Bleuler descrisse familiari di pazienti schizofrenici come “eccentrici e stravaganti” ma in assenza di evidenti psicosi, intuendo la possibile esistenza di una “schizofrenia latente” (2), fino a Meehl che formulò l'ipotesi della “schizotassia” ovvero un modello che presuppone l'esistenza di un determinante genico che causa un deficit diffuso di tipo neuronale (endofenotipo) che a sua volta può dare varie manifestazioni comportamentali, cognitive, affettive (esofenotipo). (3)

Epidemiologia ed ereditarietà crociata

Il confronto dei dati epidemiologici relativi a Schizofrenia e Disturbo Bipolare consente di osservare alcune interessanti corrispondenze. La prevalenza lifetime nella popolazione generale si attesta attorno all'1% (senza differenze significative nelle varie parti del globo), mentre l'ereditarietà risulta dell'80%; nella Germania del 1930 Kallmann osservò che il tasso di concordanza per schizofrenia tra i gemelli omozigoti è mediamente 86%, ma puntualizza tuttavia che se questi vengono separati il tasso scende a 77%, mentre per quelli che hanno sempre vissuto insieme sale al 95%. I due sessi presentano tassi di incidenza simile in entrambi i disturbi. Entrambe sono patologie croniche a decorso episodico che generalmente persistono per tutta la vita del paziente, l'età d'esordio è generalmente quella giovane-adulta e sono caratterizzate da un aumentato rischio suicidario. (4,5)

Gli studi condotti sui familiari dei pazienti dimostrano inoltre la presenza di un'ereditarietà crociata: i parenti di soggetti affetti da Schizofrenia o Disturbo Bipolare presentano un aumentato rischio di sviluppare sia il medesimo disturbo, sia gli altri appartenenti allo *spettro bipolare-schizofrenico*. (6)

Manifestazioni cliniche condivise

Schizofrenia e Disturbo Bipolare presentano manifestazioni cliniche caratteristiche diverse, tuttavia non possiedono alcun segno o sintomo patognomonico. Molto spesso le manifestazioni psicotiche e affettive sono presenti in entrambe le patologie e possono coesistere.

“L'impoverimento Ideo-Motorio” della Schizofrenia – abulia, povertà di pensiero, asocialità, rallentamento psico-motorio fino a catatonia (sintomi negativi) – possono infatti essere osservati durante le fasi depressive nel Disturbo Bipolare, mentre la dimensione della “Trasformazione della

Realtà” – deliri, allucinazioni, eloquio disorganizzato (sintomi positivi) – è compatibile con i quadri maniacali. (3) (7)

Il *Disturbo Schizo-affettivo* è attualmente collocato nello spettro schizofrenico e costituisce un vero e proprio ponte tra il capitolo dei disturbi psicotici e affettivi, come evidenziato dai relativi criteri diagnostici del DSM 5 (figura 1). (8)

DSM-5 criteria.

-
- A. An uninterrupted period of illness during which there is a Major Mood Episode (Major Depressive or Manic) concurrent with Criterion A of Schizophrenia.
Note: The Major Depressive Episode must include Criterion A1.
 - B. Depressed mood, Delusions or hallucinations for 2 or more weeks in the absence of a Major Mood Episode (Depressive or Manic) during the lifetime duration of the illness.
 - C. Symptoms that meet criteria for a Major Mood Episode are present for the majority of the total duration of the active and residual portions of the illness.
 - D. The disturbance is not attributable to the effects of a substance or another medical condition.

Specify whether:

Bipolar Type: This subtype applies if a Manic Episode is part of the presentation. Major Depressive Episodes may also occur.

Depressive Type: This subtype applies if only Major Depressive Episodes are part of the presentation.

With catatonia: This specifier, which applies to both 295.70 (F25.1) Schizoaffective Disorder, with prominent depressive symptoms, and 295.70 (F25.0)

Schizoaffective Disorder, with prominent Manic Symptoms, may be used to specify a current episode with at least three of the following: catalepsy, waxy flexibility, stupor, agitation, mutism, negativism, posturing, mannerisms, stereotypies, grimacing, echolalia, and echopraxia.

Figura 1 criteri diagnostici DSM5 per il disturbo Schizo-affettivo

Sebbene l'approccio categoriale del DSM5 sia indiscutibilmente utile nella pratica clinica, si dimostra imperfetto nell'inquadramento di situazioni ambigue ove le due categorie di sintomi coesistono nello stesso paziente.

I maggiori autori sostengono dunque la necessità di ridiscutere questa linea di demarcazione netta e di preferire un approccio *Dimensionale* alla diagnosi dei disturbi appartenenti allo Spettro Bipolare-Schizofrenico. (9)

Declino cognitivo

Diversi studi mettono in luce la presenza di un deficit neuro-cognitivo nei bipolari e, soprattutto, negli schizofrenici, il quale correla con la presenza di sintomi psicotici.

La severità del deficit sembra esprimersi secondo una modalità continua nei disturbi appartenenti allo spettro, risultando massima nei soggetti con Schizofrenia grave e decrescendo fino ad annullarsi via via che i sintomi dell'umore si fanno più importanti rispetto a quelli psicotici.

Nei pazienti schizofrenici, tale deficit è generalmente presente all'esordio di malattia e rimane stabile nel tempo: non viene modificato dallo stadio clinico, oltre che dal trattamento, costituendo un'importante causa di disabilità funzionale per i soggetti in questione.

I pazienti bipolari dimostrano in linea di massima una minore presenza di alterazione cognitiva, che, comunque, risulta di entità inferiore rispetto a quella degli schizofrenici. Tale deficit rappresenta anche in questo caso una caratteristica di tratto che non correla con lo stato di attività della malattia, inoltre è sicuramente più rappresentato e importante nel Disturbo Bipolare I rispetto al II e nelle forme psicotiche rispetto a quelle non psicotiche (10)

Gestione terapeutica

Le attuali strategie utilizzate nel trattamento dei disturbi dello spettro Bipolare-Schizofrenico rispecchiano quelle che sono le caratteristiche cliniche precedentemente descritte: nella maggioranza dei casi ai pazienti vengono prescritte delle poli-terapie che comprendono anti-psicotici, stabilizzatori dell'umore e talvolta anti-depressivi.

L'efficacia della combinazione di farmaci appartenenti a diverse classi nel caso di questo gruppo di disturbi è sostenuta, oltre che dalle evidenze, anche dalla prassi clinica. Naturalmente l'una o l'altra classe acquisisce una maggiore o minore

importanza rispetto alle manifestazioni cliniche e alla diagnosi specifica del paziente.

Le strategie farmacologiche attualmente utilizzate rafforzano quindi ulteriormente la necessità di teorizzare uno spettro che abbracci la sovrapposizione fra disturbi psicotici e affettivi (11)

Attuale classificazione DSM

Alla luce di tali scoperte, la dicotomia kraepeliniana che contrapponeva *Dementia Praecox* e *Psicosi Maniaco-Depressiva* (fondamento dei principali sistemi diagnostici *Categoriali* utilizzati oggi) si sta lentamente indebolendo lasciando spazio a modelli interpretativi di tipo *Dimensionale*, che tengono in considerazione la continuità e le intersezioni eziopatogenetiche esistenti tra i disturbi di tipo psicotico ed affettivo.

Il DSM-5 (Manuale Diagnostico Statistico dei Disturbi Mentali) tuttavia rimane, nella sua quinta e più recente edizione, aderente alla tradizionale separazione nosologica fra i disturbi con manifestazioni prevalentemente psicotiche e affettive. (12)

3.2 GENI DI SUSCETTIBILITA' NELLO SPETTRO BIPOLARE-SCHIZOFRENICO

Gli studi genetici dimostrano una suscettibilità condivisa fra i disturbi dello spettro, i quali si manifestano nell'una o nell'altra variante clinica secondo il *modello poligenico a soglie multiple* proposto da Kelsoe (figura 2). Tale modello fa corrispondere alle diverse manifestazioni fenotipiche il raggiungimento di una soglia (threshold) secondo una modalità poligenica di trasmissione di un tratto quantitativo. Ogni soglia è determinata dalla variabilità allelica, dalla presenza di diverse mutazioni possibili per ciascun gene, dalla combinazione dell'effetto di geni diversi e dall'esposizione a fattori ambientali.(13)

J.R. Kelsoe / Journal of Affective Disorders 73 (2003) 183-197

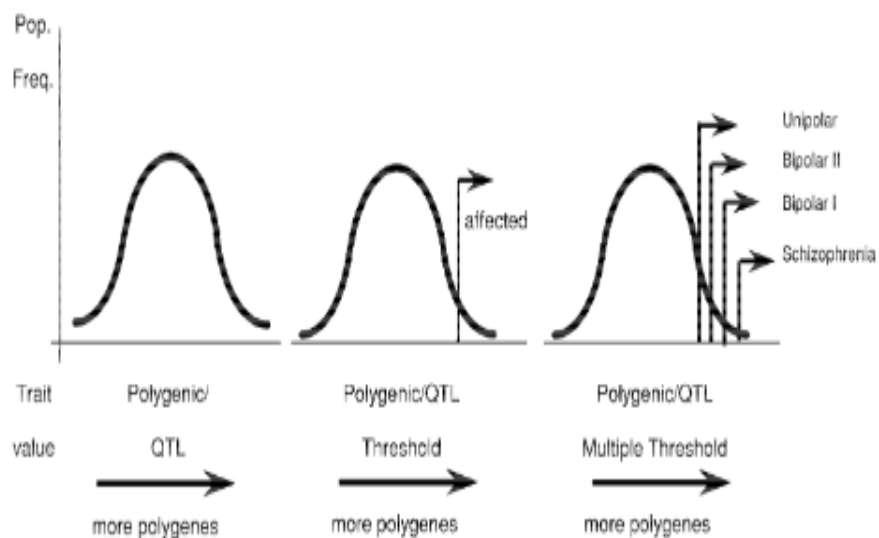


Figura 2. Modelli di tratto quantitativo. Il primo grafico a partire da sinistra rappresenta il modello poligenico puro, il secondo rappresenta il modello poligenico ad una soglia e l'ultimo rappresenta il modello poligenico a soglie multiple.

Numerosi loci sono stati studiati nel tentativo di identificare i geni di suscettibilità più rappresentati nei disturbi appartenenti allo spettro.

Si è visto che ciascun disturbo è associato a particolari polimorfismi caratteristici e che esistono d'altro canto dei geni di suscettibilità condivisi; questi ultimi rappresenterebbero il substrato genetico dello spettro Bipolare-Schizofrenico.

Gene/locus	Evidenza nella schizofrenia	Evidenza nel disturbo bipolare
Disbindina	+++++	
Neuregulina 1	++++	+
DISC 1	+++	+
RGS4	++	
COMT	+	+
DAOA(G72)	++	++
BDNF		++
DAO	++	

Più simboli + indicano un'evidenza maggiore.

Tabella 1. Peso dell'evidenza a supporto di diversi geni candidati implicati nella patogenesi della schizofrenia e del disturbo bipolare.

In particolare, il gene DAOA(G72) è stato ripetutamente riscontrato come gene di suscettibilità allo sviluppo di entrambi i disturbi; altri geni candidati sono NRG1 (neuregulina 1), DISC1 (proteina disrupted in schizofrenia 1) e COMT (catecol-O-metiltrasferasi).(14)

Sono inoltre stati identificati alcuni polimorfismi che correlano significativamente con specifiche alterazioni neuropatologiche, neurocognitive, emotive, neurofisiologiche e neurobiologiche, delineando diversi sottogruppi di pazienti all'interno dello spettro bipolare-schizofrenico. In questo modo è stato possibile identificare gli *endofenotipi*: indicatori biologici forti, e quantitativamente misurabili, di sottogruppi diversi di pazienti con caratteristiche simili; essi rendono più facilmente indagabile la componente ereditaria della malattia.(15)

Grazie agli studi di *Genome Wide Association* (GWAS) è stato possibile studiare numerosi polimorfismi che determinano un certo effetto endofenotipico nei pazienti dello spettro bipolare-schizofrenico. (16) Tali SNP sono i seguenti: CACNA1C *rs1006737* (G>A), *rs1625579* miR137 G>T, *rs4680* COMT G>A, *rs821616* DISC1 A>T, *rs1130233* AKT1 C>T,

rs12630592 GSK3B C>A, e rs1144706 ZNF804A A>C. Di seguito una tabella riassuntiva di tali geni , che determinano effetti endofenotipici caratteristici e peso delle associazioni in letteratura (tabella 1).

chr	GENE	SNP	SPECTRUM (0-2 pts)	FRONTAL CORTEX (0-2 pts)	HIPPO (0-2 pts)	WM alteration (0-2 pts)	MC test (0-1 pts)	clinic (0-1 pts)	suicidality (0-0.25 pts)	TOTAL SCORE
12p13.3	CACNA1C	rs1006737	2	2	2	2	1	1	0.25	10.25
		rs4785905	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	4.5
		rs1024582	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	4.5
10p12	CACNB2	rs882194	1 (SCZ ^h)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	3.5
		rs2799573	2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	4.5
		rs17691888	1 (SCZ)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	3.5
1p21.13	miR137	1.5 (SCZ, psychotic mood dis)	1	1	1	1	1	0	6.5	
22q11.22-23	COMT	rs4680	2	1	2	1	1	1	0.25	8.25
		rs2097603	2	0.5	2	1	1	1	0.25	7.75
1q42.1	DISC1	rs821616	2	2	2	2	1	0.5	0	9.5
		HEP3 haplotype (rs3738401 + rs751229)	2	0.5	1	0.5	1	1	0	6
14q32.32	AKT1	rs10495310 (4LD rs2022091)	2	0.5	1	0.5	0.5	0.5	0	5
		rs82158	1 (SCZ)	0.5	1	1	0.5	0.5	0	5
3q13.3	GSK3B	rs1130233	2	0.5	2	0.5	1	0.5	0	6.5
		rs12630592 (4LD rs6438552)	2	0.5	2	0.5	0.5	1	0	6.5
		rs6438552	1 (BPD, MDD)	0.5	2	0.5	0.5	1	0	5.5

LEGENDA	LEGENDA	LEGENDA	LEGENDA	LEGENDA	LEGENDA
0 → no association	0 → no association	0 → no association	0 → no association	0 → no association	0 → no association/no data
0.5 → no data	0.5 → no data	0.5 → no data	0.5 → no data/GM alteration	0.5 → no data	0.25 → clear association
1 → single association, other associations	1 → controversial association	1 → temporal/lobe, proximal areas, controversial association	1 → controversial WM association	1 → association	1 → association
1.5 → psychosis	2 → clear association	2 → clear association	1.5 → WM volumetric data	2 → WM DTI data	
2 → clear association					

Tabella 1 peso in letteratura dell'associazione fra SNPs ed endofenotipi caratteristici dello spettro bipolare schizofrenico

CACNAC

CACNA1C (12p13.3) codifica per la subunità alpha 1c del canale del calcio voltaggio dipendente di tipo L. Questo genere di canale è costituito da quattro subunità, media l'entrata del calcio nella cellula durante la fase di depolarizzazione del potenziale d'azione ed è inibito dalla diidropiridina.

Considerando soggetti schizofrenici e bipolari, il polimorfismo rs1006737 porta ad anormale attivazione ippocampale e della corteccia cingolata perigenuale anteriore (pgACC) durante il richiamo della memoria episodica, e questo rappresenta il tipico deficit neurocognitivo presente nelle due categorie di pazienti. Questo risultato avvala l'ipotesi di meccanismi fisiopatologici condivisi tra disturbo bipolare e schizofrenico; un altro dato interessante è che tale polimorfismo è riscontrato anche nel disturbo depressivo maggiore. (17)

Il polimorfismo rs1006737 è stato associato in vari studi di neuroimaging ad alterazioni dei volumi cerebrali localizzate. Nello specifico, si è osservata una riduzione della materia grigia a livello del putamen sinistro nei pazienti con disturbo bipolare e schizofrenia, mentre i controlli presentano un trend opposto. Un aumento volumetrico della sostanza grigia è stato inoltre riscontrato nei pazienti bipolari e controlli a livello dell'amigdala e ippocampo destro. (18)

L'isoforma CACNB2 (10p12) codifica per la subunità beta 2 del canale del calcio voltaggio dipendente di tipo L. Il polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) rs2799573 sembra avere effetto pleiotropico nella psicopatologia dei disturbi dello spettro bipolare-schizofrenico, oltre che nella depressione maggiore unipolare, nei disordini dello spettro autistico e nell'ADHD (Attention Deficit – Hyperactivity Disorder).

Mutazioni a carico di questo gene si associano anche a malattie cardiache, come la sindrome di Brugada. La subunità beta 2 costituisce inoltre un target antigenico nella sindrome miastenica di Lamber Eaton, una patologia

su base autoimmune. Tale evidenza potrebbe aiutarci a comprendere le comorbidità di cui sono affetti i pazienti psichiatrici (così come anche il ruolo dei miRNA, esposti successivamente).

COMT

COMT (Catecol-O-Metil Transferasi, 22q11.22-23) è un enzima coinvolto in una delle principali pathway di degradazione delle catecolammine, in quanto catalizza il trasferimento di un gruppo metile dalla S-adenosilmetionina a dopamina, adrenalina e noradrenalina. Oltre a rivestire un ruolo fondamentale nel metabolismo dei neurotrasmettitori endogeni, essa è coinvolta nella metabolizzazione dei farmaci simpatico-mimetici, impiegati nel trattamento dell'ipertensione, dell'asma e del morbo di Parkinson. L'enzima si trova in una forma solubile (S-COMT) e in una forma legata alla membrana plasmatica (MB-COMT), distinte per la loro porzione N-terminale. A seconda dei promotori e dei siti di iniziazione utilizzati sono possibili diverse varianti trascrizionali.

I polimorfismi rs4680 e rs2097603 sono stati riscontrati frequentemente in pazienti con Schizofrenia, Disturbo Bipolare e Disturbo Depressivo Maggiore. Essi correlano con variazioni strutturali e funzionali bilaterali a livello ippocampale, quali: riduzione del volume sostanza grigia, alterato processamento dello stimolo emozionale, maggiore suscettibilità ad episodi psicotici.

Le alterazioni anatomiche e funzionali a livello dell'ippocampo si associano inoltre, sul piano neuropsicologico, ad un deficit cognitivo relativo a QI, fluency verbale e memoria di lavoro, oltre che a errori perseverativi nel WCST (Wisconsin Card Sorting Test).(19)

DISC1

Il gene DISC1 (1q42.1) codifica per la proteina *Disrupted in Schizofrenia1*, cui struttura biochimica presenta multipli domini coiled coil. È localizzata nel citoplasma, nel nucleo e nel mitocondrio. La funzione di DISC1 è legata alla crescita neuritica e allo sviluppo corticale. Agisce in concerto con altre proteine (NUDEL, ATF4, ATF5, NRG1, PCM1, AKT1, DTNBP1).

La traslocazione t (1;11) è stata associata a Schizofrenia, Disturbo Schizoaffettivo, Disturbo Bipolare e Depressione Maggiore(20)(21) e sono stati identificati diversi SNP (di cui i principali sono rs821616 – Ser704Cys – e rs6675281 – Leu607Phe) che correlano con riduzione dei volumi cerebrali più o meno localizzate. A seconda dei polimorfismi coinvolti tale riduzione può essere generica oppure più specificatamente possono essere coinvolti l'ippocampo, il talamo, la corteccia temporale.(22)

Ser704Cys è stato associato ad un ridotto volume della materia grigia ippocampale e alterata attivazione dell'ippocampo durante l'esecuzione di task cognitivi.

E' stata inoltre evidenziata, nei soggetti sani omozigoti, una maggiore attivazione della corteccia prefrontale (PFC) soprattutto sinistra durante i test che valutano la fluency verbale, rispetto ai controlli; ciò si può interpretare come manifestazione di un'inefficienza della funzione prefrontale, che richiede un'attivazione corticale maggiore per raggiungere un certo output comportamentale.(23)

Un recente studio giapponese ha evidenziato che i soggetti sani omozigoti per Ser704 presentano, rispetto ai portatori di Cys704, un ridotto volume del giro frontale mediale superiore e un aumentato volume della corteccia insulare; i soggetti con schizofrenia omozigoti per Ser704 presentano invece un maggior volume del giro sopra-marginale rispetto ai portatori di Cys704.(24)

AKT1

AKT1 (14q32.32) codifica per una serina-treonina chinasi che viene attivata in modo rapido e specifico dal PDGF, per mezzo della fosfatidilinositolo-3-chinasi. Durante lo sviluppo neuronale questa chinasi è coinvolta nella pathway di sopravvivenza cellulare attivata dal Growth Factor (GF), oltre che in altre cascate relative alla crescita e differenziazione cellulare e nella plasticità sinaptica. I fattori di sopravvivenza possono bloccare l'apoptosi grazie all'attivazione di AKT1, che provvede a fosforilare e inattivare molteplici componenti del macchinario apoptotico.

Studi riportano che il polimorfismo (rs1130233) AKT1 è associato ad una riduzione della materia grigia a livello del lobo temporale mediale (MTL) e ad un deficit neurocognitivo per quanto riguarda la funzione di memoria (25)

AKT1 fa parte della pathway cAMP-indipendente del recettore della dopamina D2 e si è osservato che l'interazione tra AKT1 rs1130233 e DRD2 rs1076560 determina una ridotta fosforilazione di AKT1, che a sua volta fosforila (e inattiva) in misura minore GSK3B. Tale pathway sembra essere coinvolta nei deficit attentivi tipici della schizofrenia: l'associazione dei suddetti SNPs si associa nei soggetti sani ad una ridotta attivazione della corteccia cingolata e accuratezza comportamentale durante i test di controllo e mantenimento dell'attenzione; d'altro canto, il medesimo genotipo è stato associato, nei pazienti schizofrenici in trattamento, ad una maggior risposta dei sintomi negativi e positivi all'Olanzapina. (26)

GSK3B

GSK3B (3q13.3) codifica per la *Glicogeno Sintasi Kinasi 3B*, una proteina con attività serina-treonina chinasica coinvolta nel metabolismo, nello sviluppo neuronale e nello sviluppo corporeo. Alcuni fra i più importanti geni di suscettibilità per la Schizofrenia, tra cui DISC1, NRG1 e disbindina convergono su GSK3B.(27)(28)(29)(30)

GSK3B ha un ruolo nel mediare le performances cognitive – in particolare quelle riguardanti la memoria spaziale – in numerosi disturbi neurodegenerativi e neuro-psichiatrici, quali il morbo di Alzheimer ed il morbo di Parkinson.(31)(32) Tale gene è stato associato a peggiori performances cognitive anche in patologie quali il diabete mellito (33), la sindrome dell'X-fragile(34) e infezione da HIV(35).

L'associazione di GSK3B con l'alterazione delle funzioni cognitive si spiega con la disregolazione dei ritmi oscillatori neuronali a livello della corteccia pre-frontale e dell'ippocampo, aree implicate nella memoria di lavoro. (36) rRs12630592 e rs6438552 correlano con il Disturbo Depressivo Maggiore, oltre che con il Disturbo Bipolare e – soltanto il primo dei due – con la Schizofrenia. (37) Questi polimorfismi hanno dimostrato una significativa associazione con la riduzione del volume di materia grigia a livello di ippocampo destro e giro temporale superiore bilaterale. (38)(39)

ZNF804A

Il polimorfismo rs1344706 del gene ZNF804A è stato identificato da studi di genome-wide association (GWAS) quale possibile fattore di rischio per lo sviluppo di schizofrenia e disturbo bipolare; esso infatti determina una minore presenza dell'mRNA di ZNF804A sia nel cervello fetale che nel cervello di pazienti affetti da schizofrenia;(40) ZNF804A e l'omologo murino Zfp804a codificano per una proteina di 1210 amminoacidi che presenta un dominio C2H2, caratteristico della famiglia delle zinc-finger proteins, la cui funzione è legare il DNA modulando la trascrizione genica. (41)

Studi di knockdown genico eseguiti su cellule hNPCs – human neural progenitor cells – hanno evidenziato la presenza di una correlazione fra il silenziamento di ZNF804a e alterazioni che riguardano l'adesione cellulare, lo sviluppo del neurite e delle sinapsi e il signaling citochinico; tali alterazioni si accompagnano ad una ridotta espressione di NLGN4 (neuroglin-4), la cui trascrizione sembra quindi essere modulata dalla zinc-finger protein ZNF804A.

Altre ricerche, condotte su modelli murini, hanno evidenziato come una ridotta espressione di Zfp804a, dovuta alla presenza di rs1344706, determini una riduzione della densità delle spine dendritiche a livello di neuroni maturi; ciò si manifesta con una ridotta risposta alla stimolazione attività-dipendente. (42)

ZNF804A ha quindi un ruolo attivo nello sviluppo del neurite, oltre che nel mantenimento delle spine dendritiche e nella plasticità attività dipendente dei neuroni maturi. Esso rappresenta un potenziale meccanismo biologico alla base della riduzione dell'arborizzazione e della densità delle spine dendritiche nei pazienti schizofrenici che presentano l'allele di rischio rs1344706.(43)

Soggetti sani omozigoti per l'allele di rischio rs1344706 presentano un aumentato volume totale della sostanza bianca(44) e un ridotto spessore della sostanza grigia a livello del giro temporale superiore e della corteccia cingolata anteriore e posteriore, nonché un ridotto controllo dell'attenzione.(45)

ZNF804A rs1344706 agirebbe dunque da fattore di rischio per la schizofrenia determinando un aumento generale del volume della sostanza bianca e una riduzione dello spessore della sostanza grigia in specifiche strutture cerebrali.

Gli studi di neuroimaging funzionale dimostrano inoltre che rs1344706 influenza le performances di memoria di lavoro durante l'esecuzione del N-back task, determinando alterazioni della connettività fra aree cerebrali spesso associate a tali deficit: si osserva una ridotta connettività interemisferica fra DLPFC (corteccia prefrontale dorso laterale) destra e sinistra e un'aumentata connettività fra la DLPFC destra e la formazione ippocampale (HF);(46,47) è stata inoltre osservata, negli omozigoti per l'allele di rischio (AA) una ridotta connettività fra la corteccia cingolata posteriore (PCC) e la formazione ippocampale (HF).(48)

Ulteriore riscontro relativo a ZNF804A rs1344706 è che influenza positivamente la risposta agli antipsicotici atipici in pazienti trattati per il primo episodio di schizofrenia; tali risultati dimostrano che questo polimorfismo non solo influenza lo sviluppo di schizofrenia, bensì costituisce un fattore predittivo positivo di risposta alle terapie, rappresentando un potenziale target per lo sviluppo di nuove strategie d'intervento.(49)

miRNA

I miRNA (o microRNA) sono piccole sequenze nucleotidiche a RNA non-codificanti, il loro ruolo biologico è di silenziatori post-trascrizionali, appaiandosi a sequenze di mRNA ne impediscono la traduzione in proteine; MIRNA137 è altamente espresso nel SNC a livello della corteccia dorsolaterale, del giro dentato, dell'ippocampo(50,51) e la sua funzione è di sinaptogenesi, di regolatore della lunghezza e densità delle spine dendritiche, infine dunque, di maturazione neuronale. l'espressione di mirna137 aumenta durante lo sviluppo e la differenziazione neuronale, la sua concentrazione risulta maggiore di cento volte nel cervello adulto rispetto a quello embrionale, ciò è comprovato anche da studi su modelli murini. Nel caso specifico dello spettro bipolare schizofrenico, recenti genome-wide association (GWAS) hanno portato evidenze che suggeriscono che il polimorfismo *rs1625579* è statisticamente associato a Schizofrenia ed altri disturbi psichiatrici (16,52), potendo essere inserito nell'elenco dei 108 loci genici di suscettibilità alla schizofrenia(53)(54,55); a conferma di ciò mirna137 è stato trovato disregolato in studi anatomopatologici post mortem di pazienti schizofrenici.(56)(57)(58) Gli studi di neuroimaging associano inoltre l'omozigosi per *rs1625579* ad un ridotto volume cerebrale totale e un aumentato volume dei ventricoli laterali. (59)

Altri studi hanno osservato un'alterata architettura (figura 3), nonch'è connettività della corteccia prefrontale dorso laterale (DLPFC) con la

formazione ippocampale nei soggetti sani e nei pazienti schizofrenici omozigoti per l'allele di rischio.(60)

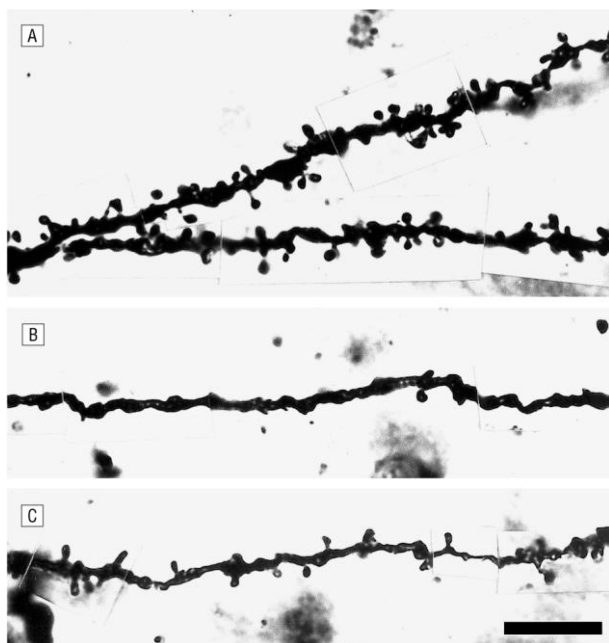


Figura 3 spine dendritiche della regione DLPFC . A) soggetto sano . B) e C) Soggetto schizofrenico e bipolare

L'omozigosi per l'allele di rischio è stata inoltre associata ad un'aumentata connettività funzionale a livello di amigdala, corteccia cingolata e giro frontale inferiore. Nonch'è uno studio di 611 pazienti nella popolazione di Han ha messo in luce ridotte capacità di working memory, funzione deficitaria nella schizofrenia, nei soggetti omozigoti per tale polimorfismo rispetto agli eterozigoti. (61)

Questa molecola risulta interessante poiché ha la capacità di mettere a tacere molti geni contemporaneamente(62). Alcune linee di evidenza mostrano che gli individui affetti da disturbi mentali, in particolare schizofrenia, mostravano un'espressione alterata di MIR137 così come i suoi geni bersaglio(55). MiRNA-137 è noto per regolare l'espressione di ca. 1900 altri geni inclusi diversi geni associati a schizofrenia, dove rappresenterebbe un hub per la regolazione dei geni di rischio, tra questi: CSMD1, CACNA1C, ZNF804A, ERBB4, GSK3B (16)(63)(64).

La disregolazione di un solo miRNA può avere un significativo effetto poligenico, dunque un suo malfunzionamento ha effetti pleiotropici per quanto riguarda l'omeostasi cellulare; supportando il modello eziopatogenetico multifattoriale a soglie multiple nello spettro bipolare schizofrenico.

Tali miRNA non sono presenti esclusivamente a livello SNC ma si ritrovano anche costitutivamente espressi nell'epitelio colico ed hanno un ruolo nella patogenesi del CRC (65), inoltre sono disregolati in patologie di tipo autoimmunitario (66) suggerendo una sottofondo comune a tante comorbidità clinicamente compresenti nel paziente bipolare- schizofrenico.

3.3 LA FORMAZIONE IPOCAMPALE

Morfologia e istologia

La formazione ippocampale è una struttura ancestrale appartenente al sistema limbico. Durante la morfogenesi questa struttura si ripiega su stessa andando a collocare nella porzione mesiale del lobo temporale. È dunque una regione neuroanatomica pari e simmetrica, presente in entrambi gli emisferi e comprende diverse parti: l'ippocampo propriamente detto, il giro dentato, e il subiculum. Alcuni autori considerano una porzione del giro paraippocampale (in continuità con l'ippocampo), detta Corteccia Entorinale (EC), come parte della Formazione(67) per via delle connessioni che questa ha con l'ippocampo, altri AA la distaccano concettualmente per via della differenza istologica della corteccia(68). Infatti la EC presenta neocorteccia/isocorteccia (ovvero sei strati cellulari); questo tipo di corteccia è filogeneticamente più recente e compone circa il 90% di tutta la corteccia cerebrale; La EC continua gradualmente con la mesocorteccia del subiculum (cinque strati), che a sua volta prosegue con l'allocorteccia (tre strati) del Giro dentato e dell'ippocampo (o corno d'ammone) (69) .

Pertanto, osservando la superficie mediale dell'encefalo, l'ippocampo è ripiegato e situato internamente al giro paraippocampale, con cui è in continuità. (figura 4)

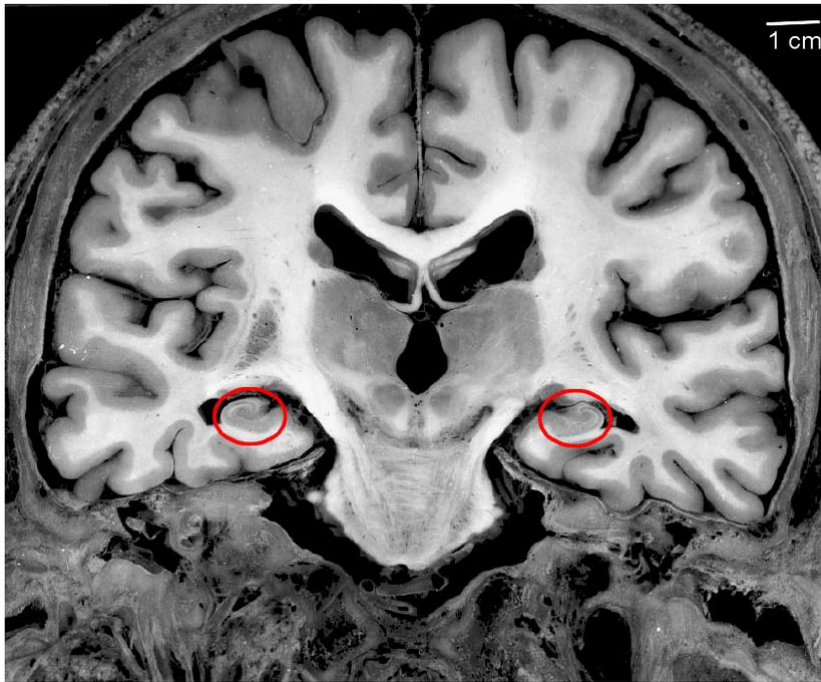


Figura 4 sezione coronale alla TC , ippocampo cerchiato in rosso

Circuiti sinaptici

Osservando la sezione coronale dell'ippocampo si possono identificare diversi settori del corno di ammore (CA): CA1, CA2 e CA3; il settore CA4 è considerato parte del giro dentato. A livello di CA1 sono localizzati i neuroni piramidali, nel settore CA2 decorrono assoni e nel settore CA3 si collocano neuroni piramidali di piccole dimensioni e le fibre muscoidi che originano dal giro dentato; la zona CA4 infine si caratterizza per la presenza di cellule piramidali di dimensioni maggiori rispetto a quelle che si trovano in CA1 (figura 5) (70).

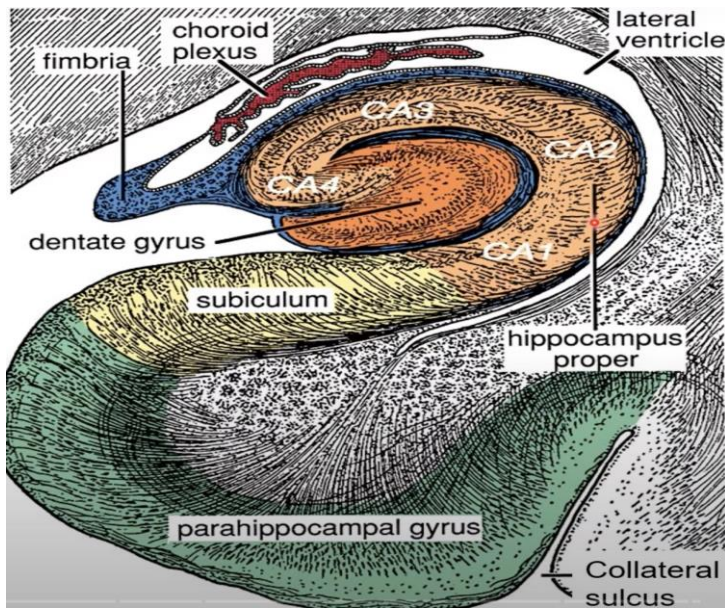


Figura 5 rappresentazione schematica della formazione ippocampale

L'ippocampo riceve afferenze provenienti da molte aree multimodali corticali (71). Queste vengono filtrate dalla EC, prima stazione di relay, successivamente convogliate direttamente al giro dentato percorrendo trasversalmente il subiculum, tale via è detta, appunto, via perforante. Dal giro dentato una serie di fibre muscoidi traggono sinapsi con i neuroni piramidali di CA3, da cui originano collaterali di Schaffer verso CA1, da qui di nuovo al subiculum e EC. Sebbene non sia l'unico esistente, tale circuito è il maggior circuito ippocampale(69).

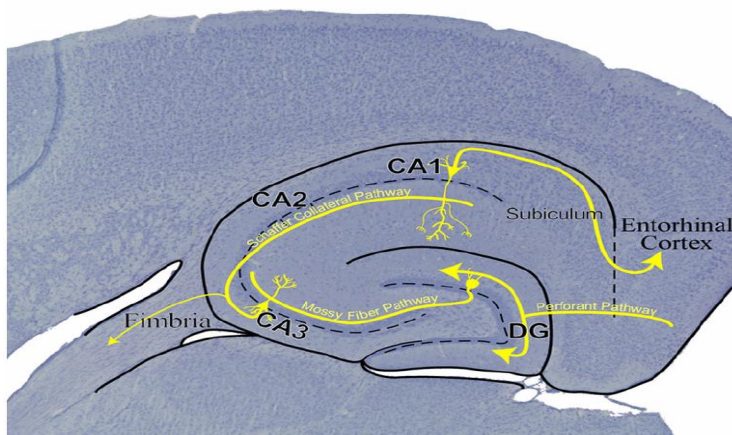


Figura 6 preparato anatomico istologico, evidenziato il circuito trisinaptico.(72)

Le efferenze si dirigono sia alla EC, sia al fornice, una struttura di forma arcuata, costituita da sostanza bianca, che si estende dalla formazione ippocampale al diencefalo e all'area settale. Le fibre che costituiscono questa struttura originano a livello dell'alveo, uno strato di sostanza bianca sulla superficie ventrale dell'ippocampo che contiene fibre provenienti da ippocampo e giro dentato, le quali si portano inferiormente allo splenio del corpo calloso per poi piegare anteriormente e decorrere superiormente al talamo, formando le gambe del fornice. Le gambe del fornice sono interconnesse mediante alcune fibre che ne costituiscono la commissura. Le fibre che decorrono nel fornice terminano a livello dei corpi mammillari dell'ipotalamo, oltre che nell'area settale e nel talamo anteriore. (figura 7)

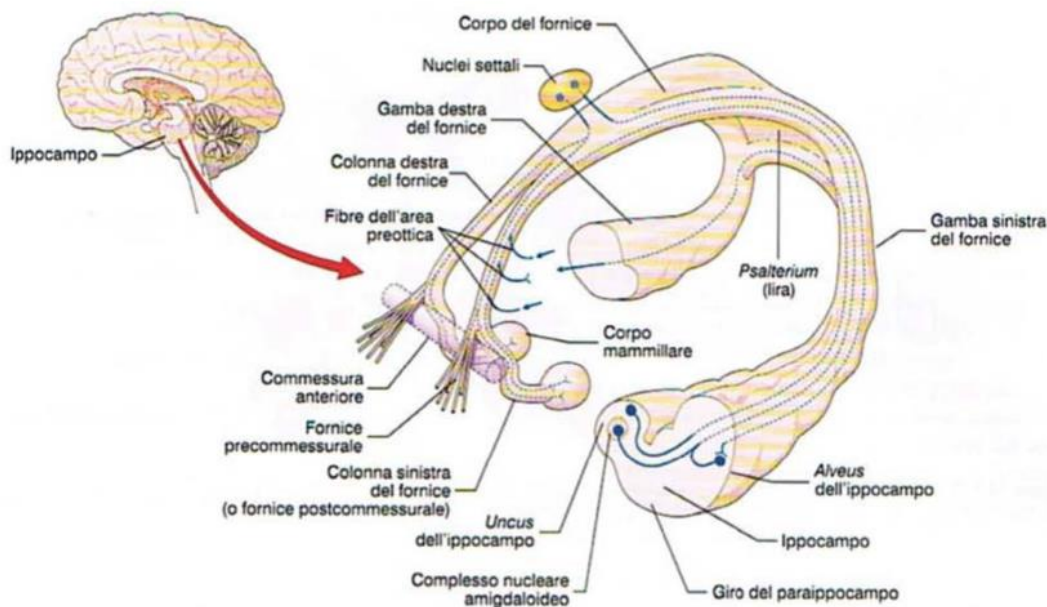


Figura 7 rapporti tra ippocampo, fornice ed altre strutture limbiche (73)

Funzioni della formazione ippocampale

La formazione ippocampale presenta varie funzioni, che vengono espletate specificamente dalle diverse strutture che la costituiscono.

Il giro dentato è di fondamentale importanza nell'ambito della neurogenesi relativa alla memoria e all'orientamento spaziale; tale forma di memoria consente di codificare, immagazzinare e recuperare informazioni riguardanti la posizione nello spazio e i percorsi. (74)

A livello di questa struttura è presente inoltre una fisiologica asimmetria funzionale e strutturale che distingue l'ippocampo destro e sinistro. (75)

L'ippocampo sinistro può essere diviso, dal punto di vista neurofuzionale in tre aree: il segmento ventrale, o anteriore, è deputato al processamento delle emozioni, alla risposta allo stress, all'affettività e presenta connessioni con l'amigdala e il giro ippocampale; il secondo regola le funzioni cognitive ed è connesso alla corteccia cingolata anteriore e al giro frontale anteriore; infine il segmento posteriore ha funzione percettiva e presenta connessioni strutturali con il lobo occipitale oltre che funzionali con il precuneo e il giro angolare.

La segmentazione dell'ippocampo destro risulta invece più complessa e ambigua. (76)

Ruolo nello spettro bipolare schizofrenico

Le evidenze neuropsicologiche dimostrano chiaramente la presenza di alterazioni cognitive specifiche nei pazienti schizofrenici. Tali alterazioni si manifestano a carico della velocità di elaborazione, della memoria di lavoro e soprattutto della memoria dichiarativa verbale e visiva. McKenna e colleghi avrebbero addirittura suggerito l'idea di una "amnesia schizofrenica" (77)

In particolare sono state ripetutamente riscontrate nei pazienti schizofrenici delle performance inferiori alla norma nei test di rievocazione(78), oltre che una ridotta capacità di inferenza, ovvero una compromissione dell'uso flessibile delle conoscenze apprese.

Le alterazioni anatomiche riscontrate a livello della formazione ippocampale dei pazienti schizofrenici comprendono: una riduzione volumetrica, una maggior perfusione basale, una minore attivazione durante i test che valutano la memoria dichiarativa (forse dovuta ad un'iperattività basale) e un'alterazione della neurogenesi del giro dentato che comporta una minor stimolazione della regione CA3 dell'ippocampo da parte delle fibre muscoidi.(79)

Studi molecolari post mortem rilevano alterazioni delle sinapsi glutammatergiche a livello del giro dentato, che è posto all'inizio della via trisinaptica, e delle fibre muscoidi, le quali connettono le cellule dei granuli del giro dentato alle cellule piramidali della regione CA3 dell'ippocampo.

Tamminga e colleghi hanno proposto un modello di disfunzione ippocampale nella schizofrenia, secondo cui queste modificazioni sinaptiche concorrono allo sviluppo di psicosi.

Più precisamente, le alterazioni della trasmissione sinaptica a livello della via delle fibre muscoidi inficiano i processi di plasticità della regione CA3 dell'ippocampo; la riduzione della trasmissione proveniente dalle fibre

muscoidi potrebbe essere alla base della riduzione della funzione di *pattern separation* (funzione del giro dentato che permette di codificare nuove informazioni e di mantenere due ricordi simili separati), e causare un'iperattività basale della regione CA3 che risulta in una maggiore funzione di *pattern completion* (funzione della regione CA3 che permette di completare nella memoria rappresentazioni di eventi e situazioni a partire da frammenti di ricordi). Dunque l'iperfunzione della regione CA3 potrebbe favorire associazioni di tipo delirante e la creazione di ricordi di tipo allucinatorio.(79)

Gli studi di neuroimaging, neuropatologici post-mortem e neurocognitivi suggeriscono l'importanza cruciale della formazione ippocampale anche per quanto riguarda la fisiopatologia del disturbo bipolare. Dal punto di vista neuropsicologico si rileva una significativa compromissione della memoria dichiarativa che compare precocemente e non regredisce del tutto durante le fasi di remissione della sintomatologia maniacale o depressiva, nè con l'utilizzo della terapia farmacologica, rendendo questo reperto quasi a sè stante rispetto alle turbe dell'umore. La persistenza del deficit cognitivo durante le fasi di eutimia rafforza l'ipotesi di una compromissione ippocampale come base di questa caratteristica. Gli studi post-mortem dimostrano un'alterazione morfologica dei neuroni piramidali CA3 associata ad una generale riduzione del numero dei neuroni ippocampali; tali alterazioni sembrano essere dovute a una compromissione della trasmissione sinaptica GABAergica e glutammaergica a livello dell'ippocampo.(80)

La riduzione che si osserva a livello del volume ippocampale correla positivamente con le peggiori performance dei pazienti bipolari nei test di memoria.

Questi risultati permettono quindi di localizzare il deficit di memoria a livello della formazione ippocampale, la cui entità di riduzione volumetrica determina l'entità del deficit neurocognitivo.(81)

3.4 RISONANZA MAGNETICA STRUTTURALE

Per quanto riguarda lo studio delle alterazioni neuroanatomiche comuni ai disturbi psicotici, il metodo ritenuto attualmente più completo consiste nella valutazione combinata di distinte tecniche di risonanza magnetica. Lo studio di neuroimaging multimodale permette infatti di rilevare eventuali alterazioni strutturali della sostanza grigia (quali una riduzione volumetrica delle regioni di interesse o una riduzione dello spessore corticale) mediante le tecniche volumetriche di risonanza magnetica e alterazioni microstrutturali delle fibre della sostanza bianca mediante studi di DTI (*Diffusion Tensor Imaging*), consentendo di studiare i rapporti tra le due; l'eventuale integrazione con dati ottenuti grazie a metodiche di imaging funzionale può offrire ulteriori elementi chiarificatori sugli eventuali processi determinanti la fisiopatologia, l'espressività clinica e l'evoluitività di tali patologie.(82)

Diffusor Tensor Imaging e Fractional Anisotropy

La *Diffusor Tensor Imaging* (DTI) è una tecnica di risonanza magnetica che utilizza il grado di diffusione dell'acqua per acquisire le immagini, misurandone l'anisotropia o mancanza di essa(83). Considerando un'unità di volume senza impedimenti fisici, i movimenti delle molecole d'acqua avvengono con uguale probabilità in tutte le direzioni, questa diffusione viene detta isotropa; tali spostamenti possono essere anche anisotropi: questo avviene nelle strutture anatomiche omogenee dove impedimenti fisici fanno sì che i movimenti dell'acqua presentino una precisa direzionalità, nel caso della sostanza bianca cerebrale questo è particolarmente evidente.

La DTI è utilizzata in special modo per misurare l'integrità dei tessuti cerebrali che potrebbero essere compromessi da disturbi di tipo neurologico, infatti l'effetto anisotropo è diminuito in caso di danno assonale. (84)

Il concetto di diffusione molecolare si riferisce ai microscopici movimenti traslazionali dell'acqua o altre piccole molecole causati dalla loro agitazione termica (moto Browniano). Dato che durante questo processo di diffusione le molecole interagiscono fra di loro, oltre che con membrane cellulari e macromolecole tessuto-specifiche, l'osservazione di una variazione della diffusione è specchio della struttura organizzativa del tessuto.

Stejskal e Tanner hanno descritto come si codifica l'effetto di diffusione delle molecole utilizzando impulsi di campi magnetici bipolari nel 1965, queste informazioni sono poi state integrate nel 1985 con i principi di risonanza magnetica nucleare e questo ha portato alla pubblicazione delle prime immagini *diffusion-weighted*. (85)

Il primo gradiente di diffusione codifica lo spin di una fase caratteristica e il secondo, uguale per ampiezza e diffusione, riavvolge questo spostamento di fase. In questo modo, gli spin statici, quelli che non hanno svolto nessun movimento di traslazione nella rete, vengono riportati tutti assieme (84). Se invece nel tempo che intercorre tra i due gradienti le molecole si diffondono, il processo è incompleto ed alla fine del secondo impulso rimane una dispersione di fase. Quest'ultima provoca una diminuzione di intensità di segnale rispetto alle molecole statiche (84).

Il parametro misurato in un esperimento di questo tipo è chiamato coefficiente di diffusione apparente (ADC), ogni voxel di un'immagine contiene differenti tipologie di tessuto con acqua sia negli spazi intracellulari che extracellulari (84). Come precedentemente menzionato, se il movimento delle molecole d'acqua è probabile in ugual modo in qualsiasi direzione allora è isotropo, se invece il tessuto di studio ha una organizzazione strutturale peculiare con ostacoli che limitano i movimenti delle molecole in qualche direzione rispetto alle altre, rendendo quindi alcuni movimenti verso una direzione specifica più probabili di altri, la diffusione viene definita anisotropa (84).

Per rappresentare i dati del tensore di diffusione viene introdotto il concetto di “ellissoide di diffusione”, la sua superficie rappresenta la disposizione delle molecole d’acqua (84):

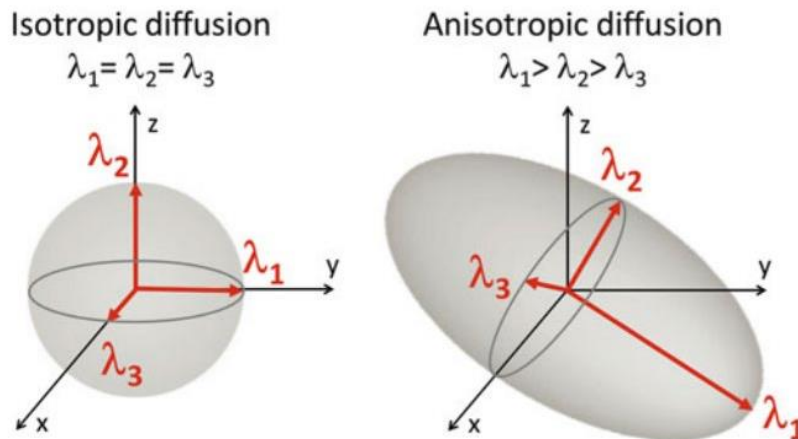


Figura 6: Il tensore di diffusione rappresentato come un ellissoide nel caso di una diffusione isotropa (sinistra) e anisotropa (destra). Si tratta della rappresentazione dello spostamento quadratico medio tridimensionale dell'idrogeno mobile il suo asse lungo λ_1 parallelo alla direzione di massima diffusione ϵ (68). all'interno del voxel. Quando la diffusione è anisotropa l'ellissoide è orientato con il suo asse lungo nella direzione di massima diffusione.

Partendo da questi dati è possibile calcolare vari parametri, tra questi la diffusività media, o coefficiente di diffusione apparente (ADC).

Per esempio nei fasci densi di sostanza bianca, soprattutto quelli molto mielinizzati, la diffusione dell'acqua è ristretta alla direzione parallela rispetto all'asse lungo dell'assone, il che permette di osservare un valore elevato di FA e basso di ADC (84).

La DTI è stata utilizzata in molti studi inerenti alla sostanza bianca e allo sviluppo di patologie, oltre che nel fronte di ricerca tumorale per cercare di definire dei parametri per la classificazione neoplastica o per identificare un'invasione di cellule tumorali (84) (86).

E' stata riscontrata un'alterazione di FA in alcune regioni cerebrali in pazienti dello spettro bipolare-schizofrenico, in particolar modo a livello del corpo

calloso in pazienti francamente Bipolari (87). Inoltre alterazioni della FA sono state correlate all'insorgenza di episodi maniacali e alla cronicizzazione della mania(88).

Modificazioni microstrutturali accomunano schizofrenici e bipolari, soprattutto a livello del corteccia fronto temporale e corpo calloso, sottolineando la possibile esistenza di processo patogenetico comune a carico della sostanza bianca (89).

Quindi, un aumento dell'ADC è indice di alterazioni microstrutturali della sostanza bianca e una sua variazione nei pazienti dello spettro bipolare schizofrenico suggerirebbe un danno assonale a carico delle regioni studiate; per cui di riflesso un deficit funzionale.

4. SCOPO DELLO STUDIO

Il primo scopo dello studio è verificare l'esistenza di alterazioni del ADC ippocampale all'interno di un campione di pazienti schizofrenici e bipolari rispetto ai controlli sani, ovvero un effetto della diagnosi sul fenotipo ippocampale.

Verificata la variabilità del'ADC ippocampale presente fra i diversi gruppi, sono stati analizzati sette SNPs, scelti sulla base della significatività della loro correlazione in letteratura con endofenotipi caratteristici dello spettro bipolare-schizofrenico.

Il secondo obiettivo dello studio è quindi trovare una correlazione fra gli SNPs analizzati e l'alterazione dell'ADC ippocampale, ricercando un effetto del genotipo di rischio e dell'interazione genotipo x diagnosi in un campione composto da schizofrenici, bipolari e controlli sani.

Per ciascun gruppo di soggetti e per ciascun SNP sono state elaborate statistiche ANOVA (analisi di varianza) considerando tre modelli di trasmissione genica: dominante, codominante e recessivo (vedi oltre); si è quindi studiato l'effetto in omozigosi ed eterozigosi dei diversi alleli di rischio. Alla luce dei risultati ottenuti ci si propone di verificare l'effetto gene-fenotipo di: rs1006737 CACNA1C (G>A), rs1625579 miR137 (G>T), rs4680 COMT (G>A), rs821616 DISC1 (A>T), rs1130233 AKT1 (C>T), rs12630592 GSK3B (C>A) , rs1344706 ZNF804A (A>C).

In particolare, si considerano le varianze delle medie dei dati volumetrici ippocampali nei gruppi sopra descritti.

5. MATERIALI E METODI

RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI

Sono stati reclutati 47 pazienti affetti da disturbi dello spettro bipolare-schizofrenico (29 maschi e 18 femmine) e, in particolare, da disturbo bipolare di tipo I e II, schizofrenia e disturbo schizoaffettivo. Inoltre, è stato reclutato un campione di 24 controlli sani (9 maschi e 15 femmine) per effettuare un confronto.

Sono stati reclutati nello studio i pazienti che soddisfacevano i seguenti criteri di inclusione:

- età compresa tra 18 e 55 anni;
- diagnosi di disturbo bipolare di tipo I o II o di schizofrenia in base ai criteri diagnostici del Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM) IV-TR dell'American Psychiatric Association;
- esordio del disturbo antecedente all'età di 35 anni;
- durata del disturbo di almeno 3 anni.

I soggetti sani di controllo sono stati reclutati tra i conoscenti degli sperimentatori o tra gli stessi sperimentatori e abbinati al gruppo combinato di pazienti per età e genere. Nessuno dei controlli sani presentava una storia personale o familiare di patologia psichiatrica maggiore o uso di farmaci psicotropi.

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti che presentavano le seguenti condizioni:

- presenza di una condizione medica concomitante;
- storia di patologia neurologica o trauma cranico con conseguente perdita di coscienza di durata minima di 5 minuti;

- diagnosi secondaria di delirium, demenza, disordine amnestico o disturbo cognitivo non altrimenti specificato in base ai criteri diagnostici del DSM-IV TR;
- diagnosi di disturbo di dipendenza da sostanze o di abuso di sostanze, in base ai criteri diagnostici del DSM-IV, durante i 12 mesi precedenti;
- controindicazioni all'esecuzione dell'esame di risonanza magnetica.

La ricerca è stata approvata dai comitati etici locali (di Padova e Treviso) e tutti i soggetti sono stati reclutati dopo aver ricevuto una descrizione completa delle procedure dello studio e previo consenso informato scritto. La partecipazione allo studio è stata proposta a pazienti ambulatoriali e a pazienti ricoverati presso la Clinica Psichiatrica dell'Università degli Studi di Padova e il Dipartimento di Salute Mentale di Conegliano. Un totale di 47 pazienti e di 24 soggetti sani di controllo è risultato eleggibile e ha partecipato allo studio.

VALUTAZIONE CLINICA

La valutazione psichiatrica è stata eseguita mediante l'acquisizione della storia clinica medica e psichiatrica, l'esecuzione dell'esame psichico e la somministrazione dell'intervista diagnostica strutturata Mini International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.), per determinare specifiche diagnosi in base ai criteri del DSM-IV TR. La M.I.N.I. è stata somministrata anche al gruppo dei controlli sani per verificare la presenza di patologie psichiatriche attuali o pregresse. Il gruppo di pazienti, in base ai criteri diagnostici del DSM-IV TR, è suddiviso in: 31 pazienti affetti da schizofrenia o disturbo schizoaffettivo e 16 pazienti affetti da disturbo bipolare di tipo I o II.

Tutti i pazienti valutati erano clinicamente stabili (i pazienti ricoverati sono stati valutati dopo la dimissione). L'età all'esordio e la durata del disturbo (espressi in anni) sono stati registrati durante la valutazione clinica.

RISONANZA MAGNETICA STRUTTURALE VOLUMETRICA

Acquisizione delle immagini

Sono stati considerati 47 pazienti, suddivisi in due gruppi di pazienti affetti rispettivamente da schizofrenia (31 pazienti) e disturbo bipolare di tipo I o II, (16 pazienti) e un gruppo di controllo costituito da 24 soggetti sani. Sia i due gruppi di pazienti sia il gruppo di controllo sono stati sottoposti a un esame di risonanza magnetica cerebrale. Le immagini sono state acquisite presso l'unità di Neuroradiologia dell'Ospedale di Conegliano mediante un'apparecchiatura di risonanza magnetica Philips con campo magnetico da 1,5 tesla. Le misurazioni volumetriche sono state effettuate su immagini 3D pesate in T1 utilizzando la sequenza MP-RAGE sul piano sagittale secondo i seguenti parametri di acquisizione: tempo di ripetizione (TR) = 10 msec, tempo di eco (TE) = 4 msec, tempo di inversione (TI) = 300 msec, angolo di deflessione (flip angle) = 8°, spessore di strato = 1.25 mm, dimensione della matrice = 256×256×192, dimensione del voxel 1×1×1,25 mm. A tutti i soggetti è stato chiesto di mantenere l'immobilità durante l'esame di risonanza magnetica. Al fine di minimizzare errori di misurazione, il campo di vista è stato impostato allineando le immagini sagittali lungo la linea intercommissurale. Sono state acquisite inoltre immagini pesate in T2 e in diffusione protonica (DP) sul piano assiale per escludere alterazioni strutturali del parenchima cerebrale. Tutte le immagini sono state esaminate da un neuroradiologo esperto. Nessun soggetto ha avuto bisogno di essere sedato per sottoporsi all'esame.

Processamento delle immagini

Dopo l'acquisizione delle immagini, i dati sono stati inviati a una workstation di elaborazione. L'analisi dei dati è stata condotta mediante l'utilizzo del software semiautomatico Analyze 10.0. Per il calcolo del volume cerebrale totale e della sostanza grigia della formazione ippocampale è stata condotta un'analisi stereologica, un metodo semiautomatico per la stima del volume. Il protocollo utilizzato in questo studio si basa sull'esperienza di protocolli utilizzati in precedenza e sulla letteratura, con particolare riferimento agli studi di Sheline e colleghi e di Rametti e colleghi.(90)

È stata applicata una griglia rigida sulle immagini acquisite in sezione coronale, mantenendo un posizionamento iniziale e un angolo di deviazione rispetto alla linea orizzontale casuali. Per ridurre la variabilità dimensionale delle strutture anatomiche con profili irregolari tra le diverse sezioni è stata fondamentale la scelta di un numero ottimale di sezioni e una dimensione della griglia adeguata. La dimensione della griglia e la distanza tra le sezioni sono state stabilite per mantenere un coefficiente di errore nell'intervallo tra 0.01 e 0.04. Una griglia rigida di 2x2 mm² è stata sovrapposta ogni 3 sezioni coronali, mentre per il volume cerebrale totale è stata utilizzata una griglia sovrapposta ogni 10 sezioni coronali. Sono stati considerati nel conteggio tutti i punti della griglia compresi all'interno del volume cerebrale totale o all'interno della sostanza grigia della formazione ippocampale.

Il software utilizzato è dotato del tool Orthogonal, mediante il quale è possibile visualizzare ogni griglia nei tre piani ortogonali contemporaneamente, permettendo di decidere in modo più preciso quale sezione includere nelle regioni di interesse.

Le procedure di misurazione sono state effettuate senza conoscere l'identità e le caratteristiche cliniche dei soggetti.

Per quanto riguarda la formazione ippocampale, è stato considerato come limite anteriore l'alveo e come limite posteriore la sezione in cui l'ippocampo è risultato adiacente al trigono del ventricolo laterale. Nella misurazione del volume è stato incluso il complesso di sostanza grigia che ha come limite superiore la sostanza bianca della giunzione tra la fimbria e il fornice, come limite inferiore la sostanza bianca del giro para-ippocampale, come limite mediale lo spazio subaracnoideo delle cisterne e come limite laterale il ventricolo laterale. Nel complesso di sostanza grigia è stato incluso il corno d'Ammon, il giro dentato e il subiculum e la digitazione verticale della testa dell'ippocampo che in sezione coronale appare orientata verso l'alto e medialmente verso l'amigdala. Non sono stati inclusi per la misurazione del volume la sostanza bianca del sistema fornice-fimbria, l'alveo, la sostanza bianca del giro para-ippocampale, i ventricoli, lo spazio subaracnoideo, gli spazi con la densità del liquor presenti all'interno della formazione ippocampale, l'amigdala e la sostanza bianca che la delimita (figura 7).

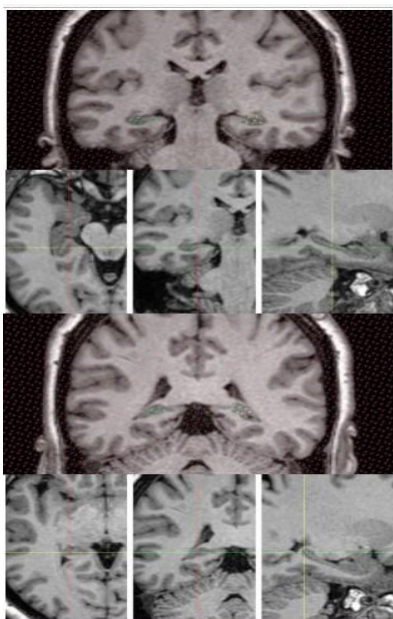


Figura 7 definizione ROI

Mappe DTI

Il modulo DTI consente la creazione di mappe per i diversi indici di diffusione e di eseguire analisi traggografiche utilizzando le Object Maps. Abbiamo calcolato cinque mappe standard DTI ponderate su precisi indici di diffusione: anisotropia frazionaria (FA), diffusività radiale (RD), diffusività assiale (AD), anisotropia relativa (RA), rapporto di volume (VR) (FA, RA, VR, AD, RD), la mappa del coefficiente di diffusione apparente (ADC) e una mappa dei colori definita dagli autovalori del tensore. L'intensità sulla scala di grigi è direttamente proporzionale al corrispondente indice di diffusione o ADC. Le immagini di anisotropia mostrano solo l'entità dell'anisotropia.

Poiché anche la direzione dell'autovettore principale è importante, la mappatura dei colori è ampiamente utilizzata, in cui le informazioni relative all'orientamento (colore) sono combinate con le informazioni sull'anisotropia (intensità dell'immagine). Per la codifica a colori, l'autovettore principale viene proiettato in tre direzioni diverse nel quadro di riferimento dell'immagine (a ciascun voxel vengono assegnati diversi componenti di colore) utilizzando il modello RGB. Il rosso è associato alla direzione sagittale (destra-sinistra), il blu con l'assiale (su-giù) e il verde con il coronale (indietro-avanti).

Calcolo della traggografia e dell'indice di diffusione.

Una volta ottenute, le mappe DTI permettono di stimare gli indici di diffusione delle regioni selezionate attraverso il fiber-tracking; questa applicazione del software si basa sull'algoritmo Fiber Assignment by Continuous Tracking (FACT). Questo modello deterministico implica una soglia di FA definita dall'utente per il punto iniziale di origine delle fibre (punto di partenza) e per il punto di terminazione (punto finale). In questo studio sono stati utilizzati i seguenti parametri: FA start thresh = 0.2 e FA stop thresh = 0.2; soglia FA dell'angolo di arresto = 50 °, soglia di lunghezza della fibra = 5 mm, secondo la letteratura (Zhang, 2014) questi valori hanno maggiori probabilità di discriminare tra materia grigia e bianca nel tessuto cerebrale e di prevenire l'incrocio di artefatti delle fibre. Inoltre, il software

permette la definizione dei tratti di sostanza bianca relativi ad uno specifico ROI o intercettati da altri ROI utilizzando gli operatori booleani E/O.

Sulla base di questo approccio per ogni regione di interesse (ROI) gli indici di diffusione e la loro deviazione standard vengono quindi calcolati applicando lo strumento specifico delle metriche della fibra software.

Ai fini di questo studio abbiamo focalizzato il nostro interesse su FA e ADC medio per ippocampo destro e sinistro.

ANALISI GENETICA

Sono stati raccolti campioni salivari di circa 3 ml da ogni paziente e controllo incluso nello studio. Il materiale prelevato è stato trattato secondo le procedure standard e congelato a -80° . Sono stati scelti 7 SNPs in base al peso statistico della loro correlazione in letteratura con specifici endofenotipi:

- rs1006737 CACNA1C, G > A;
- rs1625579 miR137, G > T;
- rs4680 COMT, G > A;
- rs821616 DISC1, A > T;
- rs1130233 AKT1, C > T;
- rs12630592 GSK3B, C > A;
- rs1344706 ZNF804A, A > C.

Il DNA è stato estratto da campioni salivari secondo le tecniche standard. Le sette varianti a singolo nucleotide (SNP) sono state analizzate utilizzando diverse tecniche: High Resolution Melting Analysis (HRMA), Restriction fragment Length Polymorphism (RFLP) e Sanger sequencing.

In tutti i casi, la PCR è stata eseguita in reazioni da 25 μ l e i primer sono stati progettati con il sito web Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nll/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>).

RFLP e sequenziamento Sanger sono stati eseguiti utilizzando 20-50ng di DNA, 0,75 U di AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (Applied Biosystems, Waltham, MA), PCR Gold-buffer 10×, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP Mix e 0,25μM di ogni primer.

Le condizioni di PCR sono state: incubazione 10 min a 95°C, 40 cicli di 95°C per 30 sec, temperatura di annealing (che varia da 56°C o 60°C secondo le diverse coppie di primer) per 40 sec, e 72°C per 1 min, seguiti da una fase finale di allungamento a 72°C per 10 min.

Per l'analisi RFLP, i prodotti di PCR sono stati ulteriormente digeriti utilizzando 1U dell'enzima di restrizione specifico (New England BioLabs, Ipswich, MA), secondo le istruzioni del produttore, e poi i prodotti sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio o poliacrilamide.

Per il sequenziamento Sanger, gli ampliconi sono stati purificati con il kit Illustra ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, St. Louis, MO) e sequenziati con il kit di sequenziamento BigDye Terminator v3.1 cycle (Life Technologies) e il sequenziatore ABI 3500Dx (Applied Biosystems). HRMA è stato eseguito su un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) secondo Favaro et al., 2015. L'analisi della melt-curve ha permesso l'individuazione specifica dei genotipi.

ANALISI STATISTICA

Tutte le analisi statistiche sono state condotte mediante il software *jamovi* 1.2.27.

Per ciascuna delle variabili considerate, sono state prodotte delle statistiche descrittive ed è stata valutata la normalità delle distribuzioni con il test di Shapiro-Wilk.

I dati demografici hanno dimostrato una distribuzione normale e sono quindi stati elaborati con test t di Student (variabili quantitative) e chi quadrato (variabili qualitative).

I dati raccolti mediante l'analisi genetica sono stati codificati in funzione della frequenza del polimorfismo allelico e di tre possibili modelli di espressione fenotipica:

- *Codominante*: gli individui eterozigoti esprimono il fenotipo di entrambi gli omozigoti;
- *Dominante*: gli individui eterozigoti e omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type esprimono il fenotipo wild type;
- *Recessivo*: gli individui omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato gli individui omozigoti per l'allele wild type e gli eterozigoti esprimono il fenotipo wild type.

L'ADC ippocampale è stato studiato con tecniche inferenziali di analisi della varianza (ANOVA) secondo il seguente schema a tre livelli:

- in primo luogo, si è studiato l'effetto della diagnosi (appartenenza a uno dei tre gruppi del campione) sull'ADC dell'ippocampo;
- successivamente si è studiato l'effetto dei singoli SNP sull'ADC ippocampale;
- infine, si è andato a ricercare l'effetto dell'interazione diagnosi x genotipo sull'ADC ippocampale.

Per ciascuno dei tre livelli di analisi della varianza elencati sopra sono stati condotti test post-hoc per identificare i gruppi diagnostici, i genotipi e le interazioni gruppo diagnostico x genotipo che avessero una significativa correlazione con l'alterazione dell'ADC ippocampale.

6. RISULTATI

RISULTATI

DATI DEMOGRAFICI E CLINICI

I dati demografici e clinici sono riassunti nella tabella 2.

	<i>Pazienti schizofrenia</i>	<i>con Pazienti con disturbo bipolare</i>	<i>Controlli sani</i>
Totale dei soggetti	31	16	24
<i>Genere</i>			
-Maschile (%)	22 (70.97)	7 (43.75)	9 (37.5)
-Femminile (%)	9 (29.03)	9 (56.25)	15 (62.5)
<i>Età (anni)**</i>	35.3 (± 7.98)	43 (± 7.45)	37.3 (± 10.88)
<i>Scolarità (anni)**</i>	12.2 (± 3.2)	13.6 (± 7.44)	15.9 (± 2.76)
<i>Età d'esordio (anni)**</i>	20.00 (± 6.13)	25.7 (± 8.59)	
<i>Durata di malattia (anni)**</i>	12.0 (±6.73)	17.0 (±8.87)	

Tabella 2 caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti. * per le variabili nominali (genere) è stato utilizzato il test chi-quadrato, per le differenze fra le medie (età, scolarità, esordio e durata di malattia). ** i dati sono espressi come media (*+- deviazione standard)

Per quanto riguarda il sesso il test chi quadrato non ha individuato differenze significative fra i pazienti con schizofrenia, i pazienti con disturbo bipolare e i controlli sani ($p = 0.032$). Età e scolarità hanno dimostrato una distribuzione normale al test di Shapiro-Wilk, dunque sono state valutate con il test t di Student.

Per quanto riguarda l'età non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra pazienti schizofrenici e controlli ($p = 0.511$), né fra pazienti bipolari e controlli ($p = 0.075$), mentre fra schizofrenici e bipolari è stata riscontrata una differenza significativa ($p = 0.002$). La scolarità ha invece dimostrato differenze statisticamente significative soprattutto fra il gruppo dei soggetti schizofrenici e i controlli sani ($p < 0.001$); non sono state rilevate differenze significative fra la scolarità dei soggetti bipolari e controlli ($p = 0.029$), oltre che fra soggetti schizofrenici e bipolari ($p = 0.161$). L'età media d'esordio e la durata di malattia hanno dimostrato una distribuzione normale al test di Shapiro-Wilk e non hanno dimostrato differenze significative fra il gruppo dei pazienti con schizofrenia ($p = 0.196$) e i pazienti bipolari ($p = 0.053$) al test t di Student.

ANALISI DESCRITTIVA: DATI DI ADC/RMN E DATI GENETICI

I dati descrittivi relativi all'ADC ippocampale destro e sinistro sono riassunti nella tabella 3.

	GRUPPO	ADC HIPPO DX	ADC HIPPO SX
Media	BP	8.17e-4	8.35e-4
	CTRL	8.09e-4	8.07e-4
	SCZ	8.26e-4	8.38e-4
Mediana	BP	8.23e-4	8.35e-4
	CTRL	8.14e-4	7.99e-4
	SCZ	8.28e-4	8.38e-4
Deviazione standard	BP	2.27e-5	8.50e-6
	CTRL	2.18e-5	2.72e-5
	SCZ	2.46e-5	2.31e-5

Tabella 3 analisi descrittiva dei dati ADC ippocampali destro e sinistro ottenuti tramite RMN

Dall'analisi Anova a misure ripetute è emersa una significativa differenza nell'ADC ippocampale tra i tre diversi gruppi diagnostici (varianza between subjects effects : $F= 6.02$ e $p= 0.005$), da qui si è cercato di analizzare singolarmente ippocampo sinistro e destro, da cui è emerso che l'ADC ippocampale destro non varia significativamente tra i gruppi, viceversa ADC ippocampale sinistro si (p value <0.001); inoltre dai test post hoc condotti su quest'ultimo si evince che non vi è differenza statisticamente significativa tra Bipolari e schizofrenici ($p= 0.959$), mentre osservando bipolari e controlli ($p= 0.014$), schizofrenici e controlli ($p < 0.001$), questa è evidente. (Figure 4 e 5)

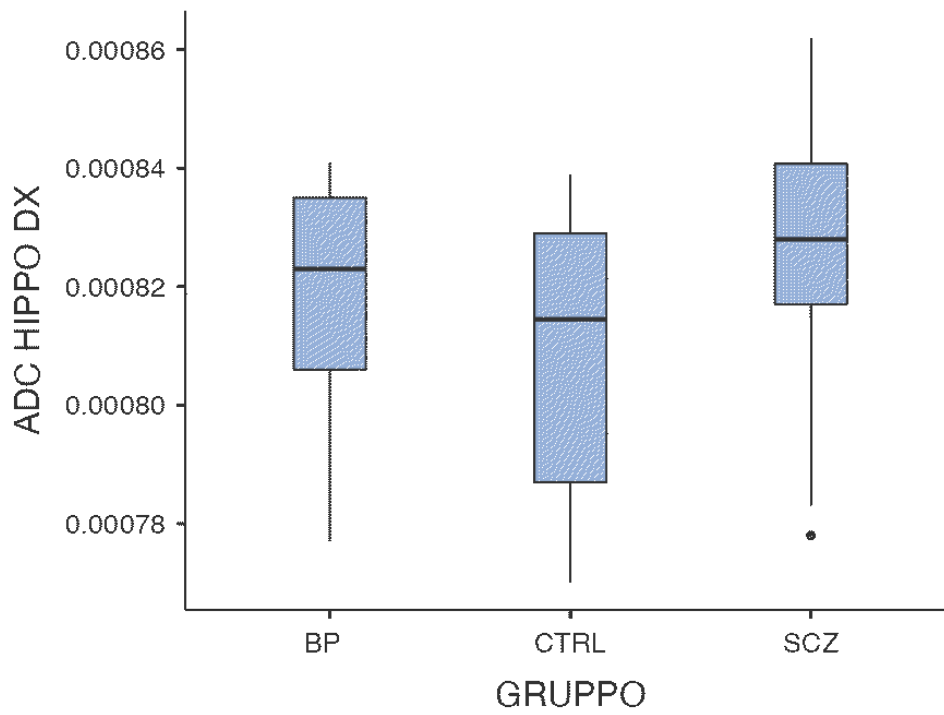


Figura 8 diagramma box-plot della distribuzione dell'ADC ippocampale dx nei vari gruppi diagnostici.

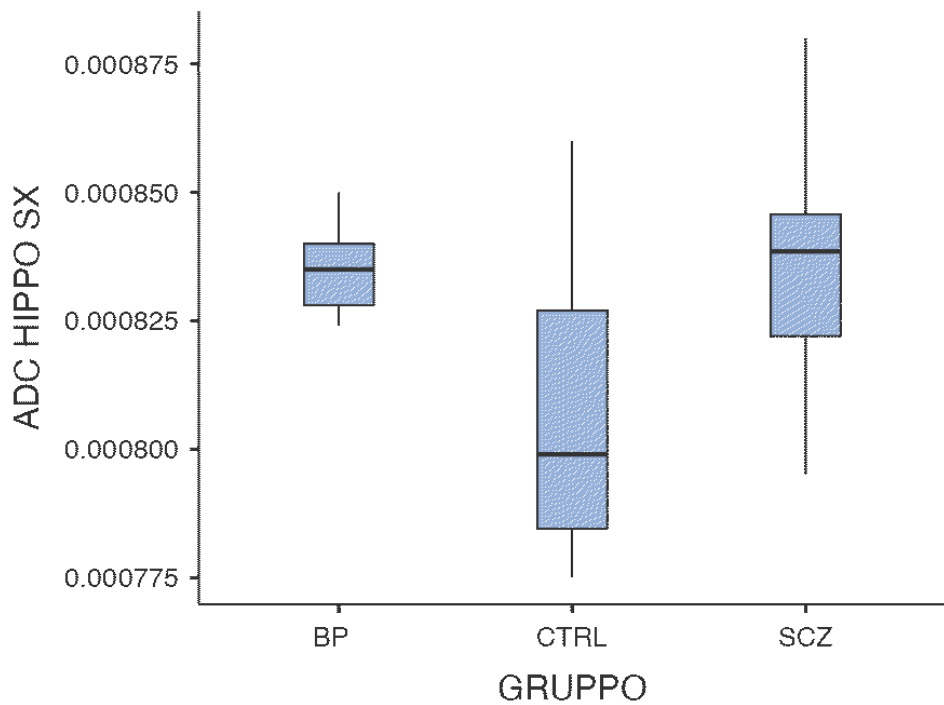


Figura 9 diagramma box-plot della distribuzione dell'ADC ippocampale SX nei vari gruppi diagnostici.

Le frequenze degli SNPs analizzati nei diversi gruppi del campione sono riportate nella tabella 4.

	Rs1006737 CACNA1C (G>A)	Rs1625579 miR137 (G>T)	Rs4680 COMT (G>A)	Rs821616 DISC1 (A>T)	Rs1130233 AKT1 (C>T)	Rs12630592 GSK3B (C>A)	Rs1344706 ZNF804A (A>C)
Pazienti bipolari n = 16	GG = 9 (56.3)	GG = 12 (75)	GG = 3 (18.8)	AA = 11 (68.8)	CC = 6 (37.5)	CC = 4 (25)	AA = 5 (31.3)
(%)	GA = 6 (37.5)	GT = 0 (0)	GA = 10 (62.5)	AT = 4 (25)	CT = 7 (43.8)	CA = 10 (62.5)	AC = 10 (62.5)
	AA = 1 (6.5)	TT = 4 (25)	AA = 3 (18.8)	TT = 1 (6.25)	TT = 3 (18.8)	AA = 2 (12.5)	CC = 1 (6.3)
Pazienti schizofrenici n = 31	GG = 15 (48.4)	GG = 22 (71)	GG = 8 (25.8)	AA = 17 (54.8)	CC = 19 (61.3)	CC = 13 (41.9)	AA = 14 (45.2)
(%)	GA = 14 (45.2)	GT = 0 (0)	GA = 16 (51.6)	AT = 11 (35.5)	CT = 9 (29)	CA = 12 (38.7)	AC = 13 (41.9)
	AA = 2 (6.5)	TT = 9 (29)	AA = 7 (22.6)	TT = 3 (9.7)	TT = 3 (9.7)	AA = 6 (19.4)	CC = 4 (12.9)
Controlli sani n = 24	GG = 11 (45.8)	GG = 16 (66.7)	GG = 9 (37.5)	AA = 11 (45.8)	CC = 15 (62.5)	CC = 9 (37.5)	AA = 9 (37.5)
(%)	GA = 12 (50)	GT = 0 (0)	GA = 11 (45.8)	AT = 11 (45.8)	CT = 9 (37.5)	CA = 13 (54.2)	AC = 13 (54.2)
	AA = 1 (4.2)	TT = 8 (33.3)	AA = 4 (16.7)	TT = 2 (8.3)	TT = 0 (0)	AA = 2 (8.3)	CC = 2 (8.3)

Tabella 4 frequenze dei genotipi nei diversi gruppi diagnostici

ANALISI DELLA VARIANZA (ANOVA): EFFETTO DI DIAGNOSI, GENOTIPO E GENOTIPO*DIAGNOSI SULL'ADC IPPOCAMPALE.

Alla luce delle analisi descrittive, si è scelto di studiare l'effetto della diagnosi, del genotipo e dell'interazione genotipo*diagnosi sull'ADC ippocampale totale, mediante l'utilizzo dell'analisi della varianza (ANOVA); si sono ipotizzati tre possibili modelli biologici:

- *Codominante*: gli individui eterozigoti esprimono il fenotipo di entrambi gli alleli;
- *Dominante*: gli individui eterozigoti e omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type esprimono il fenotipo wild type;
- *Recessivo*: gli individui omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type e gli eterozigoti esprimono il fenotipo wild type.

EFFETTO DEL GENOTIPO SULL'ADC IPPOCAMPALE

Modello codominante

Nel modello Codominante gli individui eterozigoti esprimono il fenotipo di entrambi gli alleli.

È stata condotta l'analisi anova a misure ripetute per cercare l'interazione tra ADC ippocampale e polimorfismi genici.

I risultati della varianza tra i gruppi (between subject effects) sono riassunti nella tabella 5

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	Mean Square	F	p
<i>CACNA1C</i>	3.82e-9	2	1.91e-9	2.17	0.153
<i>MIRNA137</i>	3.54e-9	1	3.54e-9	4.24	0.059
<i>COMT</i>	1.75e-10	2	8.74e-11	0.0754	0.928
<i>DISCZC1</i>	4.18E-9	2	2.09E-9	2.45	0.125
<i>AKT1</i>	1.65E-10	1	1.65E-10	0.153	0.702
<i>GSCZK3B</i>	7.19E-10	2	3.59E-10	0.322	0.731
<i>ZNF804A</i>	1.08E-9	2	5.42E-10	0.497	0.619

Tabella 5 ANOVA, varianza tra i gruppi, effetto del genotipo nel modello codominante

Modello dominante

Nel modello Dominante gli individui eterozigoti e omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type esprimono il fenotipo wild type

È stata condotta l'analisi anova a misure ripetute per cercare l'interazione tra ADC ippocampale e polimorfismi genici.

I risultati della varianza tra i gruppi (between subject effects) sono riassunti nella tabella 6

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	Mean Square	F	p
<i>CACNA1C</i>	3.24e-9	1	3.24e-9	3.78	0.072
<i>MIRNA137</i>	3.54e-9	1	3.54e-9	4.24	0.059
<i>COMT</i>	3.17e-12	1	3.17e-12	0.00292	0.958
<i>DISCZC1</i>	1.15e-9	1	1.15e-9	1.14	0.304
<i>AKT1</i>	1.65E-10	1	1.65E-10	0.153	0.702
<i>GSCZK3B</i>	1.49e-10	1	1.49e-10	0.138	0.716
<i>ZNF804A</i>	5.99e-10	1	5.99e-10	0.572	0.462

Tabella 6 ANOVA, varianza tra i gruppi, effetto del genotipo nel modello dominante

Modello recessivo

Nel modello recessivo gli individui omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato gli individui omozigoti per l'allele wild type e gli eterozigoti esprimono il fenotipo wild type.

È stata condotta l'analisi anova a misure ripetute per cercare l'interazione tra ADC ippocampale e polimorfismi genici.

I risultati della varianza tra i gruppi (between subject effects) sono riassunti nella tabella 7

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
<i>CACNA1C</i>	1.44e-9	1	1.44e-9	1.46	0.246
<i>MIRNA137</i>	3.54e-9	1	3.54e-9	4.24	0.059
<i>COMT</i>	1.38e-10	1	1.38e-10	0.128	0.726
<i>DISCZC1</i>	1.65e-9	1	1.65e-9	1.70	0.213
<i>AKT1</i>	1.65E-10	1	1.65E-10	0.153	0.702
<i>GSCZK3B</i>	6.86e-10	1	6.86e-10	0.660	0.430
<i>ZNF804A</i>	1.93e-10	1	1.93e-10	0.180	0.678

Tabella 7 ANOVA, varianza tra gruppi, effetto del genotipo nel modello recessivo

In ciascuno dei tre i modelli ipotizzati l'unico polimorfismo genico che mostra un trend di effetto sull'ADC ippocampale è mirna137 ($p= 0.059$).

Ipotizzato il ruolo dell'ippocampo sinistro nei disturbi dello spettro bipolare schizofrenico, concordemente con la Letteratura vigente, abbiamo concentrato le analisi sull'emisfero sinistro piuttosto che il destro, a seguito i risultati dell'interazione Diagnosi*genotipo sull'ADC ippocampale sinistro, nei tre modelli biologici proposti.

EFFETTO DELL'INTERAZIONE DIAGNOSI*GENOTIPO SULL'ADC IPOCAMPALE SINISTRO

Modello Codominante

Nel modello Codominante gli individui eterozigoti esprimono il fenotipo di entrambi gli alleli.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
<i>Diagnosi</i>	6.81e-9	2	3.41e-9	6.808	0.003
CACNA1C	1.86e-10	2	9.32e-11	0.186	0.831
CACNA1C* <i>diagnosi</i>	3.21e-9	4	8.02e-10	1.603	0.196
<i>Diagnosi</i>	9.63e-9	2	1.12e-10	9.602	<0.001
miR137	1.12e-10	1	4.81e-9	0.223	0.639
miR137* <i>diagnosi</i>	1.84e-9	2	9.18e-10	1.831	0.174
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
COMT	2.19e-10	1	2.19e-10		0.542
COMT* <i>diagnosi</i>	0.00206	3	3.09e-10		0.662
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
DISC1	5.43e-10	1	5.43e-10		0.292
DISC1* <i>diagnosi</i>	3.23e-9	3	1.08e-9		0.098
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
AKT1	3.52e-12	1	3.52e-12		0.938
AKT1* <i>diagnosi</i>	7.05e-10	3	2.35e-10		0.747
<i>Diagnosi</i>	4.79e-9	2	2.40e-9	4.1942	0.024
GSK3B	1.02e-10	2	5.12e-11	0.0896	0.915
GSK3B* <i>diagnosi</i>	1.23e-9	4	3.07e-10	0.5375	0.709
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
ZNF804A	1.40e-10	1	1.40e-10		0.610
ZNF804A* <i>diagnosi</i>	1.82e-9	3	06.08e-10		0.344

Tabella 8 ANOVA, modello codominante, studio dell'effetto di genotipo, diagnosi e diagnosi* genotipo sull'ADC ippocampale sinistro

Nessun SNP ha dimostrato un significativo effetto del genotipo sull'ADC ippocampale.

Lo stesso dicasi per quanto riguarda l'interazione genotipo*diagnosi : CACNA1C (F= 1.603 e p= 0.196) miRNA137(F= 1.831 e p= 0.174) COMT (F= e p= 0.662) DISC1(F= e p= 0.098) AKT1(F= e p= 0.747) GSK3B(F= e p= 0.709) ZNF804A(F= e p= 0.344).

Modello Dominante

Nel modello dominante gli individui eterozigoti e omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type esprimono il fenotipo wild type. I risultati dell'analisi della varianza (ANOVA) per l'interazione di diagnosi, genotipo e genotipo*diagnosi con i dati ADC dell'ippocampo sono riportati in tabella 9.

Nessun polimorfismo fra quelli analizzati ha dimostrato un effetto significativo del genotipo sull'ADC ippocampale ($p > 0.05$).

Tranne CACNA1C (F=3.253 e p= 0.05); ma i test post hoc non hanno dato nessuna correlazione significativa.

Lo stesso dicasi per quanto riguarda l'interazione genotipo*diagnosi: miRNA137(F= 1.832 e p= 0.174) COMT (F= 0.595 e p= 0.557) DISC1(F= 0.149 e p= 0.862) AKT1(F= 0.4281 e p= 0.655) GSK3B(F= 0.0445 e p= 0.957) ZNF804A(F= 1.704 e p= 0.196).

	Sum of Squares	df	Mea Square	F	p
<i>Diagnosi</i>	8.59e-9	1	4.29e-9	9.216	<0.001
<i>CACNA1C</i>	1.33e-10	2	1.33e-10	0.286	0.596
<i>CACNA1C*diagnosi</i>	3.03e-9	2	1.52e-9	3.253	0.050
<i>Diagnosi</i>	9.63e-9	1	4.81e-9	9.602	<0.001
<i>miR137</i>	1.12e-10	2	1.12e-10	0.223	0.639
<i>miR137*diagnosi</i>	1.84e-9	2	9.18e-10	1.832	0.174
<i>Diagnosi</i>	5.94e-9	2	2.97e-9	5.548	0.008
<i>COMT</i>	3.10e-10	1	3.10e-10	0.578	0.452
<i>COMT*diagnosi</i>	6.37e-10	2	3.18e-10	0.595	0.557
<i>Diagnosi</i>	9.67e-9	2	4.83e-9	9.055	<0.001
<i>DISC1</i>	5.52e-10	1	5.52e-10	1.035	0.316
<i>DISC1*diagnosi</i>	1.60e-10	2	7.98e-11	0.149	0.862
<i>Diagnosi</i>	8.16e-9	2	4.08e-9	7.44068	0.002
<i>AKT1</i>	1.80e-12	1	1.80e-12	0.00328	0.955
<i>AKT1*diagnosi</i>	4.70e-10	2	2.35e-10	0.42817	0.655
<i>Diagnosi</i>	0.7.21e-9	2	3.61e-9	6.4579	0.004
<i>GSK3B</i>	5.50e-11	1	5.50e-11	0.0985	0.755
<i>GSK3B*diagnosi</i>	4.96e-11	2	2.48e-11	0.0445	0.957
<i>Diagnosi</i>	1.03e-8	2	5.17e-9	10.107	<0.001
<i>ZNF804A</i>	6.34e-11	1	6.34e-11	0.124	0.727
<i>ZNF804A*diagnosi</i>	1.74e-9	2	8.72e-10	1.704	0.196

Tabella 9 ANOVA, modello dominante; studio dell'effetto di genotipo, gruppo e gruppo*diagnosi sull'ADC ippocampale sinistro

Modello recessivo

Nel modello recessivo gli individui omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type e gli eterozigoti esprimono il fenotipo wild type.

Nella tabella sono riportati i dati ANOVA relativi all'effetto di genotipo, gruppo e gruppo*genotipo sull'ADC ippocampale sinistro, per ogni SNP analizzato.

	<i>Sum of Squares</i>	<i>df</i>	Mean Square	F	p
<i>Diagnosi</i>	4.67e-9	1	2.33e-9	4.317	0.021
<i>CACNA1C</i>	1.42e-10	2	1.42e-10	0.262	0.612
<i>CACNA1C*diagnosi</i>	6.20e-10	2	3.10e-10	0.574	0.568
<i>Diagnosi</i>	9.63e-9	2	4.81e-9	9.602	<0.001
<i>miR137</i>	1.12e-10	1	1.12e-10	0.223	0.639
<i>miR137*diagnosi</i>	1.84e-9	2	9.18e-10	1.832	0.174
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
<i>COMT</i>	2.65e-23	0			
<i>COMT*diagnosi</i>	1.75e-10	1	1.75e-10		0.570
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
<i>DISC1</i>	9.93e-24	0			
<i>DISC1*diagnosi</i>	2.75e-9	1	2.75e-9		0.021
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
<i>AKT1</i>	2.32e-23	0			
<i>AKT1*diagnosi</i>	1.32e-10	1	1.32e-10		0.625
<i>Diagnosi</i>	2.48e-9	2	1.24e-9	2.3103	0.113
<i>GSK3B</i>	2.01e-11	1	2.01e-11	0.0376	0.847
<i>GSK3B*diagnosi</i>	9.00e-10	2	4.50e-10	0.8390	0.440
<i>Diagnosi</i>	0.00	NaN			
<i>ZNF804A</i>	2.32e-23	0			
<i>ZNF804A*diagnosi</i>	9.83e-12	1	9.83e-12		0.894

Tabella 10 ANOVA, modello recessivo; studio dell'effetto di genotipo, diagnosi e diagnosi*genotipo sull'ADC ippocampale sinistro

Nel modello recessivo è stato dimostrato un significativo effetto della diagnosi sul fenotipo ippocampale.

Nessuno tra i 7 SNP analizzati ha dimostrato un effetto statisticamente significativo del genotipo di rischio sull'ADC ippocampale, con valori di $p > 0.05$.

Nessun gene ha dimostrato una correlazione significativa fra l'interazione genotipo*diagnosi e l'alterazione del'ADC ippocampale sinistra, tranne DISC1 ($p=0.021$)

7. DISCUSSIONE

Il primo scopo dello studio è verificare l'esistenza di alterazioni dell'ADC ippocampale all'interno di un campione di pazienti schizofrenici e bipolari rispetto ai controlli sani, ovvero un effetto della diagnosi sul fenotipo ippocampale.

Verificata la variabilità del coefficiente apparente di diffusione presente fra i diversi gruppi, sono stati analizzati sette SNPs, scelti sulla base della significatività della loro correlazione in letteratura con endofenotipi caratteristici dello spettro bipolare-schizofrenico.

Il secondo obiettivo dello studio è quindi trovare una correlazione fra i diversi genotipi relativi agli SNPs analizzati e l'alterazione dell'ADC ippocampale, ricercando un effetto del genotipo di rischio e dell'interazione genotipo*diagnosi in un campione composto da schizofrenici, bipolari e controlli sani.

Le evidenze presenti in letteratura non sono unanimi: molti studi hanno descritto un'alterazione dell'ADC ippocampale presente nei pazienti bipolari e schizofrenici rispetto ai controlli sani. (89) Altri non hanno trovato risultati del tutto soddisfacenti (91)

Tuttavia ad oggi la mole di studi che indagano questo parametro è minore rispetto agli studi sul volume ippocampale, sul quale troviamo evidenze ben consolidate in letteratura; è di fatto un reperto abbastanza frequente e caratteristico nei pazienti schizofrenici, sia all'esordio che in corso di malattia cronica. (92)

L'ADC ippocampale risulta alterato nei pazienti schizofrenici rispetto ai controlli sani, nei bipolari questa alterazione è meno evidente, il che sarebbe coerente con una sovrapposizione neurobiologica di fenotipi clinici simili, appunto dello spettro bipolare-schizofrenico.(93)

Una possibilità che spiegherebbe la variabilità del coefficiente apparente di diffusione ippocampale nei pazienti bipolari potrebbe essere il differente

sottotipo diagnostico; in questo senso il disturbo bipolare psicotico si distinguerebbe dal sottotipo non psicotico e si porrebbe più vicino al disturbo schizofrenico nel corso dello Spettro.

Tuttavia, l'utilizzo di questo parametro potrebbe rivelarsi più sensibile nel determinare alterazioni della sostanza bianca rispetto alle variazioni volumetriche rilevate nelle classiche indagini di imaging. (94)

Gli studi di *genome-wide-association* hanno individuato diversi geni di suscettibilità per i disturbi dello spettro bipolare-schizofrenico e hanno permesso di associare alcuni di essi a determinati *endofenotipi*, ovvero ad alterazioni organiche specifiche ed ereditabili presenti sia nel gruppo diagnostico sia nei soggetti a rischio (familiari), che presentano un determinato genotipo. I polimorfismi analizzati nel presente studio sono stati più o meno fortemente associati in letteratura ad alcune alterazioni strutturali e/o funzionali a livello dell'ippocampo.

Alla luce di queste considerazioni, il presente studio si propone di indagare l'effetto di rs1006737 CACNA1 G>A, rs1625579 miR137 G>T, rs4680 COMT G>A, rs821616 DISC1 A>T, rs1130233 AKT1 C>T, rs12630592 GSK3B C>A, e rs1144706 ZNF804A A>C sul volume ippocampale di pazienti schizofrenici, bipolari e controlli sani. L'analisi è stata condotta, per ciascun SNP, ipotizzando tre diverse modalità di espressione fenotipica:

- *Codominante*: gli individui eterozigoti esprimono il fenotipo di entrambi gli omozigoti;
- *Dominante*: gli individui eterozigoti e omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type esprimono il fenotipo wild type;
- *Recessiva*: gli individui omozigoti per l'allele mutato esprimono il fenotipo dell'allele mutato; gli individui omozigoti per l'allele wild type e gli eterozigoti esprimono il fenotipo wild type.

Effetto della diagnosi sull'ADC ippocampale.

Nel modello codominante, dominante, recessivo l'analisi della varianza ha dimostrato un effetto significativo della diagnosi sull'ADC ippocampale, maggiormente a sinistra ($p < 0.001$).

I test post hoc condotti sui risultati dell'analisi della varianza hanno riscontrato, in questi modelli considerati, una significativa differenza fra i pazienti bipolari e i controlli, oltre che fra i pazienti schizofrenici e i controlli (0.003), mentre non sono state individuate differenze significative fra il gruppo dei pazienti schizofrenici e quello dei bipolari. Questi riscontri sono compatibili con una modalità continua di manifestazione delle alterazioni ippocampali, secondo il concetto di spettro bipolare-schizofrenico.

Effetto del genotipo sull'ADC ippocampale

Sono stati presi in considerazione i polimorfismi rs1006737 CACNA1 G>A, rs1625579 miR137 G>T, rs4680 COMT G>A, rs821616 DISC1 A>T, rs1130233 AKT1 C>T, rs12630592 GSK3B C>A, e rs1144706 ZNF804A A>C. Si è ricercato un possibile effetto del genotipo di rischio sull'ADC ippocampale, considerando tre modelli di espressione del fenotipo: codominante, dominante e recessivo.

Ciò che abbiamo osservato è che in tutti e tre i modelli l'unico gene che ha dimostrato un trend di effetto del genotipo a rischio sull'ADC ippocampale è miR137 ($F = 4.24$ e $p < 0.059$). Mentre gli altri polimorfismi non hanno dato un effetto significativo.

Effetto dell'interazione diagnosi*genotipo sull'ADC ippocampale

Considerando l'interazione diagnosi*genotipo, concentrandosi sull'emisfero cerebrale sinistro, nessun gene ha dimostrato un effetto significativo sull'ADC ippocampale, in nessuno dei tre modelli ipotizzati.

I risultati di questo studio ci mettono di fronte alla complessità della manifestazione organica nei disturbi dello spettro bipolare schizofrenico. La mancanza di un'interazione diagnosi*genotipo statisticamente significativa può essere spiegata attraverso l'*epistasi*, ovvero il fenomeno per cui uno o più geni influenzano l'espressione di un altro gene. L'ADC ippocampale si configura in questo senso come un carattere complesso poligenico e multifattoriale, determinato dall'interazione di più loci e di fattori ambientali.

Tale ipotesi è in accordo con il modello poligenico a soglie multiple proposto da Kelsoe, che fa corrispondere alle diverse manifestazioni fenotipiche il raggiungimento di una soglia secondo una modalità poligenica di trasmissione di un tratto quantitativo. Ogni soglia è determinata dalla variabilità allelica, dalla presenza di diverse mutazioni possibili per ciascun gene, dalla combinazione dell'effetto di geni diversi e dall'esposizione a fattori ambientali.(13)

MiR137, il cui polimorfismo rs1625579 è associato in letteratura ad un significativo effetto del genotipo sulla volumetria ippocampale, è un modulatore dell'espressione genica a livello neuronale e influenza la trascrizione e l'attività di centinaia di altri geni, tra questi: CSMD1, CACNA1C, ZNF804A, ERBB4, GSK3B (16)(63)(64).

ZNF804A a sua volta modula la trascrizione di numerosi geni associati a schizofrenia e disturbo bipolare, tra cui: PRSS16 (una serina proteasi

localizzata sul cromosoma 6, vicino al complesso maggiore di istocompatibilità MHC I), COMT (un enzima che degrada le catecolammine nello spazio inter-sinaptico), PDE4B (che codifica per una fosfodiesterasi che idrolizza il cAMP) e DRD2 (il recettore D2 della dopamina). Gli ultimi tre geni menzionati sono direttamente coinvolti nella trasmissione dopaminergica e nel signaling del cAMP, due pathway implicate nello sviluppo dei sintomi psicotici; essi sono inoltre associati ad alterazioni funzionali e strutturali a livello dell'ippocampo.(19)

In letteratura sono inoltre descritte interazioni epistatiche fra alcuni dei polimorfismi analizzati nel presente studio:

Rs1006737 CACNA1C e rs1344706 ZNF804A hanno dimostrato un'interazione di tipo additivo nel determinare un'alterata attivazione cerebrale durante le prove di fluenza verbale nei pazienti schizofrenici e bipolari.(95)

Punti di forza e limiti dello studio

Il punto di forza dello studio è rappresentato dall'approccio al neuroimaging ROI-based, che consente di studiare regioni neuroanatomiche specifiche (regioni d'interesse).

Nell'interpretazione dei risultati del presente studio devono essere considerati i fattori confondenti che potrebbero aver alterato la significatività delle differenze fra gruppi per quanto riguarda l'effetto della diagnosi e del genotipo sull'alterazione del volume ippocampale.

Un primo fattore confondente è sicuramente il trattamento farmacologico somministrato ai pazienti inclusi nel campione, in quanto è noto l'effetto neuroprotettivo dei farmaci stabilizzatori dell'umore e antipsicotici, i quali potrebbero aver alterato la significatività delle differenze fra ADC ippocampali di pazienti e controlli.

E' stato dimostrato infatti che il trattamento con litio ha un effetto neuroprotettivo e promuove la neurogenesi, (96)

Per quanto riguarda il trattamento con antipsicotici, è stato dimostrato un effetto protettivo sull'ippocampo di quelli atipici (in particolare Clozapina, Olanzapina, Risperidone) rispetto a quelli tipici (Aloperidolo).(97)

Essendo i pazienti con schizofrenia e con disturbo bipolare in trattamento cronico, è evidente che il tipo e la durata della terapia farmacologica sia un elemento da tenere in considerazione nell'interpretazione dei risultati di neuroimaging.

Un secondo fattore confondente è rappresentato dalla bassa numerosità del campione e dalla non omogeneità dei tre gruppi relativamente al numero di soggetti presi in considerazione. Questo può spiegare la mancanza di significatività statistica dell'interazione di genotipo e dell'associazione genotipo*diagnosi per gli SNPs analizzati nonostante la loro più o meno forte associazione con l'alterazione del fenotipo ippocampale in letteratura. La bassa numerosità del campione è anche responsabile della bassa numerosità di omozigoti per gli alleli mutati, che probabilmente ha influito sull'analisi dell'effetto degli SNPs nel modello recessivo, determinando, in tale contesto, il mancato riscontro di significatività.

Un ulteriore elemento da tenere in considerazione è la bassa numerosità dei polimorfismi studiati, che ha ridotto notevolmente le probabilità di riscontrare un effetto degli stessi sui dati ippocampali.

8. CONCLUSIONE

Una volta concettualizzata l'esistenza dello spettro bipolare-schizofrenico, dunque che schizofrenia e disturbo bipolare siano patologie accomunate dallo stesso processo patogenetico, si sono studiati i coefficienti apparenti di diffusione (ADC) ippocampali e l'effetto della diagnosi, del genotipo e dell'interazione genotipo*diagnosi su di essi; relativamente ai 7 polimorfismi rs1006737 CACNA1 G>A, rs1625579 miR137 G>T, rs4680 COMT G>A, rs821616 DISC1 A>T, rs1130233 AKT1 C>T, rs12630592 GSK3B C>A, e rs1344706 ZNF804A A>C.

Il gruppo diagnostico ha dimostrato un significativo effetto sul fenotipo ippocampale, determinando un aumento dell'ADC nei pazienti rispetto ai controlli nel modello codominante, dominante e recessivo; tale reperto si è dimostrata più severa nei pazienti schizofrenici rispetto ai pazienti bipolari. Questo risultato avvalorava l'ipotesi dell'esistenza di uno spettro bipolare-schizofrenico, e che le singole patologie ne siano una espressione quantitativa.

Per quanto riguarda la genetica, il gene più interessante si è rivelato il rs1625579 miR137 G>T, essendo questo determinante per l'espressione a valle di molti altri geni; tuttavia l'unico risultato statisticamente significativo è stato il riscontro di un trend di effetto nell'analisi del genotipo su ADC ippocampale; mentre l'intreccio diagnosi*genotipo non ha prodotto risultati statisticamente significativi.

Futuri studi chiariranno meglio i rapporti epistatici fra i vari geni fin'ora associati a questo tratto endofenotipico.

Ulteriore menzione alla tecnica d'indagine in RMN. Le alterazioni microstrutturali della sostanza bianca vengono visualizzate precocemente con l'utilizzo del parametro di risonanza magnetica ADC, molto più che rispetto alla classica RMN, in tal modo, sebbene tutt'ora tale strumento di

imaging si applichi solo all'ambito della ricerca, sarebbe possibile orientare la diagnosi nei casi clinici ambigui o ad insorgenza precoce, nonch'è ricercare e testimoniare alterazioni in soggetti predisposti (es.: familiari di affetti) prim'ancora che sviluppino la patologia; sicchè si potrebbe agire preventivamente con follow-up ed una gestione dedicata.

Inoltre questa ricerca ci orienta verso futuri studi che individuino sottogruppi diagnostici all'interno dello spettro bipolare-schizofrenico, i miRNA potrebbero un giorno essere utilizzati come marker di malattia (concettualmente al pari della A β 1-42, t-tau and p-tau nel morbo di Alzheimer)(98). Oltre che aprire la strada a nuove possibili strategie di intervento terapeutico.

9. BIBLIOGRAFIA

1. Halliday D, Resnick R, Walker J. *Fundamentals of physics*. 5th Edition. John Wiley & Sons, New York. 1997.
2. Ritsner M. *Handbook of schizophrenia spectrum disorders, Vol I: Conceptual issues and nosological advances*. 1st edition. Springer, London. 2011.
3. Pancheri P, Cassano GB. *Trattato italiano di psichiatria*. Milano; Parigi; Barcellona: Masson; 1999.
4. Merikangas KR, Akiskal HS, Angst J, Greenberg PE, Hirschfeld RMA, Petukhova M, et al. Lifetime and 12-Month Prevalence of Bipolar Spectrum Disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*. 1 maggio 2007;64(5):543.
5. McGrath J, Saha S, Chant D, Welham J. Schizophrenia: A Concise Overview of Incidence, Prevalence, and Mortality. *Epidemiol Rev*. 14 maggio 2008;30(1):67–76.
6. Lichtenstein P, Yip BH, Björk C, Pawitan Y, Cannon TD, Sullivan PF, et al. Common genetic determinants of schizophrenia and bipolar disorder in Swedish families: a population-based study. *The Lancet*. gennaio 2009;373(9659):234–9.
7. Berrettini W. Evidence for Shared Susceptibility in Bipolar Disorder and Schizophrenia. *Am J Med Genet - Semin Med Genet*. Published online 2003. doi:10.1002/ajmg.c.20014.
8. Malaspina D, Owen MJ, Heckers S, Tandon R, Bustillo J, Schultz S, et al. Schizoaffective Disorder in the DSM-5. *Schizophr Res*. ottobre 2013;150(1):21–5.
9. Vieta E, Phillips ML. Deconstructing Bipolar Disorder: A Critical Review of its Diagnostic Validity and a Proposal for DSM-V and ICD-11. *Schizophr Bull*. 15 marzo 2007;33(4):886–92.
10. Kristian Hill S, Reilly JL, Keefe RSE, et al. Neuropsychological impairments in schizophrenia and psychotic Bipolar disorder Findings from the Bipolar-Schizophrenia Network on Intermediate Phenotypes (B-SNIP) study. *Am J Psychiatry*. Published online 2013. doi:10.1176/appi.ajp.2013.12101298:
11. Assion HJ, Schweppe A, Reinbold H, Frommberger U. Pharmacological treatment for schizoaffective disorder: A comparison with schizophrenia and bipolar disorder. *Nervenarzt*. gennaio 2019;90(S1):1–8.
12. Kraepelin, Emil DEMENTIA PRAECOX AND PARAPHRENIA, *The Journal of Nervous and Mental Disease*: October 1921 - Volume 54 - Issue 4 - p 384.
13. Kelsoe JR. Arguments for the genetic basis of the bipolar spectrum. *J Affect Disord*. Published online 2003. doi:10.1016/S0165-0327(02)00323-3.
14. Craddock N, O'Donovan MC, Owen MJ. The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: Dissecting psychosis. *J Med Genet*. Published online 2005. doi:10.1136/jmg.2005.030718.
15. Gottesman II, Gould TD. The endophenotype concept in psychiatry: Etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry*. Published online 2003. doi:10.1176/appi.ajp.160.4.636.

16. The Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet.* ottobre 2011;43(10):969–76.
17. Erk S, Meyer-Lindenberg A, Schmierer P, Mohnke S, Grimm O, Garbusow M, et al. Hippocampal and Frontolimbic Function as Intermediate Phenotype for Psychosis: Evidence from Healthy Relatives and a Common Risk Variant in *CACNA1C*. *Biol Psychiatry.* settembre 2014;76(6):466–75.
18. Perrier E, Pompei F, Ruberto G, Vassos E, Collier D, Frangou S. Initial evidence for the role of *CACNA1C* on subcortical brain morphology in patients with bipolar disorder. *Eur Psychiatry.* aprile 2011;26(3):135–7.
19. Honea R, Verchinski BA, Pezawas L, Kolachana BS, Callicott JH, Mattay VS, et al. Impact of interacting functional variants in *COMT* on regional gray matter volume in human brain. *NeuroImage.* marzo 2009;45(1):44–51.
20. Qu M, Tang F, Yue W, Ruan Y, Lu T, Liu Z, et al. Positive association of the *Disrupted-in-Schizophrenia-1* gene (*DISC1*) with schizophrenia in the Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5 aprile 2007;144B(3):266–70.
21. Blackwood DHR, Fordyce A, Walker MT, St. Clair DM, Porteous DJ, Muir WJ. Schizophrenia and Affective Disorders—Cosegregation with a Translocation at Chromosome 1q42 That Directly Disrupts Brain-Expressed Genes: Clinical and P300 Findings in a Family. *Am J Hum Genet.* agosto 2001;69(2):428–33.
22. Andreasen NC, Wilcox MA, Ho BC, Epping E, Ziebell S, Zeien E, et al. Statistical epistasis and progressive brain change in schizophrenia: an approach for examining the relationships between multiple genes. *Mol Psychiatry.* novembre 2012;17(11):1093–102.
23. Prata DP, Mechelli A, Fu CHY, Picchioni M, Kane F, Kalidindi S, et al. Effect of *disrupted-in-schizophrenia-1* on pre-frontal cortical function. *Mol Psychiatry.* ottobre 2008;13(10):915–7.
24. Patel VS, Kelly S, Wright C, et al. *MIR137HG* risk variant rs1625579 genotype is related to corpus callosum volume in schizophrenia. *Neurosci Lett.* Published online 2015. doi:10.1016/j.neulet.2015.06.039.
25. Tan HY, Chen AG, Chen Q, Browne LB, Verchinski B, Kolachana B, et al. Epistatic interactions of *AKT1* on human medial temporal lobe biology and pharmacogenetic implications. *Mol Psychiatry.* ottobre 2012;17(10):1007–16.
26. Blasi G, Napolitano F, Ursini G, Taurisano P, Romano R, Caforio G, et al. *DRD2/AKT1* interaction on D2 c-AMP independent signaling, attentional processing, and response to olanzapine treatment in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci.* 18 gennaio 2011;108(3):1158–63.
27. Numakawa T, Yagasaki Y, Ishimoto T, et al. Evidence of novel neuronal functions of dysbindin, a susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet.* Published online 2004. doi:10.1093/hmg/ddh280.
28. Clapcote SJ, Lipina T V., Millar JK, et al. Behavioral Phenotypes of *Disc1* Missense Mutations in Mice. *Neuron.* Published online 2007. doi:10.1016/j.neuron.2007.04.015.
29. Kéri S, Seres I, Kelemen O, Benedek G. Neuregulin 1-stimulated phosphorylation of *AKT* in psychotic disorders and its relationship with neurocognitive functions. *Neurochem Int.* Published online 2009.

doi:10.1016/j.neuint.2009.06.002.

30. Mao Y, Ge X, Frank CL, et al. Disrupted in Schizophrenia 1 Regulates Neuronal Progenitor Proliferation via Modulation of GSK3 β /Catenin Signaling. *Cell*. Published online 2009. doi:10.1016/j.cell.2008.12.044.
31. Tomiyama H, Kokubo Y, Sasaki R, et al. Mutation analyses in amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula, Japan. *Mov Disord*. Published online 2008. doi:10.1002/mds.22262.
32. Hernández F, Borrell J, Guaza C, Avila J, Lucas JJ. Spatial learning deficit in transgenic mice that conditionally over-express GSK-3 β in the brain but do not form tau filaments. *J Neurochem*. Published online 2002. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01269.x.
33. King MR, Anderson NJ, Guernsey LS, Jolivald CG. Glycogen synthase kinase-3 inhibition prevents learning deficits in diabetic mice. *J Neurosci Res*. aprile 2013;91(4):506–14.
34. Guo W, Murthy AC, Zhang L, Johnson EB, Schaller EG, Allan AM, et al. Inhibition of GSK3 improves hippocampus-dependent learning and rescues neurogenesis in a mouse model of fragile X syndrome. *Hum Mol Genet*. 1 febbraio 2012;21(3):681–91.
35. Ances BM, Letendre SL, Alexander T, Ellis RJ. Role of psychiatric medications as adjunct therapy in the treatment of HIV associated neurocognitive disorders. *Int Rev Psychiatry*. gennaio 2008;20(1):89–93.
36. Cohen MX. Hippocampal-Prefrontal Connectivity Predicts Midfrontal Oscillations and Long-Term Memory Performance. *Curr Biol*. novembre 2011;21(22):1900–5.
37. Blasi G, Napolitano F, Ursini G, et al. Association of GSK-3 β genetic variation with GSK-3 β expression, prefrontal cortical thickness, prefrontal physiology, and schizophrenia. *Am J Psychiatry*. Published online 2013. doi:10.1176/appi.ajp.2012.12070908.
38. B.A. V, B. I, C. G, et al. Effects of a common variant in GSK3beta on hippocampal volume in healthy human volunteers. *Neuropsychopharmacology*. Published online 2010.
39. Inkster B, Simmons A, Cole JH, et al. Unravelling the GSK3 β -related genotypic interaction network influencing hippocampal volume in recurrent major depressive disorder. *Psychiatr Genet*. Published online 2018. doi:10.1097/YPG.0000000000000203.
40. Tao R, Cousijn H, Jaffe AE, et al. Expression of ZNF804A in human brain and alterations in schizophrenia, bipolar disorder, and major depressive disorder a novel transcript fetally regulated by the psychosis risk variant rs1344706. *JAMA Psychiatry*. Published online 2014. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.1079.
41. Brown RS. Zinc finger proteins: Getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol*. Published online 2005. doi:10.1016/j.sbi.2005.01.006.
42. Deans PJM, Raval P, Sellers KJ, et al. Psychosis Risk Candidate ZNF804A Localizes to Synapses and Regulates Neurite Formation and Dendritic Spine Structure. *Biol Psychiatry*. Published online 2017. doi:10.1016/j.biopsych.2016.08.038.
43. Konopaske GT, Lange N, Coyle JT, Benes FM. Prefrontal cortical dendritic spine pathology in schizophrenia and bipolar disorder. *JAMA Psychiatry*. Published online 2014. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.1582.

44. Lencz T, Szeszko PR, Derosse P, et al. A schizophrenia risk gene, ZNF804A, influences neuroanatomical and neurocognitive phenotypes. *Neuropsychopharmacology*. Published online 2010. doi:10.1038/npp.2010.102.
45. Voineskos AN, Lerch JP, Felsky D, et al. The ZNF804A gene: Characterization of a novel neural risk mechanism for the major psychoses. *Neuropsychopharmacology*. Published online 2011. doi:10.1038/npp.2011.72.
46. Esslinger C, Walter H, Kirsch P, et al. Neural mechanisms of a genome-wide supported psychosis variant. *Science* (80-). Published online 2009. doi:10.1126/science.1167768.
47. Rasetti R, Sambataro F, Chen Q, Callicott JH, Mattay VS, Weinberger DR. Altered cortical network dynamics: A potential intermediate phenotype for schizophrenia and association with ZNF804A. *Arch Gen Psychiatry*. Published online 2011. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2011.103.
48. Zhang Z, Chen X, Yu P, et al. Effect of rs1344706 in the ZNF804A gene on the connectivity between the hippocampal formation and posterior cingulate cortex. *Schizophr Res*. Published online 2016. doi:10.1016/j.schres.2015.11.024.
49. Zhang J, Wu X, Diao F, et al. Association analysis of ZNF804A (zinc finger protein 804A) rs1344706 with therapeutic response to atypical antipsychotics in first-episode Chinese patients with schizophrenia. *Compr Psychiatry*. Published online 2012.
50. Willemsen MH, Valles A, Kirkels LAMH, Mastebroek M, Olde Loohuis N, Kos A, et al. Chromosome 1p21.3 microdeletions comprising DPYD and MIR137 are associated with intellectual disability. *J Med Genet*. 1 dicembre 2011;48(12):810–8.
51. Smrt RD, Szulwach KE, Pfeiffer RL, Li X, Guo W, Pathania M, et al. MicroRNA miR-137 Regulates Neuronal Maturation by Targeting Ubiquitin Ligase Mind Bomb-1. *Stem Cells*. 1 giugno 2010;28(6):1060–70.
52. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: a genome-wide analysis. *The Lancet*. aprile 2013;381(9875):1371–9.
53. Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics Consortium. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. luglio 2014;511(7510):421–7.
54. Hommers LG, Domschke K, Deckert J. Heterogeneity and Individuality: microRNAs in Mental Disorders. *J Neural Transm*. gennaio 2015;122(1):79–97.
55. Warburton A, Breen G, Bubb VJ, Quinn JP. A GWAS SNP for Schizophrenia Is Linked to the Internal MIR137 Promoter and Supports Differential Allele-Specific Expression. *Schizophr Bull*. luglio 2016;42(4):1003–8.
56. Beveridge NJ, Gardiner E, Carroll AP, Tooney PA, Cairns MJ. Schizophrenia is associated with an increase in cortical microRNA biogenesis. *Mol Psychiatry*. dicembre 2010;15(12):1176–89.
57. Miller BH, Zeier Z, Xi L, Lanz TA, Deng S, Strathmann J, et al. MicroRNA-132 dysregulation in schizophrenia has implications for both neurodevelopment and adult brain function. *Proc Natl Acad Sci*. 21 febbraio 2012;109(8):3125–30.
58. Perkins DO, Jeffries CD, Jarskog LF, Thomson JM, Woods K, Newman MA, et al. microRNA expression in the prefrontal cortex of individuals with schizophrenia and schizoaffective disorder. *Genome Biol*. 2007;8(2):R27.

59. Lett TA, Chakavarty MM, Felsky D, Brandl EJ, Tiwari AK, Gonçalves VF, et al. The genome-wide supported microRNA-137 variant predicts phenotypic heterogeneity within schizophrenia. *Mol Psychiatry*. aprile 2013;18(4):443–50.
60. Liu B, Zhang X, Hou B, Li J, Qiu C, Qin W, et al. The Impact of MIR137 on Dorsolateral Prefrontal–Hippocampal Functional Connectivity in Healthy Subjects. *Neuropsychopharmacology*. agosto 2014;39(9):2153–60.
61. Ma G, Yin J, Fu J, Luo X, Zhou H, Tao H, et al. Association of a miRNA-137 Polymorphism with Schizophrenia in a Southern Chinese Han Population. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1–8.
62. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. settembre 2008;455(7209):58–63.
63. Wright C, Turner JA, Calhoun VD, Perrone-Bizzozero N. Potential Impact of miR-137 and Its Targets in Schizophrenia. *Front Genet [Internet]*. 2013 [citato 20 aprile 2022];4. Disponibile su: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2013.00058/abstract>
64. Kwon E, Wang W, Tsai LH. Validation of schizophrenia-associated genes CSMD1, C10orf26, CACNA1C and TCF4 as miR-137 targets. *Mol Psychiatry*. gennaio 2013;18(1):11–2.
65. Balaguer F, Link A, Lozano JJ, Cuatrecasas M, Nagasaka T, Boland CR, et al. Epigenetic Silencing of miR-137 Is an Early Event in Colorectal Carcinogenesis. *Cancer Res*. 15 agosto 2010;70(16):6609–18.
66. Ha TY. MicroRNAs in Human Diseases: From Autoimmune Diseases to Skin, Psychiatric and Neurodegenerative Diseases. *Immune Netw*. 2011;11(5):227.
67. Amaral, D; Lavenex, P (2007). «Hippocampal neuroanatomy». In Anderson, P; Morris, R; Amaral, D; Bliss, T; I'Keefe (eds.). *The hippocampus book* (first ed.). New York: Oxford University Press. p. 37. ISBN 9780195100273.
68. Martin, JH (2003). «Lymbic system and cerebral circuits for emotions, learning, and memory». *Neuroanatomy: text and atlas* (third ed.). McGraw-Hill Companies. p. 382. ISBN 0-07-121237-X.
69. Waxman SG. The Limbic System In: Lange neuroanatomy. In: *The McGraw-Hill Company*. ; 2013. In.
70. Ranson, S.W. and Clark S.L. 1959 *Anatomy of the Nervous System*, 10th ed. Philadelphia, W. B. Saunders Co.).
71. Lavenex P , Amaral DG:Hippocampal-neocortical interaction: a hierarchy of associativity. *Hippocampus* 2000 10:420–430 Crossref, Medline, Google Scholar.
72. Smith CJ, Johnson BN, Elkind JA, See JM, Xiong G, Cohen AS. Investigations on Alterations of Hippocampal Circuit Function Following Mild Traumatic Brain Injury. *J Vis Exp*. 19 novembre 2012;(69):4411.
73. anastasi giuseppe. *trattato di anatomia umana*.
74. Kessels RPC, de Haan EHF, Kappelle LJ, Postma A. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Rev*. luglio 2001;35(3):295–303.
75. Hou G, Yang X, Yuan TF. Hippocampal Asymmetry: Differences in

- Structures and Functions. *Neurochem Res.* marzo 2013;38(3):453–60.
76. Robinson JL, Barron DS, Kirby LAJ, Bottenhorn KL, Hill AC, Murphy JE, et al. Neurofunctional topography of the human hippocampus. *Hum Brain Mapp.* dicembre 2015;36(12):5018–37.
77. McKenna PJ, Tamlyn D, Lund CE, Mortimer AM, Hammond S, Baddeley AD: Amnesic syndrome in schizophrenia. *Psychol Med*1990; 20:967–972
Crossref, Medline, Google Scholar.
78. Aleman A, Hijman R, De Haan EHF, Kahn RS. Memory impairment in schizophrenia: A meta-analysis. *Am J Psychiatry.* Published online 1999. doi:10.1176/ajp.156.9.1358.
79. Tamminga CA, Stan AD, Wagner AD. The hippocampal formation in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* Published online 2010. doi:10.1176/appi.ajp.2010.09081187.
80. Frey BN, Andreatza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, et al. The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behav Pharmacol.* settembre 2007;18(5–6):419–30.
81. Otten M, Meeter M. Hippocampal structure and function in individuals with bipolar disorder: A systematic review. *J Affect Disord.* marzo 2015;174:113–25.
82. Calhoun VD, Sui J. Multimodal Fusion of Brain Imaging Data: A Key to Finding the Missing Link(s) in Complex Mental Illness. *Biol Psychiatry Cogn Neurosci Neuroimaging.* maggio 2016;1(3):230–44.
83. Sprooten E, Sussmann JE, Clugston A, Peel A, McKirdy J, Moorhead TWJ, et al. White matter integrity in individuals at high genetic risk of bipolar disorder. *Biol Psychiatry.* 15 agosto 2011;70(4):350–6.
84. Lope-Piedrafita S. Diffusion Tensor Imaging (DTI). *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2018;1718:103–16.
85. Stejskal EO, Tanner JE. Spin Diffusion Measurements: Spin Echoes in the Presence of a Time-Dependent Field Gradient. *J Chem Phys.* 1 gennaio 1965;42(1):288–92.
86. Gimenez U, Perles-Barbacaru A-T, Millet A, Appaix F, El-Atifi M, Pernet-Gallay K, et al. Microscopic DTI accurately identifies early glioma cell migration: correlation with multimodal imaging in a new glioma stem cell model. *NMR Biomed.* novembre 2016;29(11):1553–62.
87. Yurgelun-Todd DA, Silveri MM, Gruber SA, Rohan ML, Pimentel PJ. White matter abnormalities observed in bipolar disorder: a diffusion tensor imaging study. *Bipolar Disord.* agosto 2007;9(5):504–12.
88. Mamah D, Ji A, Rutlin J, Shimony JS. White matter integrity in schizophrenia and bipolar disorder: Tract- and voxel-based analyses of diffusion data from the Connectom scanner. *NeuroImage Clin.* 2019;21:101649.
89. Squarcina L, Bellani M, Rossetti MG, Perlini C, Delvecchio G, Dusi N, et al. Similar white matter changes in schizophrenia and bipolar disorder: A tract-based spatial statistics study. *Hu D, curatore. PLOS ONE.* 28 giugno 2017;12(6):e0178089.
90. Pantel J, O’Leary DS, Cretsingher K, et al. A new method for the in vivo volumetric measurement of the human hippocampus with high neuroanatomical accuracy. *Hippocampus.* Published online 2000.
91. Nenadic I, Wagner G, Güllmar D, Schachtzabel C, von Consbruch K,

- Köhler S, et al. ADC changes in schizophrenia: a diffusion-weighted imaging study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* aprile 2011;261(3):213–6.
92. Shenton ME, Dickey CC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res.* aprile 2001;49(1–2):1–52.
93. Nenadić I, Hoof A, Dietzek M, Langbein K, Reichenbach JR, Sauer H, et al. Diffusion tensor imaging of cingulum bundle and corpus callosum in schizophrenia vs. bipolar disorder. *Psychiatry Res Neuroimaging.* agosto 2017;266:96–100.
94. DeLisi LE, Szulc KU, Bertisch H, Majcher M, Brown K, Bappal A, et al. Early detection of schizophrenia by diffusion weighted imaging. *Psychiatry Res Neuroimaging.* novembre 2006;148(1):61–6.
95. Tecelão D, Mendes A, Martins D, Fu C, Chaddock CA, Picchioni MM, et al. The effect of psychosis associated CACNA1C, and its epistasis with ZNF804A, on brain function. *Genes Brain Behav.* aprile 2019;18(4):e12510.
96. López-Jaramillo C, Vargas C, Díaz-Zuluaga AM, Palacio JD, Castrillón G, Bearden C, et al. Increased hippocampal, thalamus and amygdala volume in long-term lithium-treated bipolar I disorder patients compared with unmedicated patients and healthy subjects. *Bipolar Disord.* febbraio 2017;19(1):41–9.
97. Mamah D, Harms MP, Barch D, Styner M, Lieberman JA, Wang L. Hippocampal Shape and Volume Changes with Antipsychotics in Early Stage Psychotic Illness. *Front Psychiatry [Internet].* 2012 [citato 30 maggio 2022];3. Disponibile su:
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsy.2012.00096/abstract>
98. Drago V, Babiloni C, Bartrés-Faz D, Caroli A, Bosch B, Hensch T, et al. Disease Tracking Markers for Alzheimer’s Disease at the Prodromal (MCI) Stage. Ashford JW, Rosen A, Adamson M, Bayley P, Sabri O, Furst A, et al., curatori. *J Alzheimers Dis.* 4 ottobre 2011;26(s3):159–99.

10. RINGRAZIAMENTI

Questo studio ha utilizzato dati preliminari ottenuti grazie alla RICERCA SANITARIA FINALIZZATA della Regione Veneto n° 293/08: "GENOTIPI ED ENDOFENOTIPI NEURALI E COGNITIVI NELLE MALATTIE PSICHIATRICHE COMPLESSE AD ESORDIO PRECOCE: UNA RICERCA SUI "COMMON GENES" NEI DISTURBI DELL'UMORE E

SCHIZOFRENIA" (approvata con DGR 1614 del 17/06/2008), in collaborazione con Clinica Psichiatrica, Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi di Padova; Unità di Psichiatria, Dipartimento di Salute Mentale, Azienda ULSS 7 Pieve di Soligo; IRCSS E. Medea - La Nostra Famiglia, Conegliano.