

## **PROGETTO DI RICERCA E PIANO DI ATTIVITA'**

### **Titolo del progetto**

Analisi del ciclo dei folati e delle basi biologiche della disabilità intellettiva nella sindrome di Down per identificare nuovi bersagli terapeutici

Proponente: Prof.ssa maria Chiara Pelleri

### **Argomenti di ricerca ed esigenze che spingono verso tale argomento**

Sebbene la sindrome di Down (SD) sia la forma più frequente di disabilità intellettiva caratterizzata da una aberrazione cromosomica, la sua patogenesi molecolare è ancora sconosciuta. I sintomi sono attribuiti ad effetti di dosaggio genico per geni localizzati sul cromosoma 21, presente in tre copie nei soggetti con la sindrome. Ad oggi, nessun trattamento per la sindrome di Down si è dimostrato efficace nel migliorare lo sviluppo psicomotorio nei bambini più piccoli, e il livello cognitivo dei bambini più grandi. La disabilità intellettiva rappresenta il principale problema del bambino e della famiglia, e si manifesta in modo caratteristico con deficit della produzione verbale e del pensiero astratto, diminuendo fortemente l'autonomia delle persone con SD, circa 38.000 in Italia e 6 milioni nel mondo.

Lo scopo di questo progetto è quello di studiare le basi biologiche della disabilità intellettiva nei bambini con SD, verificando se esista una correlazione metabolica con tale deficit cognitivo e quali siano le comorbidità che influiscono maggiormente nella suddetta condizione. In particolare, recenti studi hanno evidenziato numerose alterazioni metaboliche tipiche della SD, correlate a disfunzioni nella produzione di energia cellulare e del ciclo dei mono-carboni, che si è rivelato fondamentale per la biologia dell'intelligenza, in quanto molte malattie genetiche che si manifestano con disabilità intellettiva sono associate a mutazioni di geni codificanti per enzimi implicati in tale via metabolica.

Alla luce di queste evidenze, il presente progetto di ricerca si propone di effettuare una raccolta sistematica di dati clinici, dati cognitivi e dati relativi alla quantificazione dei metaboliti del ciclo dei mono-carboni, in particolare del ciclo dei folati, nel plasma di bambini con SD e soggetti di controllo. Con tali dati sarà possibile identificare correlazioni significative tra deficit cognitivo e alterazioni di specifici metaboliti per identificare nuovi bersagli terapeutici.

### **Obiettivo scientifico della ricerca**

Il presente progetto di ricerca si propone di effettuare una raccolta sistematica di dati clinici, dati cognitivi e dati relativi alla quantificazione dei metaboliti del ciclo dei mono-carboni, in particolare del ciclo dei folati, nel plasma di bambini con SD e soggetti di controllo.

Verranno poi effettuate analisi multiple dei dati per la ricerca di possibili correlazioni utili ad identificare percorsi terapeutico-assistenziali. In particolare: 1) analisi delle differenze statisticamente significative dei metaboliti del ciclo dei folati tra campioni trisomici e di controllo; 2) analisi di correlazione tra punteggi ottenuti dai test cognitivi e concentrazione dei metaboliti del ciclo dei folati nei soggetti con trisomia 21; 3) Analisi di correlazione tra punteggi ottenuti dai test cognitivi e dati anamnestici raccolti durante la visita di valutazione nei soggetti con trisomia 21, con particolare riferimento alla presenza di comorbidità e alla partecipazione a terapie volte al potenziamento neuro-cognitivo (es. fisioterapia, psicomotricità, logopedia).

Con tali dati sarà possibile identificare correlazioni significative tra deficit cognitivo e alterazioni di specifici metaboliti per identificare nuovi bersagli terapeutici.

### **Ipotesi di ricaduta applicativa e dati quantitativi sui potenziali beneficiari**

La caratterizzazione del ciclo dei folati e di possibili correlazioni con il deficit cognitivo in bambini con SD, sono la base razionale fondamentale perchè possano attivarsi nuovi *trials* clinici volti alla somministrazione di intermedi del ciclo dei folati per il miglioramento di sviluppo psicomotorio e abilità cognitive di bambini con SD.

Altri Autori hanno ipotizzato che composti correlati all'Acido Folico potessero influire positivamente sullo sviluppo psicomotorio dei bambini con sindrome di Down (Ellis et al., 2008; Blehaut et al., 2010; Mircher et al., 2020). Tuttavia, nessuna differenza significativa al riguardo si è evidenziata nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo, usando Acido Folico (Ellis et al., 2008) o acido folinico (5-formil-THF, 5-f-THF) (Blehaut et al., 2010; Mircher et al., 2020).

Nostri dati preliminari (Vione et al., 2021, preprint già disponibile in bioRxiv; in corso di invio per la pubblicazione su rivista) mostrano come vi sia un netto sbilanciamento del ciclo dei folati nei bambini con SD. Vi sono inoltre premesse significative che permettono di identificare uno di questi metaboliti, l'acido 5-metil-tetraidrofolico (5-metil-THF o 5-m-THF) come il miglior candidato per una sperimentazione clinica tesa a normalizzare i livelli plasmatici dei metaboliti del ciclo dei mono-carboni che abbiamo trovato alterati, in particolare del THF ed eventualmente della SAH, al fine di verificarne l'effetto positivo sullo sviluppo psicomotorio e sulle abilità cognitive dei bambini con SD.

La prima ricaduta applicativa del presente progetto sarà la caratterizzazione del ciclo dei folati, con dati relativi a circa 200 soggetti con SD e 100 controlli. Inoltre, tale progetto permetterà di consolidare metodi e risultati alla base del futuro *trial* in quanto verranno applicati gli stessi passaggi da trasferire al *trial* clinico (arruolamento, raccolta dati clinici, raccolta dei campioni di plasma e analisi dei metaboliti attraverso saggi ELISA, test cognitivi e analisi delle possibili correlazioni). Il *trial* clinico è in fase di progettazione e verrà presentato al Comitato Etico entro l'anno.

### **Attività progettuali e piano temporale**

#### *Attività 1*

##### *Raccolta dei dati clinici di bambini con sindrome di Down*

Il presente progetto di ricerca proposto si colloca nell'ambito di un ampio progetto dal titolo "Correlazione tra genotipo e fenotipo nella trisomia 21 (sindrome di Down)" coordinato dal Prof. Pierluigi Strippoli e già approvato dal Comitato Etico Indipendente di Area Vasta Emilia Centro (CE-AVEC) della Regione Emilia-Romagna con sede presso l'Azienda Ospedaliero – Universitaria di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi (codice progetto: 39/2013/U/Tess). Sono già disponibili dati preliminari riguardati 153 soggetti con sindrome di Down (SD) e 54 controlli (Vione et al., 2021, preprint già disponibile in bioRxiv) e si prevede di implementare i dati già disponibili e il numero di soggetti coinvolti fino a circa 200 soggetti con SD e 100 controlli. I soggetti con SD sono soggetti di età pediatrica compresa tra 6 mesi e 18 anni seguiti dalla Dott.ssa Chiara Locatelli, presso l'Ambulatorio specialistico malattie rare dell'Unità Operativa (UO) di Neonatologia (Direttore Prof. Luigi Corvaglia), IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria (AOU) di Bologna, Policlinico di Sant'Orsola. Previa firma dei moduli di consenso informato, verrà effettuata una visita di valutazione generale nell'ambito del follow-up annuale che prevede esame obiettivo standard (auscultazione del cuore, dei polmoni, palpazione dell'addome e valutazione delle membrane timpaniche e del cavo orale) e raccolta dei dati anamnestici.

Tempistica: Gennaio 2023-Agosto 2023

#### **Bibliografia:**

Vione B, Locatelli C, Zavaroni G, Piano A, La Rocca G, Caracausi M, Vitale L, Piovesan A, Gori C, Pirazzoli GL, Strippoli P, Cocchi G, Ramacieri G, Pelleri MC, Antonaros F. Folate pathway

metabolites are altered in the plasma of subjects with Down syndrome: relation to chromosomal dosage. bioRxiv 2021.11.30.470411; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.30.470411>

### *Attività 2*

#### *Raccolta e processamento dei campioni di plasma*

Durante la visita di follow-up, i bambini con SD per i quali sono stati raccolti i dati clinici verranno sottoposti a prelievo di sangue venoso periferico. Tale prelievo rientra nelle analisi previste dalla visita ordinaria ed è sufficiente affinché una aliquota di circa 2 mL venga trasferita al Laboratorio di Genomica (DIMES, Università di Bologna) presso il quale verrà processato il campione e conservato il plasma per le analisi successive. I criteri di inclusione sono: diagnosi di sindrome di Down con trisomia 21 omogenea o mosaico, disponibilità di una adeguata quantità di plasma per effettuare le analisi successive e una età media il più vicina possibile a quella del gruppo controllo. Contestualmente, verranno arruolati anche soggetti di controllo, selezionati tra fratelli e sorelle dei bambini con SD coinvolti nello studio. I criteri di inclusione sono: assenza di anomalie cromosomiche, disponibilità di una adeguata quantità di plasma per effettuare le analisi successive e una età media il più vicina possibile a quella del gruppo SD. Per entrambi i gruppi, il soggetto reclutato o i genitori/tutori legali firmeranno un consenso informato e compileranno una scheda riguardante lo stato di digiuno, la descrizione dell'ultimo pasto effettuato ed eventuali assunzioni di medicinali/integratori al momento del prelievo. I campioni di sangue verranno trasportati e processati in laboratorio entro le 2 ore dal prelievo. Il plasma verrà isolato seguendo protocolli standard (Antonaros et al. 2020) e verranno esclusi dall'analisi campioni di plasma contaminati con eritrociti residui. Tutti i campioni di plasma verranno schedati e conservati a -80°C. Parallelamente alla raccolta dei dati clinici, sono già stati raccolti campioni da 153 soggetti con SD e 54 controlli e si prevede di implementare i dati già disponibili e il numero di soggetti coinvolti fino a circa 200 soggetti con SD e 100 controlli.

Tempistica: Gennaio 2023-Agosto 2023

#### Bibliografia:

Antonaros F, Ghini V, Pulina F, Ramacieri G, Cicchini E, Mannini E, Martelli A, Feliciello A, Lanfranchi S, Onnivello S, Vianello R, Locatelli C, Cocchi G, Pelleri MC, Vitale L, Strippoli P, Luchinat C, Turano P, Piovesan A, Caracausi M, (2020). Plasma metabolome and cognitive skills in Down syndrome.. SCIENTIFIC REPORTS. 10 (1)

### *Attività 3*

#### *Analisi dei metaboliti del ciclo del folato attraverso saggi ELISA*

I campioni di plasma di soggetti SD e controllo vengono analizzati in piastre da 96 pozzetti, in duplicato, attraverso saggi ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) per misurare i livelli di concentrazione plasmatica dei seguenti metaboliti coinvolti nel ciclo dei mono-carboni: tetraidrofolato (THF), 5-metil-tetraidrofolato (5-mTHF), 5-formil-tetraidrofolato (5-f-THF), S-adenosilmetionina (SAM) e S-adenosilomocisteina (SAH). Parallelamente alla raccolta dei dati clinici, sono già disponibili dati preliminari riguardanti 153 soggetti SD e 54 controlli e si prevede di implementare i dati già disponibili e il numero di soggetti coinvolti fino a circa 200 soggetti con SD e 100 controlli (Vione et al., 2021, preprint già disponibile in bioRxiv).

Tempistica: Gennaio 2023-Dicembre 2023

#### Bibliografia:

Vione B, Locatelli C, Zavaroni G, Piano A, La Rocca G, Caracausi M, Vitale L, Piovesan A, Gori C, Pirazzoli GL, Strippoli P, Cocchi G, Ramacieri G, Pelleri MC, Antonaros F. Folate pathway metabolites are altered in the plasma of subjects with Down syndrome: relation to chromosomal dosage. bioRxiv 2021.11.30.470411; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.30.470411>

#### *Attività 4*

##### *Valutazioni dello sviluppo psicomotorio e delle abilità cognitive*

Ai genitori dei bambini con SD verrà chiesta la disponibilità a recarsi presso l'Università di Padova entro due mesi dal prelievo, per effettuare test cognitivi volti alla valutazione dello sviluppo psicomotorio e delle abilità cognitive del bambino. Previa firma del consenso informato, si svolgerà un colloquio con gli Psicologi del Dipartimento di Psicologia dello Sviluppo e della Socializzazione (DPSS) dell'Università di Padova, (Prof.ssa Silvia Lanfranchi e Dott.ssa Francesca Pulina), durante il quale verrà proposto un test ai bambini partecipanti (test di Griffiths per i bambini di età da 6 mesi a 6.11 anni, e la scala WPPSI-III, la scala di Leiter e i test della batteria per la valutazione del linguaggio (BVL) per i bambini dai 7 agli 17.11 anni); inoltre, saranno proposti ai genitori tre questionari (scala Vineland, scala "Developmental profile 4", e questionario di primo vocabolario del bambino). Tali test sono stati validati a livello nazionale e sono utilizzati dagli psicologi per valutazioni di routine (Pulina et al. 2019; Green et al. 2016; Wechsler et al. 2002)

Dati preliminari sono già disponibili per 66 bambini con SD compresi tra i 153 per i quali sono stati raccolti dati clinici (Attività 1) e metabolici (Attività 2 e 3).

Tempistica: Gennaio 2023-Dicembre 2023

#### Bibliografia:

Pulina, F., Vianello, R. & Lanfranchi, S. In State of the Art of Research on Down Syndrome Vol. 56 (ed S. Lanfranchi) 67–92 (Academic Press, 2019).

Green, E. et al. Griffiths scales of child development, third edition (Griffiths III) (2016).

Wechsler, D. W. Preschool and Primary Scale of Intelligence-Third edition. WPPSI-III. (2002).

#### *Attività 5*

##### *Analisi dei dati e ricerca di possibili correlazioni utili ad identificare percorsi terapeutico-assistenziali*

1) *Analisi delle differenze statisticamente significative dei metaboliti del ciclo dei folati tra campioni trisomici e di controllo.* Verranno utilizzati strumenti di analisi statistica presenti nel pacchetto SPSS Statistics (IBM, Version 25 for Mac OS X). Saranno considerate correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte. 2) *Analisi di correlazione tra punteggi ottenuti dai test cognitivi e concentrazione dei metaboliti del ciclo dei folati nei soggetti con trisomia 21.* Verranno utilizzati strumenti di analisi statistica presenti nel pacchetto SPSS Statistics (IBM, Version 25 for Mac OS X). Saranno considerate correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte. 3) *Analisi di correlazione tra punteggi ottenuti dai test cognitivi e dati anamnestici raccolti durante la visita di valutazione nei soggetti con trisomia 21, con particolare riferimento alla presenza di comorbidità e alla partecipazione a terapie volte al potenziamento neuro-cognitivo (es. fisioterapia, psicomotricità, logopedia).* Saranno considerate

correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte.

Tempistica: Ottobre 2023-Dicembre 2023

## **Descrizione e dimensionamento dei campioni di indagine**

Il presente progetto verrà proposto a circa 200 soggetti con SD e 100 soggetti di controllo e verrà svolto nell'ambito dello studio già approvato dal Comitato etico Indipendente di Area Vasta Emilia Centro (CE-AVEC) della Regione Emilia-Romagna con sede presso l'Azienda Ospedaliero – Universitaria di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi (codice progetto: 39/2013/U/Tess).

Tale progetto vede già 318 persone arruolate (236 con SD e 82 controlli arruolati tra fratelli e sorelle dei bambini con SD). 153 persone con SD hanno già effettuato raccolta dei dati clinici e misurazione dei metaboliti nel plasma; di queste, 66 hanno già effettuato anche i test cognitivi.

Occorre quindi implementare la casistica e completare le analisi dove mancanti.

Verrà proposto di aderire allo studio partecipando alle seguenti fasi:

- visita di valutazione generale nell'ambito del follow-up annuale e raccolta di dati clinici e anamnestici
- prelievo di sangue venoso periferico da effettuarsi nell'ambito del follow-up annuale
- valutazioni dello sviluppo psicomotorio e delle abilità cognitive effettuando test cognitivi presso l'Università di Padova (Prof.ssa Lanfranchi) entro due mesi dal prelievo

Il soggetto reclutato o i genitori/tutori legali firmeranno i consensi informati relativi alle tre fasi del progetto e compileranno una scheda riguardante lo stato di digiuno, la descrizione dell'ultimo pasto effettuato ed eventuali assunzioni di medicinali/integratori al momento del prelievo.

I soggetti con SD sono soggetti di età pediatrica compresa tra 6 mesi e 18 anni seguiti dalla Dott.ssa Chiara Locatelli, presso l'Ambulatorio specialistico malattie rare dell'Unità Operativa (UO) di Neonatologia (Direttore Prof. Luigi Corvaglia), IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria (AOU) di Bologna, Policlinico di Sant'Orsola. I criteri di inclusione sono: diagnosi di sindrome di Down con trisomia 21 omogenea o mosaico, disponibilità di una adeguata quantità di plasma per effettuare le analisi successive e una età media il più vicina possibile a quella del gruppo controllo. Contestualmente, verranno arruolati anche soggetti di controllo, selezionati tra fratelli e sorelle dei bambini con SD coinvolti nello studio. I criteri di inclusione sono: assenza di anomalie cromosomiche, disponibilità di una adeguata quantità di plasma per effettuare le analisi successive e una età media il più vicina possibile a quella del gruppo SD.

## **Metodologia di analisi dei dati**

*1) Analisi delle differenze statisticamente significative dei metaboliti del ciclo dei folati tra campioni trisomici e di controllo.* Verranno utilizzati strumenti di analisi statistica presenti nel pacchetto SPSS Statistics (IBM, Version 25 for Mac OS X). Saranno considerate correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte. *2) Analisi di correlazione tra punteggi ottenuti dai test cognitivi e concentrazione dei metaboliti del ciclo dei folati nei soggetti con trisomia 21.* Verranno utilizzati strumenti di analisi statistica presenti nel pacchetto SPSS Statistics (IBM, Version 25 for Mac OS X). Saranno considerate correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte. *3) Analisi di correlazione tra punteggi ottenuti*

dai test cognitivi e dati anamnestici raccolti durante la visita di valutazione nei soggetti con trisomia 21, con particolare riferimento alla presenza di comorbidità e alla partecipazione a terapie volte al potenziamento neuro-cognitivo (es. fisioterapia, psicomotricità, logopedia). Saranno considerate correlazioni statisticamente significative quelle con  $p\text{-value} < 0.05$ . Un valore  $r < 0.4$  sarà considerato corrispondente a una correlazione debole, un valore  $0.4 < r < 0.7$  a una correlazione moderata e un valore  $r > 0.7$  a una correlazione forte.

### **Iniziative di divulgazione previste**

- Partecipazione a Congressi scientifici nazionali (Congressi biennali dell'Associazione Italiana di Biologia e Genetica – AIBG; Convegno nazionale annuale “Sindrome di Down dalla diagnosi alla terapia”) e internazionali (Conferenza biennale della Trisomy 21 Research Society - T21RS; Conferenza della European Society of Human Genetics - ESHG)
- Percorsi per le Competenze Trasversali e l'Orientamento (PCTO) nelle scuole, in collaborazione con AlmaOrienta
- Iniziative di divulgazione scientifica in collaborazione con l' Ufficio Public engagement per la divulgazione scientifica e culturale di Unibo, associazioni, famiglie e privati

### **Prospettive della ricerca o dello studio dopo la fine del periodo finanziato**

I dati ottenuti grazie al presente progetto andrebbero a implementare e completare i dati preliminari ad oggi disponibili (Vione et al., 2021, preprint già disponibile in bioRxiv) e costituirebbero la base razionale della proposta in fase di progettazione di un *trial* clinico per lo studio dell'effetto del 5-metil-tetraidrofolato (5-m-THF) sullo sviluppo psicomotorio e sulle abilità cognitive di bambini con SD. Tutte le attività precedentemente descritte verrebbero trasferite come metodologia al trial clinico. Il *trial* clinico verrà presentato al Comitato Etico Indipendente di Area Vasta Emilia Centro (CE-AVEC) della Regione Emilia-Romagna con sede presso l'Azienda Ospedaliero – Universitaria di Bologna, Policlinico S.Orsola-Malpighi entro l'anno. Vi sono già infatti numerose evidenze che rendono ragione di tale proposta e le elenchiamo di seguito per contestualizzare tale progetto all'interno di un percorso già avviato e che ci ha permesso di avere già numerosi dati preliminari. Il completamento di tale studio e la formazione di una figura professionale dedicata grazie al cofinanziamento di una borsa di studio, sarebbero passi fondamentali per concludere il consolidamento di metodi e risultati alla base del futuro *trial*, in quanto verranno applicati gli stessi passaggi da trasferire al *trial* clinico (arruolamento, raccolta dati clinici, raccolta dei campioni di plasma e analisi dei metaboliti attraverso saggi ELISA, test cognitivi e analisi delle possibili correlazioni).

I risultati ottenuti dal presente progetto completeranno e implementeranno in particolare con le correlazioni ai test cognitivi nostri dati preliminari (Vione et al., 2021, preprint già disponibile in bioRxiv) sul dosaggio immunoenzimatico di vari metaboliti plasmatici del ciclo dell'Acido Folico. Tali dati indicano cambiamenti statisticamente significativi di alcuni metaboliti nei bambini con SD rispetto ai soggetti di controllo euploidi. In particolare, l'acido tetraidrofolico (THF) plasmatico risulta diminuito in media nella proporzione di 2:3, compatibilmente con effetti inibitori dovuti al dosaggio del cromosoma 21 presente in tre copie invece di due, mentre la S-adenosil-Omocisteina (SAH) risulta raddoppiata.

Diversi Autori hanno ipotizzato che composti correlati all'Acido Folico potessero influire positivamente sullo sviluppo psicomotorio dei bambini con sindrome di Down (Ellis et al., 2008; Blehaut et al., 2010; Mircher et al., 2020). Tuttavia, nessuna differenza significativa al riguardo si è evidenziata nel gruppo trattato rispetto al gruppo di controllo, usando Acido Folico (Ellis et al., 2008) o acido folinico (5-formil-THF, 5-f-THF) (Blehaut et al., 2010; Mircher et al., 2020).

Il 5-f-THF è in uso da molto tempo per il trattamento del deficit cerebrale di folato (CFD) ed è correntemente la forma di folato più usata per il trattamento della CFD (Pope et al., 2019). Le citate

sperimentazioni cliniche con acido folinico in bambini con SD non hanno avuto esito positivo in merito al miglioramento dei risultati nei test cognitivi; va rilevato che l'acido 5-metil-tetraidrofolico (5-metil-THF, o 5-m-THF, in forma di 5-metil-tetraidrofolato di glucosamina o di calcio) si è reso disponibile più di recente. Peraltro, i livelli di Acido Folico e acido folinico appaiono normali nei bambini con SD (Antonaros et al., 2021; Vione et al., 2021 preprint già disponibile in bioRxiv).

Recentemente è stato proposto a tale scopo l'uso del 5-m-THF (Li et al. 2008, Knowles et al. 2016), considerato il modo più efficace di normalizzare le concentrazioni di 5-m-THF nel liquor (Pope et al., 2019). Sebbene dai nostri dati la concentrazione plasmatica di 5-m-THF non appaia diminuita nei bambini con SD, va notato che anche soggetti con CFD possono mostrare livelli normali di folato nel sangue periferico (Pope et al., 2019), e che il THF, carente come sopra detto, viene rigenerato anche a partire dal 5-m-THF. È notevole osservare che il 5-m-THF è l'unica forma di folato in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (Ducker e Rabinowitz, 2017) ed è la forma di folato più ridotta. È ben assorbita nel tratto gastrointestinale e la sua disponibilità non è influenzata da ulteriori tappe enzimatiche (Pope et al., 2019). Inoltre, il 5-m-THF è necessario per la formazione della S-adenosil-metionina (SAM) attraverso la rigenerazione della metionina dalla Omocisteina a partire dalla SAH, che dai nostri dati risulta aumentata nel plasma dei bambini con SD. SAM è un potente agente metilante in molte reazioni di biosintesi, e il suo gruppo metilico è il più reattivo nel ciclo dei monocarboni.

Infine, il 5-m-THF è una forma attiva della vitamina B9 ampiamente studiata dal punto di vista farmacologico e sotto il profilo della sicurezza, essendo oggi suggerita anche come la miglior forma di folato per la prevenzione della spina bifida in gravidanza, mentre il THF non è disponibile come integratore o farmaco. Da nostri dati precedenti, il 5-m-THF permette un miglior recupero dal danno da MTX rispetto al THF, in fibroblasti cutanei coltivati in vitro, sia normali sia con trisomia 21 (Vitale et al., 2019).

Per tutte queste ragioni, proponiamo il 5-m-THF come il miglior candidato per una sperimentazione clinica tesa a normalizzare i livelli plasmatici dei metaboliti del ciclo dei monocarboni che vogliamo caratterizzare con il presente progetto, al fine di verificarne l'effetto positivo sullo sviluppo psicomotorio e sulle abilità cognitive dei bambini con sindrome di Down.

#### Bibliografia:

Antonaros F, Lanfranchi S, Locatelli C, Martelli A, Olivucci G, Cicchini E, Carosi Diatricch L, Mannini E, Vione B, Feliciello A, Ramacieri G, Onnivello S, Vianello R, Vitale L, Pelleri MC, Strippoli P, Cocchi G, Pulina F, Piovesan A, Caracausi M. One-carbon pathway and cognitive skills in children with Down syndrome. *Sci Rep* 11:4225, 2021.

Blehaut H, Mircher C, Ravel A, Conte M, de Portzamparc V, Poret G, de Kermadec FH, Rethore MO, Sturtz FG. Effect of leucovorin (folinic acid) on the developmental quotient of children with Down's syndrome (trisomy 21) and influence of thyroid status. *PLoS One*. 5:e8394, 2010. doi: 10.1371/journal.pone.0008394.

Ducker, G.S., and Rabinowitz, J.D. (2017). One-Carbon Metabolism in Health and Disease. *Cell Metab* 25, 27-42.

Ellis JM, Tan HK, Gilbert RE, Muller DP, Henley W, Moy R, Pumphrey R, Ani C, Davies S, Edwards V, Green H, Salt A, Logan S. Supplementation with antioxidants and folinic acid for children with Down's syndrome: randomised controlled trial. *BMJ*, 336:594-597, 2008. doi: 10.1136/bmj.39465.544028.AE

Knowles L, Morris AA, Walter JH. Treatment with Mefolinate (5-Methyltetrahydrofolate), but Not Folic Acid or Folinic Acid, Leads to Measurable 5-Methyltetrahydrofolate in Cerebrospinal Fluid in Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *JIMD Rep* 29, 103-107, 2016.

Li D, Karp N, Wu Q, Wang XL, Melnyk S, James SJ, and Rozen R. Mefolinate (5-methyltetrahydrofolate), but not folic acid, decreases mortality in an animal model of severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 31:403-411, 2008.

Mircher C, Sacco S, Bouis C, Gallard J, Pichot A, Le Galloudec E, Cieuta C, Marey I, Greiner-Mahler O, Dorison N, Gambarini A, Stora S, Durand S, Polak M, Baruchel A, Schlumberger E, Dewailly J, Azar-Kolakez A, Guéant-Rodriguez RM, Guéant JL, Borderie D, Bonnefont-Rousselot D, Blondiaux E, Ravel A, Sturtz FG. Thyroid hormone and folinic acid in young children with Down syndrome: the phase 3 ACTHYF trial. *Genet Med* 22:44-52, 2020.

Pope, S., Artuch, R., Heales, S., and Rahman, S. Cerebral folate deficiency: Analytical tests and differential diagnosis. *J Inherit Metab Dis* 42, 655-672, 2019.

Vione B, Locatelli C, Zavaroni G, Piano A, La Rocca G, Caracausi M, Vitale L, Piovesan A, Gori C, Pirazzoli GL, Strippoli P, Cocchi G, Ramacieri G, Pelleri MC, Antonaros F. Folate pathway metabolites are altered in the plasma of subjects with Down syndrome: relation to chromosomal dosage. *bioRxiv* 2021.11.30.470411; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.30.470411>

Vitale L, Serpieri V, Lauriola M, Piovesan A, Antonaros F, Cicchini E, Locatelli C, Cocchi G, Strippoli P, Caracausi M. Human trisomy 21 fibroblasts rescue methotrexate toxic effect after treatment with 5-methyl-tetrahydrofolate and 5-formyl-tetrahydrofolate. *J Cell Physiol*, Jan 22, 2019.