



**Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
"Saverio de Bellis"**

Ente Ospedaliero Specializzato in Gastroenterologia
via Turi n°27 - 70013 Castellana Grotte - Bari
C.F. – P.IVA: 00565330727
Ente di diritto pubblico D.M. del 31-3-1982



Dasa-Räger
EN ISO 9001:2008
IQ-1208-14

Direzione Scientifica



RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE DELL'ANNO 2017

Direzione Scientifica

LINEA 1

MALATTIE NEOPLASTICHE DEL FEGATO E DEL TUBO DIGERENTE

Per la linea di ricerca n. 1 - “*Malattie neoplastiche del fegato e del tubo digerente*”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2017 sono i seguenti:

Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare

L’attività del Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare è incentrato sullo studio dei meccanismi d’azione di molecole farmacologicamente attive nel regolare i processi di proliferazione, apoptosi e migrazione di cellule tumorali gastrointestinali ed epatiche, *in vitro*, al fine di attuare una terapia a molecolare che possa sostituire chemioterapici ad alta tossicità.

Si esplorano gli effetti di tali molecole, singolarmente ed in combinazione, sui differenti pathways intracellulari che regolano la crescita e la diffusione del tumore.

Inoltre, si studiano le interazioni tra componenti del microambiente tumorale, come i Growth Factors, ed i farmaci target usati nel trattamento dell’HCC e del carcinoma gastrico, al fine di comprendere i fenomeni di resistenza che si manifestano in corsi di progressione di malattia.

Progetto “Effetto dei miRNA piastrinici in linee cellulari umane di epatocarcinoma. Studio in vitro” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott. Aldo Cavallini

Partecipanti: Catia Lippolis (Borsista), Nicola Carella (Borsista)

Sulla base di nostri dati, pubblicati nel 2015, in cui si evidenziavano gli effetti dei fattori di crescita (EGF, VEGF, PDGF, IGF) piastrinici su cellule di epatocarcinoma umano trattate con Regorafenib, si è passati a studiare i microRNA (miRNA) contenuti nelle piastrine di soggetti affetti da HCC. Poiché le piastrine durante il loro isolamento dal sangue intero subiscono un processo di attivazione che consiste nella degranolazione e nel riversare nel medium di separazione parte del loro contenuto di miRNA, si è utilizzato come medium lo iodixanolo che possiede la proprietà di inibire l’attivazione piastrinica. Per poter valutare l’inibizione dell’attivazione piastrinica si è proceduto all’analisi mediante real-time PCR (qPCR) di 5 miRNA (RNU6, miR-146a, miR-16, miR-195, miR-30) che sono spesso utilizzati nel processo di normalizzazione dei livelli sierici dei miRNA. In base ai dati della letteratura e mediante database online (miRBase, miRTarbase) è stato possibile selezionare 49 miRNA. La selezione è stata effettuata considerando che questi ultimi sono quelli più rappresentativi nel determinare l’alterazione dei livelli dei miRNA in piastrine di soggetti con vari tipi di tumore. Nella fase iniziale dello studio si è analizzata la presenza dei 49 miRNA in campioni ematici di soggetti sani (gruppo controllo). Da 10 soggetti sani, dopo il prelievo ematico, si è proceduto all’isolamento delle piastrine. Le piastrine sono state lisate mediante kit commerciali e, dopo avere isolato l’RNA totale, si è proceduto mediante retrotrascrizione (RT) e amplificazione (qPCR) a determinare i loro livelli. La fase successiva doveva analizzare i miRNA piastrinici di pazienti con HCC. Questi campioni dovevano essere trasportati in laboratorio dopo una selezione dei pazienti condotta dal Direttore Scientifico. Tuttavia, a causa della sostituzione del Direttore Scientifico per fine mandato, i campioni suddetti non sono mai giunti in laboratorio. In attesa di poter superare questo inconveniente, si è proceduto nel 2016 a terminare la sperimentazione di due studi di collaborazione con l’Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari sempre

seguendo la linea di ricerca n. 1 (Malattie neoplastiche). La collaborazione ha prodotto un lavoro scientifico dal titolo: *The effects of chronic lifelong activation of the AHR pathway by industrial chemical pollutants on female human reproduction*. A. Cavallini et al. *PLoS One* (2016; 11: e 0152181). Lo studio aveva l'obiettivo di investigare le alterazioni metaboliche presenti in donne nate e vissute a Taranto, ed esposte per un lungo periodo ad inquinanti industriali (effetto cronico) che si erano sottoposte alla Procreazione medicalmente assistita (PMA). Come gruppo controllo sono state considerate donne residenti in zone rurali non inquinate anch'esse sottoposte a PMA. Lo studio, unico nel suo genere in quanto valutava gli effetti di un inquinamento cronico in un modello umano e non animale, ha mostrato non solo una ridotta fertilità nelle donne di Taranto, ma anche, nelle stesse, una situazione metabolica pre-cancerosa. Una seconda collaborazione aveva lo scopo di studiare il profilo dei miRNA in campioni paraffinati di tumore desmoide (sporadici e FAP-dipendenti) e in campioni di tessuto fibroso non-tumorale (gruppo controllo).

Progetto: *“Studio delle interazioni molecolari tra il Regorafenib ed i fattori di crescita piastrinici nel modulare la crescita e la diffusione di differenti linee di epatocarcinoma umano, in vitro” (Termine del progetto: 31/12/2017).*

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Rosalba D'Alessandro (Contrattista), Maria Grazia Refolo (Borsista)

Introduzione

Il progetto sostiene l'ipotesi che i GFs contenuti nelle piastrine, siano in grado di attivare pathways che interferiscono con quelli bersaglio dell'azione del Regorafenib. Si ipotizza che tale cross-talk possa avere effetti su processi biologici quali la proliferazione, l'apoptosi e la diffusione dell'epatocarcinoma umano. Il ruolo principale delle piastrine nel modulare la biologia del tumore è quello di sostenerne la crescita, attraverso la secrezione nella microcircolazione tumorale, di numerosi fattori di crescita e citochine, oltre a favorirne la diffusione metastatica attraverso la regolazione delle risposte immunitarie. D'altro canto il tumore attraverso la produzione di citochine è in grado non solo di stimolare la trombopoiesi ma anche di attivare le piastrine. Si attiva, così, un vero e proprio “positive feed-back loop” piastrine-cancro. Studi preliminari condotti nel nostro laboratorio su linee cellulari di epatocarcinoma umano, hanno dimostrato che i componenti piastrinici sono in grado di stimolare la crescita tumorale inducendo la proliferazione e favorendo processi quali la migrazione e l'invasione. Tale azione, dose e tempo dipendente, scompare quando viene meno il contatto tra il lisato piastrinico e le cellule. Inoltre, abbiamo dimostrato che il contenuto piastrinico è in grado di contrastare l'effetto inibitorio esercitato dal Regorafenib, che com'è noto esercita la sua azione diretta sulla via del segnale Ras/MAPK oltre ad inibire recettori per i fattori di crescita PDGF e VEGF. Gli α -granuli piastrinici contengono componenti come il PDGF e l'EGF, potenti mitogeni, il TGF- β , il VEGF ed in piccole quantità l'IGF. I fattori di crescita, in seguito al legame con i recettori tirosin-chinasici, attivano a cascata una serie di segnali come PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/Mek/ERK che portano alla proliferazione, alla sopravvivenza ed alla capacità di invasione da parte delle cellule tumorali. Fattori di crescita autocrini, come il VEGF ed il suo recettore VEGFR giocano un ruolo importante nel processo di neo-angiogenesi durante la crescita tumorale.

Nelle cellule endoteliali l'azione angiogenica è mediata prevalentemente dall'attivazione di VEGFR-2, mentre sembra che le forme presenti e attivate sulle cellule epiteliali tumorali siano VEGFR1-3. L'attivazione di questi recettori è responsabile dell'aumentata capacità di queste cellule di migrare ed invadere. Inoltre, è stato dimostrato che l'attivazione dell'EGFR, in molti tipi di

cellule tumorali, porti ad un aumento della secrezione di VEGF da parte delle stesse cellule con la conseguente attivazione del recettore VEGFR, che attiva la via del segnale Akt/mTOR e quella MAPK. Aumentati livelli di VEGF conferiscono a queste cellule un'aumentata capacità di migrare ed invadere. Inoltre, questo spiegherebbe i fenomeni di resistenza osservati in terapie che inibiscono il solo recettore per l'EGF. Pertanto, terapie combinate che bloccano entrambe le vie, come ad esempio Cetuximab e Sorafenib, risultano essere più efficaci. Un altro esempio d'interazioni tra recettori è rappresentato dal link esistente tra insulin-like growth factor (IGF) e il recettore EGFR, interazione responsabile dei fenomeni di resistenza alle terapie che bloccano selettivamente solo uno dei due recettori. Un'ulteriore via che gioca un ruolo importante in processi come la proliferazione, il differenziamento e l'angiogenesi è quella FGF-mediata. In particolare l'FGF-19, uno dei membri della famiglia di FGFs, è stato di recente associato alla progressione dell'epatocarcinoma. L'FGF-19 si lega in modo specifico all'FGFR-4. Il legame dei fattori FGF ai rispettivi recettori attiva una cascata di eventi fosforilativi che attraverso specifici mediatori attiva diverse vie del segnale come quelle di Ras/MAPK, Akt/mTOR, PKC o PKD, così come attiva il rilascio di calcio dai depositi intracellulari. Inoltre, l'attivazione di tali vie interagisce a più livelli con quella del segnale wnt, dipendente dalla β -catenina.

Obiettivi

Primario : chiarire il ruolo di fattori di crescita come l'EGF, il VEGF, l'FGF, il PDGF e l'IGF nella crescita e nella diffusione dell'epatocarcinoma in linee di HCC umano oltre che esplorare le interazioni tra i meccanismi molecolari messi in atto da tali fattori e quelli alla base degli effetti antiproliferativi e proapoptotici del Regorafenib.

Secondario: sperimentare trattamenti farmacologici combinati tra il Regorafenib ed inibitori di fattori di crescita sulla crescita, sulla migrazione e sulla invasione di cellule di HCC, *in vitro*.

Attività

Incubazione del Lisato Piastrinico (LP) e dei GFs con linee cellulari di HCC umano

Il lisato piastrinico è stato sottoposto ad analisi qualitativa e quantitativa per i principali fattori di crescita quali EGF, FGF, VEGF, PDGF ed IGF, utilizzando test ELISA. Il dosaggio degli stessi GFs è stato effettuato nel medium di coltura delle cellule di HCC a contatto con il LP e con ciascuna delle proteine ricombinanti corrispondente ad un dato fattore di crescita. Le linee di epatocarcinoma umano, Hep3B, PLC/RLF/5, HepG2, sono state caratterizzate per la presenza di recettori per i fattori di crescita considerati, utilizzando specifici kit ELISA. Gli stessi dosaggi sono stati eseguiti anche dopo trattamento con differenti concentrazioni di Regorafenib. Dopo questi trattamenti, si è passati ad esplorare, con tecniche di Western-Blotting, le principali cascate fosforilative attivate come PI3K/Akt/mTOR e Ras/Raf/Mek/ERK. Questi studi sono stati condotti anche dopo trattamento con inibitori dei diversi fattori di crescita o dei rispettivi recettori anche in combinazione con differenti dosaggi di Regorafenib. Il grado d'interazione tra i due farmaci utilizzati nei trattamenti combinati è stato analizzato secondo il metodo descritto da Chou e Talalay che è alla base del programma CalcuSyn della Biosoft.

Proliferazione cellulare

Dopo aver trattato le cellule con differenti concentrazioni di Regorafenib e dei suoi principali metaboliti M-2 ed M-5, la risposta proliferativa è stata stimata ad intervalli di tempo, mediante

saggio colorimetrico dell'MTT. La stessa procedura è stata utilizzata dopo trattamenti combinati con inibitori dei GFs.

Ciclo cellulare

Tale studio è stato condotto sia mediante l'analisi di espressione molecolare dei principali fattori proteici quali pCdk, pRb, cicline D ed E, sia mediante citofluorimetria con l'utilizzo del MuseTM Cell Analyzer, che permette di effettuare una misura quantitativa della percentuale di cellule presenti nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. È stato necessario sincronizzare le popolazioni cellulari nella stessa fase del ciclo aggiungendo nel medium timidina, la cui funzione è quella di inibire la sintesi del DNA nella fase S del ciclo cellulare.

Apoptosi

Il processo apoptotico è stato esplorato mediante l'espressione di specifiche proteine coinvolte nelle vie del segnale estrinseco ed intrinseco con tecniche di WB. In aggiunta, si è utilizzata la citofluorimetria attraverso l'impiego di Annexina V per l'analisi quantitativa differenziale delle cellule vive, in apoptosi precoce e tardiva con il Muse Cell Analyzer. Un secondo marcatore, il 7-AAD (7-ammino-actinomicina D), è stato usato per l'identificazione delle cellule necrotiche.

Migrazione cellulare

Per gli studi di migrazione cellulare si è valutata l'organizzazione del citoscheletro in seguito ai diversi trattamenti farmacologici condotti sulle linee di HCC utilizzate. A tale scopo, tecniche di immunocitochimica ci hanno permesso di visualizzare, grazie al microscopio a fluorescenza, l'organizzazione dei filamenti d'actina, la localizzazione di proteine come la paxillina, e gli eventuali cambiamenti morfologici indotti. La capacità di migrazione delle cellule si è determinata attraverso lo "scratch wound test". Sono state catturate immagini a tempi diversi attraverso una camera digitale (Leica DMRXA) associata al microscopio ad inversione e analizzate con un ImageJ Software.

Invasione cellulare

La capacità di invasione cellulare (chemiotassi) è stata studiata usando il sistema "Matrigel-coated transwells" che impiega supporti porosi (8µm) trattati con una matrice extracellulare. Le cellule migrate attraverso il sistema poroso sono state individuate e contate dopo colorazione con crystal violet.

Analisi statistica

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e post-test appropriato (GraphPad 5.0 software).

Risultati

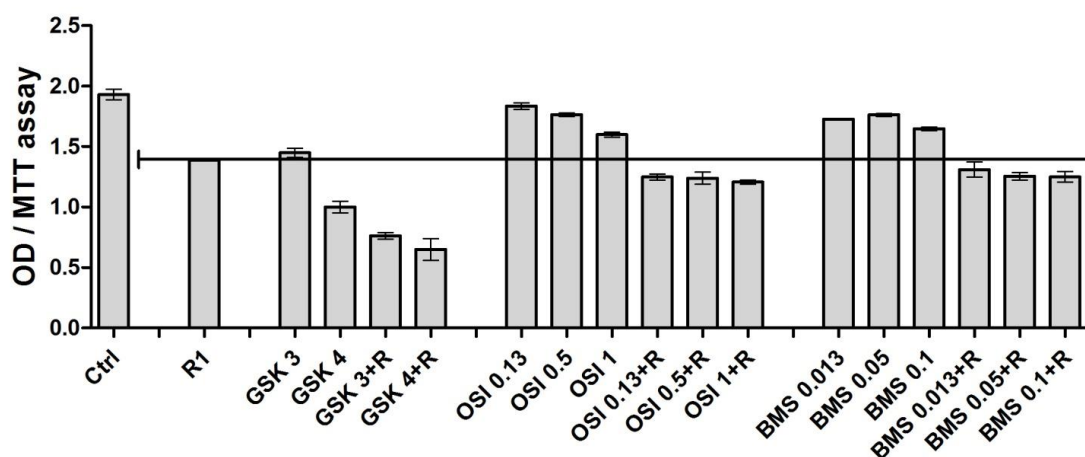
Tra i fattori di crescita contenuti nei granuli piastrinici, l'IGF1 ed il suo Recettore sembrano svolgere un ruolo importante nell'epatocarcinogenesi. Infatti, l'IGF1 ed il suo specifico recettore sono coinvolti nel pathway che regola la proliferazione cellulare, la progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi.

Abbiamo sperimentato differenti inibitori dell'IGF1-R per meglio caratterizzare la via biochimica coinvolta ed individuare i principali target molecolari alla base dell'interazione con le vie del segnale regolate dal Regorafenib. Gli inibitori oggetto di indagine sono stati:

- il GSK 1838705A inibitore selettivo dell'IGF1-R e dell'Insulin Receptor che agisce legandosi in maniera competitiva al sito di legame per il GF

- l'OSI 906 (Linsitinib) e il BMS- 754807 che agiscono esclusivamente sull'IGF1-R inibendo l'autofosforilazione del Recettore e la successiva attivazione di proteine segnale a valle come Akt, ERK1/2 e S6.

Come rappresentato nel grafico, l'impiego di inibitori dell'IGF1-R è in grado di inibire, in maniera dose dipendente, la proliferazione di cellule di epatocarcinoma umano, *in vitro*. Inoltre, considerando le combinazioni di tali inibitori con il Regorafenib, i risultati ottenuti, sono stati inseriti in un modello computazionale che permette di calcolare un parametro, indicatore del tipo di interazione tra i due farmaci. Si tratta del modello descritto da Chou, Chou e Talalay, implementato dal software CompuSyn (Biosoft, UK). Tale modello infatti, permette di ricavare un indice di combinazione (CI) i cui valori < 1 , ± 1 , e > 1 implicano rispettivamente sinergismo, additività e antagonismo. I valori di $CI < 1$, ottenuti per tutte le combinazioni utilizzate, indicano un effetto sinergico nel ridurre il tasso proliferativo e questo risulta particolarmente significativo allorché si impiega come inibitore del recettore il GSK 1838705A.

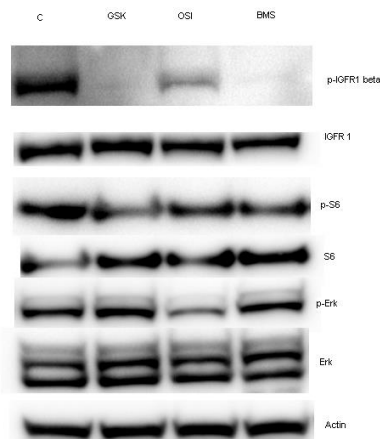


Regorafenib	GSK1838705A	Effect	CI
1.0	3.0	0.075	0.86915
1.0	4.0	0.06	0.83749

Regorafenib	OSI-906	Effect	CI
1.0	0.13	0.124	0.77436
1.0	0.5	0.123	0.76373
1.0	1.0	0.12	0.72648

Regorafenib	BMS-754807	Effect	CI
1.0	0.013	0.131	0.86822
1.0	0.05	0.125	0.78650
1.0	0.1	0.124	0.77334

Una prima indagine a livello molecolare, mostra che gli inibitori di IGF1R sono tutti in grado di inibire la fosforilazione del Recettore e che tale effetto risulta più marcato nel caso degli inibitori GSK 1838705A e del BMS- 754807, tale effetto si riflette sulla riduzione della fosforilazione di S6, uno dei bersagli di mTORC1. L'OSI 906, al contrario, pur avendo un minore effetto sulla fosforilazione del Recettore, determina una riduzione significativa dei livelli di fosforilazione di Erk, uno dei target della cascata fosforilativa attivata dall'IGF1.



I dati ottenuti sono stati oggetto di due pubblicazioni scientifiche nel 2015 e una nel 2016.

Progetto: *“Effetti del Regorafenib in combinazione con inibitori di mTOR e β -catenina, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano”*
(Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Rosalba D'Alessandro (Contrattista), Maria Grazia Refolo (Borsista)

Introduzione

Il progetto sostiene l'ipotesi che il Regorafenib, inibitore della via di trasduzione Ras/MAPK, abbia un effetto di stimolazione su altre vie del segnale, implicate nella crescita di cellule di epatocarcinoma umano, quali mTOR e β -catenina. Pertanto, una più efficace azione inibitoria sulla crescita tumorale si potrebbe ottenere dall'azione combinata del Regorafenib con inibitori specifici di mTOR e β -catenina. Studi da noi precedentemente pubblicati hanno dimostrato, in differenti linee cellulari di epatocarcinoma, che l'azione del Regorafenib sulla cascata fosforilativa Raf/MEK/ERK ha come effetto l'inibizione della proliferazione, l'induzione dell'apoptosi, nonché l'inibizione di processi quali la migrazione e l'invasione cellulare, che sono alla base della diffusione e delle metastasi tumorali. Studi sul Sorafenib, d'altro canto, dimostrano che sebbene tale farmaco sia in grado di inibire l'attivazione di MEK ed ERK nel contempo porta all'attivazione di Akt e di mTOR che possono, invece, essere bloccati dall'azione sinergica di inibitori di mTOR. Questi ultimi, se usati singolarmente, inducono al contrario l'attivazione di MEK ed ERK, in seguito alla mancata azione di feed-back negativo esercitato da S6K sulla cascata Ras/Raf/MAPK.

Obiettivi

Primario: esaminare, in linee cellulari di HCC, i principali fattori coinvolti nelle vie del segnale PI3K/Akt/mTOR e β -catenina, nonché la regolazione da parte del fattore di trascrizione REST, sia in corso di trattamento con Sorafenib e Regorafenib che dopo sospensione. Testare i metaboliti del Regorafenib, M-2 ed M-5 che per la loro maggiore stabilità biologica, potrebbero risultare più efficaci dal punto di vista terapeutico. Esplorare le suddette vie del segnale in processi quali la proliferazione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, la migrazione e l'invasione cellulare.

Secondario: sperimentare trattamenti combinati tra Regorafenib ed inibitori specifici di mTOR e β -catenina, al fine di evitare, da parte delle cellule, fenomeni di resistenza che si possono verificare in

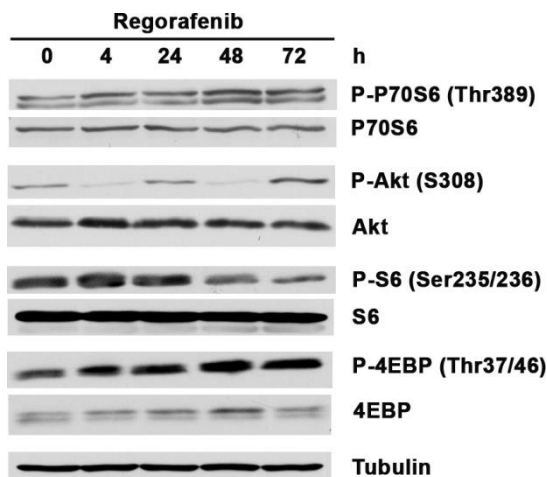
caso di trattamento con singoli componenti. Gli inibitori di mTOR e β -catenina verranno utilizzati sia durante il trattamento con Regorafenib che dopo sua sospensione.

Attività

Sono stati condotti esperimenti al fine di studiare l'espressione delle proteine dei complessi mTORC1/2 in linee cellulari di epatocarcinoma trattate con Regorafenib ed inibitori specifici di componenti del complesso mTORC. L'azione combinata di tali farmaci è stata valutata anche attraverso esperimenti atti a valutare la proliferazione, l'apoptosi e la migrazione cellulare. E' stata esplorata, con tecniche di Western-Blotting, la cascata fosforilativa delle MAPK, bersaglio diretto dell'azione del Regorafenib, l'espressione dei principali marcatori a valle del complesso mTORC1 come S6, p70S6, 4EBP1, nella loro forma fosforilata e non, nonché delle proteine responsabili della sua regolazione come PI3K/Akt/TSC2. In modo simile, sono stati analizzati i principali bersagli di mTORC2 come Akt, GSK3b, PKC. E' stata eseguita la fosforilazione della β -catenina nei siti specifici che ne regolano la sua degradazione o la sua traslocazione nel nucleo. Su proteine estratte dal nucleo si è valutata la β -catenina. Inoltre, si è studiata l'espressione di REST nelle diverse modalità di trattamento con Regorafenib.

Risultati

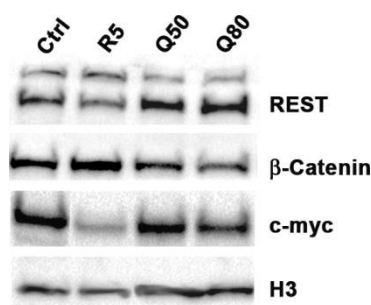
Esperimenti *in vitro*, condotti nel nostro laboratorio, su linee cellulari di HCC (PLC/5RLF ed HepG2), hanno mostrato come l'espressione di alcuni dei componenti bersaglio del complesso mTORC1 sia indotta da dosi crescenti di Regorafenib. Come si può osservare nella figura di seguito riportata, il Regorafenib determina un incremento nella fosforilazione di P70S6, di Akt e di 4EBP1, proteine coinvolte nella sintesi proteica e pertanto nel processo di proliferazione cellulare.



Sono attualmente in corso esperimenti in cui viene studiata l'espressione delle proteine dei complessi mTORC1/2 in linee cellulari di epatocarcinoma trattate con Regorafenib ed inibitori specifici di componenti del complesso mTORC. L'azione combinata di tali farmaci verrà studiata anche in esperimenti atti a valutare la proliferazione, l'apoptosi e la migrazione cellulare.

Un risultato interessante, da noi ottenuto, riguarda l'espressione del fattore di trascrizione REST. Nella cellula nervosa REST può agire come oncogene mentre in cellule non nervose è espresso ad alti livelli e può agire come onco soppressore, questo è stato visto nel carcinoma del polmone, della mammella e del colon. I meccanismi alla base del controllo negativo esercitato da REST sulla proliferazione, non sono ancora del tutto chiari ma sembra che ad una diminuzione dei livelli di

REST, corrisponda, in alcuni casi esaminati, una stimolazione della cascata PI3K-Akt da parte di fattori di crescita come l'EGF, in altri, un aumento nei livelli di fosforilazione di Akt2 ed un'attivazione di mTORC1. In cellule di HCC trattate con Regorafenib 5μM abbiamo riscontrato una diminuzione nell'espressione di REST in associazione ad un aumento dell'attivazione di mTORC1 e stiamo tuttora studiando l'espressione di P-Akt2 e di componenti della cascata PI3K-Akt. Inoltre, data la stretta correlazione tra l'azione del complesso mTORC1, il fattore di trascrizione REST e il pathway Wnt/β-catenina, abbiamo preso in considerazione anche l'azione combinata di Regorafenib e Quercetina. Tra i meccanismi d'azione della quercetina, uno dei più importanti risulta essere l'inibizione del pathway Wnt/β-catenina coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni implicati nella proliferazione e differenziazione cellulare. Un'alterazione di questa via risulta cruciale nel processo di carcinogenesi, in quanto porta ad un accumulo di β-catenina nel citoplasma e alla successiva traslocazione nel nucleo, dove interagisce con le proteine TCF/LEF, attivando la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare (c-myc, ciclina D1). In cellule di HCC, la quercetina 50-80 μM determina una riduzione dei livelli di β-Catenina nucleare e di conseguenza dei livelli di c-myc, tale azione è associata, contrariamente a quanto accade nella cellula nervosa, ad un aumento nell'espressione del fattore di protezione tumorale REST. Il Regorafenib al contrario oltre a determinare una riduzione dell'espressione di REST determina un accumulo di β-catenina nucleare a cui però non è associato un aumento di c-myc che invece viene significativamente inibito probabilmente in seguito all'azione di altri fattori di trascrizione inibitori indotti dal Regorafenib.



Al fine di caratterizzare in modo più approfondito le complesse relazioni tra le diverse vie del segnale, regolate direttamente e indirettamente dal Regorafenib, stiamo eseguendo esperimenti in cui viene valutata l'azione combinata di Regorafenib e Quercetina sull'espressione delle proteine oggetto di indagine nonché sui processi di crescita e motilità cellulare.

I dati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica nel 2015.

Progetto: *“Effetti del Regorafenib in combinazione con Vitamina K1 e con inibitori della via IGF/IGF-R, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano” (Termine del progetto: 31/12/2018)*

Responsabile: Caterina Messa, Dirigente Biologo

Partecipanti: Rosalba D'Alessandro (Contrattista), Maria Grazia Refolo (Borsista).

Introduzione

L'approccio terapeutico nel trattamento di molti tumori è indirizzato alla ricerca di terapie molecolari volte ad individuare agenti non tossici in grado di inibire la crescita tumorale, avendo come bersaglio componenti di pathways specifici. Un altro aspetto da considerare negli studi diretti verso l'individuazione di terapie molecolari è quello della resistenza della cellula tumorale

all'azione del farmaco. La resistenza ad un dato farmaco può essere primaria o indotta dall'uso dello stesso. Nel primo caso è dovuta al fatto che il tumore è la conseguenza di mutazioni che riguardano vie di trasduzione del segnale diverse da quelle che costituiscono il bersaglio del farmaco in esame o componenti che, pur essendo nella stessa via biochimica, sono situati a valle del bersaglio. Nella resistenza indotta, invece, l'azione inibitoria esercitata dal farmaco attiva altre vie del segnale che vanno a compensare l'azione inibitoria, questo fenomeno è molto comune ed è dovuto alla complessa rete di interconnessioni che si vengono a stabilire in una cellula. Per ovviare a queste evenienze, risulta prioritario nello studio di terapie antitumorali mirate ed efficaci, il ricorso all'uso sequenziale o combinato di farmaci la cui azione risulti essere additiva o sinergica. In questo modo è possibile ridurre il dosaggio e i tempi di somministrazione, con conseguente riduzione di tossicità e di fenomeni di resistenza. Per questo diventa fondamentale la conoscenza dei meccanismi d'azione e delle interazioni che si vengono a stabilire tra i farmaci considerati. Inoltre, l'interesse dei ricercatori è volto sempre di più all'individuazione di marcatori molecolari predittivi che possano guidare nella selezione dei pazienti da sottoporre ad uno specifico piano terapeutico. Sia il Sorafenib che il Regorafenib, utilizzati nel trattamento dell'HCC, inibiscono kinasi angiogeniche (VEGFR1-3, TIE2), stromali (PDGFR- β , FGFR) e oncogeniche (kit, PDGFR- β , RET). Entrambi esercitano un'azione inibitoria sulla cascata fosforilativa Raf/MEK/ERK, la quale è stata esplorata in diverse linee cellulari di HCC e ha mostrato svolgere un effetto inibitorio sulla proliferazione, sulla migrazione e invasione cellulare, nonché una induzione del processo apoptotico.

Un'indagine "kinome-wide" svolta dall'Ambit Bioscience, sull'azione inibitoria del Regorafenib, mostra un pannello di kinasi bersaglio specifico che si sovrappone solo parzialmente a quello di altri inibitori multichinasici compreso il suo analogo Sorafenib (Ambit Biosciences, San Diego, USA). Sulla base di ciò, risulta cruciale approfondire i meccanismi che sottendono all'azione inibitoria del Regorafenib al fine, non solo, di ottimizzarne la sua efficacia durante il trattamento ma soprattutto di ridurre il rischio di recidive dopo sospensione dello stesso. Inoltre, numerose evidenze sperimentali hanno evidenziato che l'azione inibitoria esercitata dal Sorafenib può essere rafforzata in modo sinergico dalla combinazione con la Vitamina K1, la quale ha il vantaggio di essere poco tossica. La vitamina K1 fa parte della famiglia delle vitamine K ed ha un ruolo importante nel processo di coagulazione e nel metabolismo del midollo osseo. La sua attività anti-tumorale è stata ampiamente studiata *in vitro* ed *in vivo* anche nell'HCC. Pertanto, il ricorso alle terapie combinate Sorafenib e Vitamina K1 ha il vantaggio indiscusso di poter ridurre i dosaggi dei farmaci ottenendo così una riduzione della loro tossicità. Nel contempo, si ridurrebbe il potenziale fenomeno di resistenza generata dai farmaci usati singolarmente. Al contrario, l'azione combinata del Regorafenib e della Vitamina K1 risulta essere a tutt'oggi ancora inesplorata e pertanto di grande interesse scientifico. Inoltre, numerose evidenze sperimentali dimostrano che il microambiente tumorale svolge un ruolo fondamentale nel modulare i processi di invasione e diffusione metastatica. L'aumentata incidenza di trombosi della vena porta nei casi di epatocarcinoma di maggiori dimensioni con elevato numero di piastrine, è alla base degli studi che correlano le piastrine alla capacità della cellula tumorale epatica di migrare e di attraversare la parete dei vasi. Il ruolo principale delle piastrine nella biologia del tumore è quello di sostenerne la crescita, attraverso la secrezione nel microambiente tumorale di numerosi fattori di crescita e citochine, oltre a favorirne la diffusione metastatica attraverso la regolazione delle risposte immunitarie. Nel nostro laboratorio abbiamo condotto studi su linee cellulari di epatocarcinoma umano, che hanno dimostrato come i componenti piastrinici siano in grado di stimolare la crescita tumorale inducendo

la proliferazione e favorendo processi quali la migrazione e l'invasione. Inoltre, abbiamo dimostrato che il contenuto piastrinico è in grado di contrastare l'effetto inibitorio esercitato dal Sorafenib e dal Regorafenib sulle cellule in coltura. Uno studio comparato, mirato ad analizzare l'effetto sulla crescita cellulare di diversi fattori di crescita contenuti nel lisato piastrinico, ha evidenziato un ruolo significativo esercitato dall'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) e dal suo recettore (IGF1-R) nel contrastare l'effetto inibitorio esercitato dal Sorafenib anche quando usato in combinazione con la Vitamina K1. Una strategia vincente sta diventando quella di inibire l'azione di specifici fattori di crescita, pertanto, l'inibizione contemporanea di due o più vie del segnale si rende necessaria per ovviare a possibili fenomeni di resistenza. Nel caso specifico dell'IGF1, gli effetti biologici risultano essere mediati dal suo recettore che, quando attivato, porta all'attivazione delle vie di trasduzione del segnale MAPK e PI3K/Akt/mTOR coinvolte nei processi di proliferazione ed apoptosi cellulari. Oltre all'effetto anti-proliferativo e pro-apoptotico, sia il Sorafenib/Regorafenib, che la Vitamina K1 e gli inibitori della via IGF-R si sono mostrati efficaci anche nel contrastare processi quali la migrazione e l'invasione cellulare. I meccanismi molecolari coinvolti in tali fenomeni sono oggetto di studio da parte di numerosi gruppi di ricerca, dato che questi processi sono alla base della capacità della cellula tumorale di diffondere e dare metastasi. Attualmente nei trials clinici vengono utilizzati più di 10 inibitori di IGF/IGF-R i quali possono essere suddivisi in tre classi principali: (1) anticorpi monoclonali diretti contro i ligandi IGF1/2, (2) anticorpi monoclonali diretti contro il recettore IGF1-R, (3) inibitori del dominio tirosin-kinasico del recettore IGF1-R. Tali inibitori, sebbene siano diretti contro una stessa via, colpiscono bersagli diversi e agiscono con diversi meccanismi d'azione. I primi risultati ottenuti nel nostro laboratorio con il GSK1838705A, uno degli inibitori del dominio tirosin-kinasico dell'IGF1-R, in combinazione con Sorafenib o Regorafenib, sembrano essere promettenti in quanto mostrano un'azione sinergica nell'inibire la crescita e la motilità delle cellule di HCC. Tale azione potrebbe potenzialmente aggirare i fenomeni di resistenza e inibire la crescita tumorale ed i processi metastatici con l'effetto di migliorare le aspettative di vita dei pazienti.

Obiettivi

Primario: esaminare i principali fattori coinvolti nelle vie del segnale MAPK e PI3K/Akt/mTOR sia in corso di trattamento con Regorafenib e Vitamina K1 che dopo sospensione, in differenti linee cellulari di HCC; esplorare le suddette vie del segnale in processi quali la proliferazione, il ciclo cellulare, l'apoptosi, la migrazione e l'invasione cellulare.

Secondario: sperimentare trattamenti combinati con Regorafenib, Vitamina K1 ed inibitori specifici di IGF1/IGF1-R, al fine di evitare nelle cellule tumorali fenomeni di resistenza che si possono verificare quando si impiegano trattamenti con singoli componenti. Saranno usati inibitori di IGF1/IGF1-R appartenenti alle tre principali classi : 1) anticorpi monoclonali diretti contro i ligandi IGF1/2, 2) anticorpi monoclonali diretti contro il recettore IGF1-R, 3) inibitori del dominio tirosin-kinasico del recettore IGF1-R.

Attività

Abbiamo studiato gli effetti del Regorafenib, somministrato a bassi dosaggi ed in combinazione con Vitamina K1 ed inibitori dell'IGF1-R, sulla crescita e motilità di cellule di HCC, *in vitro*. Differenti linee cellulari di epatocarcinoma umano, PLC/RLF/5, HepG2 e HLF, sono state sottoposte per tempi diversi a trattamenti con diverse concentrazioni di Regorafenib e Vitamina K1 al fine di individuare dosi e tempi efficaci a produrre un effetto di potenziamento nella inibizione

della proliferazione cellulare. I risultati ottenuti, con saggi specifici sono stati inseriti in un modello computazionale che permette di calcolare un parametro, indicatore del tipo di interazione tra i due farmaci. Si tratta del modello descritto da Chou, Chou e Talalay, implementato dal software CompuSyn (Biosoft, UK). Tale modello infatti, permette di ricavare un indice di combinazione (CI) i cui valori < 1 , ± 1 , e > 1 implicano rispettivamente sinergismo, additività e antagonismo. Così si ottengono, per i farmaci in esame, le concentrazioni ed i tempi ottimali che producono un'azione inibitoria sinergica. In tali condizioni sperimentali, è stata indagata l'interazione con il fattore di crescita IGF1 e con i diversi inibitori del recettore IGF1-R. Sono in corso esperimenti per valutare trattamenti combinati con Regorafenib, Vitamina K1 ed inibitori specifici di IGF/IGF1-R, al fine di ridurre nelle cellule tumorali fenomeni di resistenza farmacologica frequenti allorché si impiegano trattamenti con singoli componenti.

I saggi utilizzati sono stati i seguenti:

Saggio colorimetrico MTT

Ciclo cellulare

Tale indagine è stata condotta sia mediante l'analisi di espressione molecolare dei principali fattori proteici coinvolti quali pCdk, pRb, cicline D ed E, sia mediante citofluorimetria con l'utilizzo del MuseTM Cell Analyzer (Millipore), che permette di effettuare una misura quantitativa della percentuale di cellule presenti nelle fasi G0/G1, S e G2/M del ciclo cellulare. Al fine di rilevare la percentuale delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare, è stato necessario sincronizzare le popolazioni cellulari nella stessa fase del ciclo aggiungendo nel medium la timidina, la cui funzione era quella di inibire la sintesi del DNA nella fase S del ciclo cellulare.

Determinazione del Ki67

L'**antigene** Ki-67 è una proteina del nucleo strettamente associata con la proliferazione cellulare. Dal momento che esso è presente durante tutte le fasi del ciclo cellulare tranne che nella fase G0, il Ki-67 rappresenta un utile marcatore della frazione di crescita della popolazione di cellule. Può essere rilevato in estratti proteici mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico con tecniche di Western Blotting o direttamente *in situ* mediante immunofluorescenza o citofluorimetria attraverso il test di proliferazione Ki67 e l'utilizzo del Muse Cell Analyzer (Millipore).

Apoptosi

Il processo apoptotico è stato esplorato sia mediante l'espressione di specifiche proteine coinvolte nelle vie del segnale estrinseco ed intrinseco con tecniche di WB, che attraverso la citofluorimetria con l'Annexina V che permette l'analisi quantitativa delle cellule vive e in apoptosi sia precoce che tardiva. Un secondo marcatore, il 7-AAD (7-ammino-actinomicina D), è stato usato per l'identificazione delle cellule necrotiche.

Migrazione cellulare

Per gli studi di migrazione cellulare si è valutata l'organizzazione del citoscheletro in seguito ai diversi trattamenti farmacologici a cui erano sottoposte le linee cellulari di HCC. Tecniche di immunocitochimica hanno permesso di visualizzare, grazie al microscopio a fluorescenza, l'organizzazione dei filamenti di actina, la localizzazione di proteine come la paxillina, e gli eventuali cambiamenti morfologici indotti. Inoltre, è stata valutata, mediante WB, l'espressione di proteine quali, le sub-unità di F-actina e G-actina, così come l'espressione del fattore depolimerizzante cofilina, nonché dei suoi principali regolatori a monte della cascata fosforilativa.

La capacità di migrazione delle cellule si è valutata usando lo "scratch wound test" che consiste nel determinare una incisione sul monostrato di cellule confluenti in piastre di coltura e di valutare, a

tempi diversi, la capacità delle cellule di rimarginare il solco, cioè la loro capacità di migrare in presenza di specifici fattori. Le immagini vengono rilevate a tempi diversi, attraverso una camera digitale (Leica DMRXA) associata al microscopio ad inversione e analizzate con un ImageJ Software. La capacità di migrare da parte delle cellule è determinata dalla differenza tra l'ampiezza del solco al tempo zero e l'ampiezza a tempi successivi.

Invasione cellulare

La capacità di invasione cellulare è stata studiata usando il sistema “Matrigel- coated transwells “ che impiega supporti porosi (8µm) trattati con una matrice extracellulare. Si valuta la capacità delle cellule, seminate nella parte superiore del filtro, di attraversare la membrana porosa quando nel compartimento inferiore sono presenti agenti chemioattrattori. Le cellule migrate attraverso il sistema poroso sono individuate e contate dopo colorazione con crystal violet.

Al fine di chiarire i meccanismi alla base delle interazioni tra i diversi farmaci utilizzati, sono state esplorate, con tecniche di Western-Blotting, le cascate fosforilative di alcune vie del segnale implicate nei processi cellulari quali proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione cellulare. Tra queste abbiamo considerato innanzitutto la via delle MAPK, bersaglio diretto dell'azione del Regorafenib e della Vitamina K1, che agiscono entrambi sulla stessa via, ma secondo meccanismi differenti. Infatti, mentre il Regorafenib inibisce direttamente Raf, la Vitamina K1 attiva la chinasi PKA che è responsabile delle fosforilazioni inibitorie di Raf sui siti S43 e S259. Inoltre, è stata studiata la via PI3K/Akt/mTOR, data l'interazione di questa con quella inibita dal Regorafenib/VitaminaK1 e dato che entrambe queste cascate fosforilative sono attivate da IGF1/2 attraverso il loro recettore. In particolare è stata analizzata l'espressione dei principali marcatori a valle del complesso mTORC1 come S6, p70S6, 4EBP1, nella loro forma fosforilata e non, nonché delle proteine responsabili della sua regolazione come PI3K/Akt/TSC2.

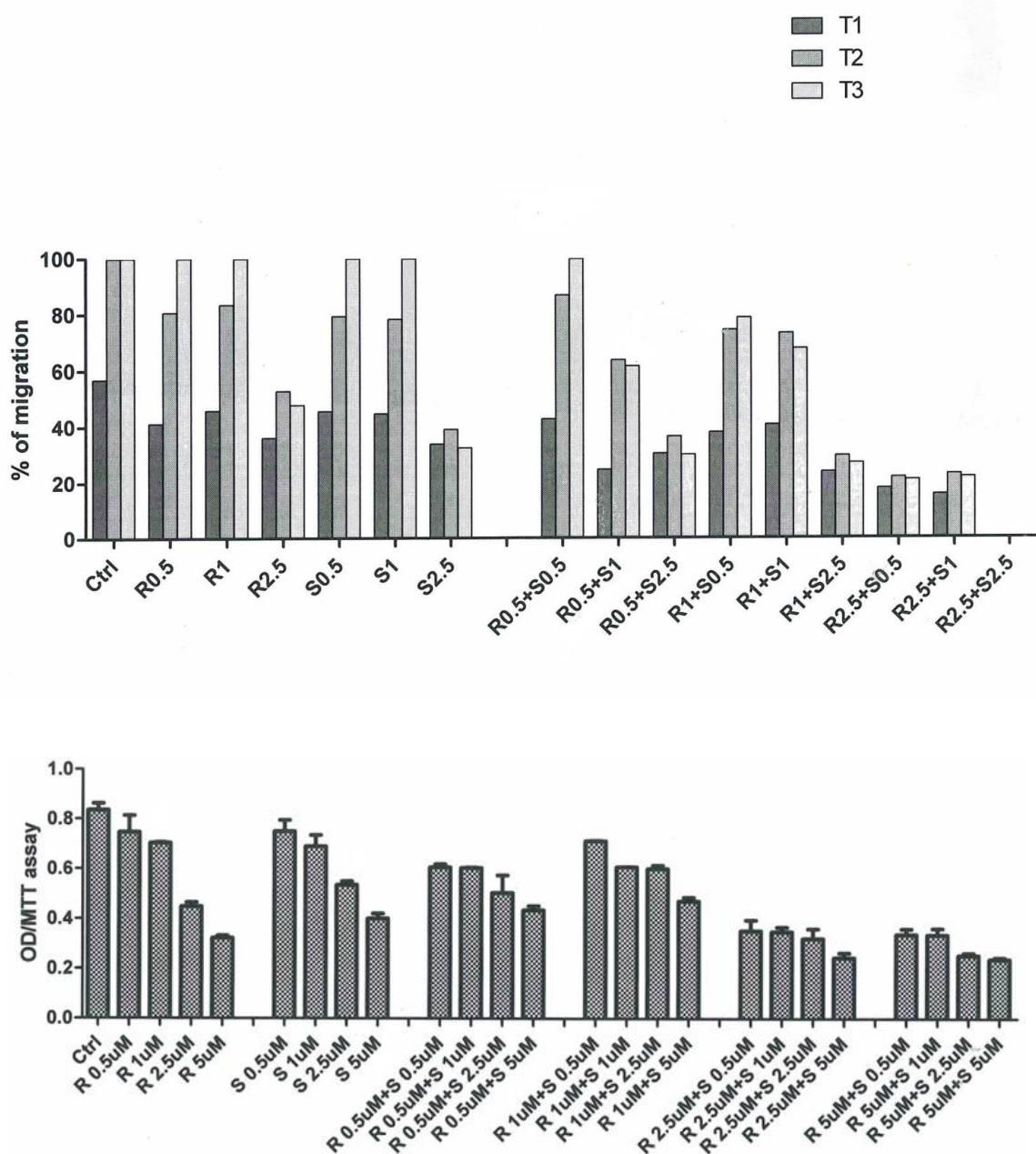
Analisi statistica

I dati ottenuti saranno analizzati mediante analisi della varianza (ANOVA) e post-test appropriato (GraphPad 5.0 software).

Risultati

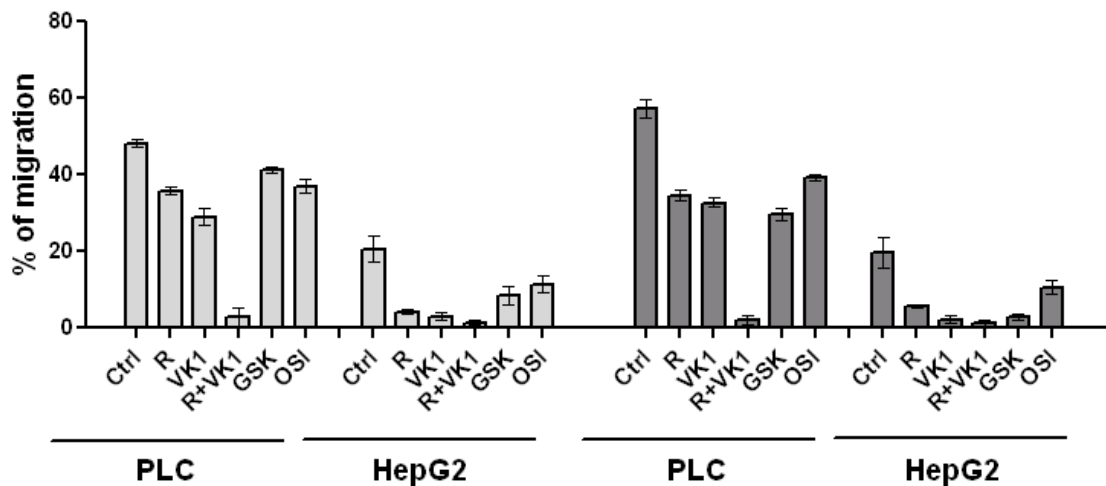
Le nostre sperimentazioni hanno evidenziato che quando il Regorafenib viene combinato alla Vitamina K1, la concentrazione del farmaco richiesta per l'inibizione della crescita delle cellule tumorali risulta sostanzialmente ridotta. Inoltre, la crescita delle cellule di HCC e gli effetti degli agenti terapeutici possono essere modulati da componenti del microambiente tumorale come ad esempio l'IGF1 il quale attraverso il suo specifico Recettore attiva il pathway biochimico coinvolto nella crescita cellulare e nella motilità. Abbiamo valutato l'effetto di un inibitore specifico dell'IGF1-R, il GSK1838705A, sulla migrazione già inibita dal Sorafenib e dalla vitamina K1. I nostri risultati dimostrano che l'impiego dell'inibitore dell'IGF1-R diminuisce significativamente la migrazione di cellule di HCC, *in vitro* oltre che causare riduzione e depolarizzazione dell'actina nelle linee cellulari utilizzate. Dati ottenuti con saggi di proliferazione *in vitro*, dimostrano che l'azione inibitoria a bassi dosaggi di Regorafenib (1-2.5 µM) risulta essere potenziata quando si utilizza il farmaco in combinazione con Vitamina K1 (12-24 µM) e GSK1838705A (4-6 µM).

Inoltre, tale combinazione di farmaci può essere considerata sinergica, essendo gli indici di combinazione $CI < 1$, calcolati utilizzando il modello descritto da Chou, Chou e Talalay, implementato dal software CompuSyn (Biosoft, UK). I risultati ottenuti sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica.



Pertanto, a completamento del progetto, saranno condotti esperimenti che prevedono l'impiego combinato di Regorafenib e Sorafenib al fine di comprendere eventuali differenze nel loro meccanismo d'azione e le interazioni che si stabiliscono con Vitamina K ed inibitori multichinasici diretti contro Recettori che legano i GFs del microambiente tumorale. Tutto ciò al fine di ridurre nelle cellule tumorali fenomeni di resistenza farmacologica frequenti allorché si impiegano trattamenti con singoli componenti. Sono in corso esperimenti preliminari che mirano ad approfondire i meccanismi d'azione dei due inibitori multichinasici e della loro combinazione in processi come la proliferazione e la migrazione cellulare. Relativamente allo studio della proliferazione e motilità cellulare, sono riportati di seguito i risultati preliminari ottenuti combinando diverse concentrazioni di Sorafenib e Regorafenib in cellule PLC/PRF/5.

Stiamo, inoltre, valutando gli effetti di Regorafenib/Sorafenib, VK1 ed inibitori di IGF1-R sulla migrazione cellulare utilizzando due differenti matrici, il Collagene I e la Fibronectina. I risultati riportati nel grafico indicano che l'azione inibitoria è paragonabile sui due substrati, sebbene la percentuale di migrazione delle cellule controllo risulti maggiore su Fibronectina rispetto a quella su Collagene I.



Al fine di approfondire i meccanismi molecolari che regolano la motilità della cellula tumorale epatica su differenti matrici extracellulari saranno esplorate le vie del segnale che sottendono a tale processo.

Progetto: “Studio dei fattori molecolari predittivi di risposta e di resistenza alla terapia anti-angiogenetica con Ramucirumab e Paclitaxel nel tumore gastrico metastatico”.

Responsabile: Caterina Messa, Dirigente Biologo

Partecipanti: Rosalba D'Alessandro (Contrattista), Maria Grazia Refolo (Borsista).

Introduzione

Le maggiori conoscenze sulla biologia del carcinoma gastrico hanno aumentato le possibilità di trattamento di questa neoplasia. La sopravvivenza media dei pazienti con malattia in fase metastatica, trattati con la sola chemioterapia, raramente supera i 10 mesi. I protocolli chemioterapici applicati in prima linea si basano principalmente sull'impiego di combinazioni di fluoropirimidine (5FU o capecitabina) e derivati del platino (cisplatino o oxaliplatino) cui è possibile associare epirubicina o docetaxel. Circa il 20% dei pazienti presenta una maggiore espressione del recettore HER2. In questi casi, il trattamento con Trastuzumab, anticorpo monoclonale anti-HER2, in associazione a cisplatino e fluorouracile, aumenta significativamente la sopravvivenza globale, che secondo i dati dello studio randomizzato ToGA, supera i 13 mesi. Attualmente, la via molecolare attivata da HER-2 è l'unica che dispone di un farmaco target. Recentemente, uno studio molecolare effettuato su oltre 290 tumori primitivi dello stomaco ha permesso una nuova classificazione delle neoplasie gastriche in tumori positivi per EBV (Epstein-Barr Virus), tumori con instabilità dei microsatelliti (hypermuted), tumori genomicamente stabili (GS, Genomically Stable) e tumori con instabilità cromosomica (CIN, Chromosomal Instability). Questi sottogruppi, che differiscono non solo per l'assetto biomolecolare ma anche per numerose varianti clinico-patologiche (sede, età di insorgenza, istotipo predominante), potrebbero suggerire

un nuovo approccio terapeutico che riconosca specifici target su cui agire. Analogamente ad altre patologie neoplastiche, il trattamento del carcinoma gastrico può avvalersi di farmaci anti-angiogenetici, ed in particolare del Ramucirumab, anticorpo monoclonale antagonista del VEGFR-2, attualmente utilizzato nella terapia di seconda linea dei carcinomi dello stomaco e della giunzione gastroesofagea in fase avanzata. Sulla base dei risultati ottenuti da due differenti studi randomizzati di fase III, è possibile utilizzare il Ramucirumab, in monoterapia o in associazione con Paclitaxel, in pazienti con malattia in progressione dopo una precedente terapia a base di platino e fluoropirimidina. Nello studio REGARD, in cui sono stati arruolati 355 pazienti, il trattamento con Ramucirumab in monoterapia ha determinato un vantaggio statisticamente significativo di sopravvivenza rispetto al placebo. Nello studio RAINBOW è stato valutato l'impiego di Ramucirumab in combinazione con Paclitaxel rispetto al solo chemioterapico. L'aggiunta di Ramucirumab ha portato ad un incremento della sopravvivenza globale e della sopravvivenza libera da progressione. Allo stesso modo, in uno studio condotto sulla popolazione europea, l'aggiunta di Ramucirumab al Paclitaxel ha prodotto un significativo incremento della sopravvivenza globale di 3 mesi rispetto all'impiego del solo Paclitaxel. Pertanto, grande attenzione è attualmente rivolta allo studio dei fattori di crescita appartenenti alla famiglia VEGF e dei loro recettori tirosin-chinasici che mediano gli effetti proangiogenetici con un ruolo importante nella patogenesi del carcinoma gastrico. Si tratta di molecole biologiche strutturalmente correlate tra loro, che comprendono: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, ed il Placental Growth Factor (PlGF). Il VEGF-A è quello maggiormente coinvolto nell'angiogenesi tumorale poiché il segnale pro angiogenetico viene trasmesso dal suo recettore specifico VEGFR-2, espresso ad alti livelli sulle cellule endoteliali coinvolte in questo processo. Il legame dei VEGF al recettore attiva diverse vie del segnale intracellulare, come quelle rappresentate da Raf/MEK/MAPK e da PI3K/Akt, che portano all'induzione di proteine coinvolte in processi proliferativi e di migrazione oltre a proteine che promuovono la sopravvivenza e la permeabilità delle cellule endoteliali. La recente scoperta di ligandi VEGF e l'espressione di VEGFR-1 e VEGFR-3 nelle cellule tumorali epiteliali suggerisce un loro ruolo diretto nel controllo autocrino di importanti processi biologici.

Ad esempio, l'attivazione del VEGFR-1, rilevato nel cancro del colon-retto e in linee cellulari di cancro del pancreas, è stata associata con una maggiore capacità di migrazione e invasione delle cellule tumorali. A differenza di altri agenti diretti su VEGFR-2/VEGF, il Ramucirumab lega con elevata affinità e bassa tossicità un epitopo specifico sul dominio extracellulare del VEGFR-2, bloccando così il sito di legame per tutti i VEGF. Queste caratteristiche rendono il Ramucirumab un farmaco molecolare d'elezione nella terapia del GC avanzato.

L'effetto antitumorale del Ramucirumab, allorché si lega al VEGFR-2 nelle cellule endoteliali, è quello di inibire il segnale con una conseguente riduzione della migrazione e della proliferazione cellulare. Anche se dopo trattamento con dosi saturanti di Ramucirumab si osserva una riduzione dei livelli di VEGFR-2 ed un aumento dei livelli sierici di VEGF-A.

Pertanto, l'identificazione di biomarcatori prognostici e predittivi per attuare una terapia farmacologica adeguata nei pazienti con carcinoma gastrico è uno degli obiettivi principali di ricerca traslazionale. Diversi studi riportano che elevati livelli di VEGF e di VEGFR-2 si correlano ad una prognosi più sfavorevole per il paziente, al contrario elevati livelli di VEGFR-1 e 3 sarebbero correlati ad una prognosi più favorevole dato che questi recettori ridurrebbero la biodisponibilità del ligando per il VEGFR-2.

Il Ramucirumab risulterebbe, quindi, più efficace in tutti quei casi in cui si osservano più elevati livelli di VEGFR-2. Ma a tutt'oggi non è possibile considerare i livelli dei VEGF e dei loro recettori

come un indicatore predittivo dell'efficacia di tale farmaco, in quanto tutti gli studi si basano su analisi retrospettive in cui il livello di questi marcatori è stato valutato prima del trattamento. Inoltre, non sono stati misurati i livelli di altri marcatori legati al processo di angiogenesi e crescita tumorale che potrebbero essere coinvolti nel processo di resistenza al Ramucirumab. Fattori di crescita come il PDGF, l'FGF e il PIGF potrebbero innescare meccanismi di neoangiogenesi nel momento in cui la via VEGF/VEGFR venga bloccata con il Ramucirumab o altri inibitori di questa via. Meccanismi in grado di eludere l'inibizione della neoangiogenesi vengono messi in atto dal tumore anche in seguito a modificazioni del sistema immunitario ed al reclutamento di cellule mieloidi staminali che diventano cellule in grado di formare nuovi vasi ECs. L'angiopoietina 2 (Ang2) è uno dei modulatori angiogenetici secreto dalle cellule endoteliali in risposta alle citochine di origine tumorale e si è visto che i livelli sierici di questo fattore sono elevati in caso di trattamento con inibitori di VEGF/VEGFR. Pertanto, anche l'angiopoietina-2 ed il suo recettore Tie2 potrebbero avere un ruolo di indicatori prognostici e nel caso del carcinoma gastrico precoce si è visto che i livelli pre-operatori di Ang-2 correlano con lo status dei linfonodi. IL7, IL12p70, IL-2Ra, IL-10, IL3, IL-4 e l'SCF, secrete dalle cellule tumorali in risposta a terapie dirette contro il VEGF/VEGFR, potrebbero essere potenziali marcatori prognostici e come tali sono oggetto di studio essendo protagonisti nell'intricata rete di segnali alla base del processo di formazione di nuovi vasi messo in atto dalla cellula tumorale e dal microambiente circostante. Interessante è anche il ruolo svolto nella cellula da specifici RNA non codificanti (ncRNA) come i microRNA (miRNA) e i long non-coding RNA (lncRNA), i quali sono spesso down- o up-regolati nelle cellule neoplastiche e che per questo possono costituire nuovi marcatori per i tumori umani compreso il carcinoma gastrico. Tali molecole hanno acquisito la funzione di regolare il metabolismo cellulare sia a livello nucleare, esercitando un controllo nel processo di trascrizione (lncRNA), sia a livello citoplasmatico agendo sul processo di traduzione di specifici RNA messaggeri (miRNA). Numerosi studi riconoscono a tali molecole un ruolo importante nella regolazione dei processi di crescita tumorale, pertanto i ncRNA potrebbero diventare nuovi marcatori diagnostici e prognostici in molti tipi di cancro compreso quello gastrico.

Obiettivo 1

Per comprendere l'effetto della terapia combinata Ramucirumab/Paclitaxel, nei pazienti reclutati, saranno dosati i livelli sierici di VEGF-A/B/D nonché delle forme solubili dei recettori VEGF-1/2/3. Inoltre, verranno analizzati diversi fattori di crescita coinvolti nel processo di angiogenesi come PDGF, FGF, PIGF, EGF, i modulatori di tale processo come l'Ang2/sTIE-2 ed alcune delle citochine secrete dalle cellule tumorali gastriche IL7, IL12p70, IL-2Ra, IL-10, IL3, IL-4 e SCF coinvolte nell'interazione con il microambiente tumorale e nella neoangiogenesi. I livelli sierici di queste proteine verranno dosati prima e nelle diverse fasi del trattamento al fine di rilevare possibili variazioni nella loro espressione in pazienti in cui il trattamento determina una regressione tumorale confrontati con pazienti in cui si osservano fenomeni di resistenza all'azione del farmaco.

Obiettivo 2

Il nostro studio prevede, inoltre, di studiare un ampio pattern di miRNA e di lncRNA nel siero di pazienti con GC. L'analisi sarà effettuata prima e durante trattamento con il Ramucirumab/Paclitaxel per evidenziare possibili cambiamenti di espressione dei vari ncRNA, con particolare riguardo ai pazienti che sviluppano una rapida progressione della malattia. La selezione degli specifici miRNA e lncRNA è stata effettuata considerando i dati riportati in letteratura che evidenziano

un'associazione tra questi tipi di ncRNA e il carcinoma gastrico, con particolare riferimento a quelli che controllano i VEGF-A/D e VEGFR3.

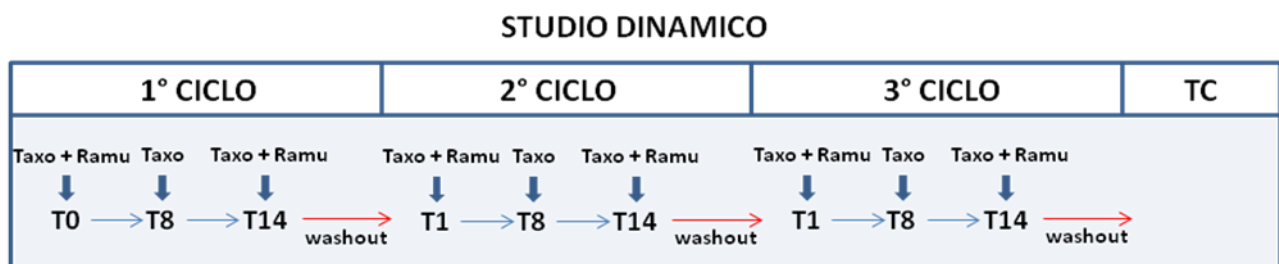
Obiettivo 3

Su diverse linee di cellule gastriche umane saranno studiati, *in vitro*, gli effetti del trattamento con il Ramucirumab o di trattamenti combinati con Ramucirumab e altri agenti chemioterapici o molecolari, sulla proliferazione e migrazione cellulare. Nelle stesse condizioni di trattamento verrà monitorata l'espressione di specifici ncRNA e di alcuni loro bersagli molecolari scelti per il ruolo che svolgono nei processi di crescita e progressione tumorale.

Attività

E' previsto il reclutamento di 40 pazienti con GC in fase di progressione dopo un trattamento chemioterapico di prima linea con il 5FU e derivati del platino. Allo stato attuale abbiamo reclutato 9 pazienti afferenti all' U.O. di Oncologia del nostro Istituto. Inoltre, sono stati reclutati 6 pazienti dall' Oncologia Medica della Seconda Università degli Studi di Napoli diretta dal prof. Ferdinando De Vita, con il quale è stata avviata una collaborazione scientifica relativamente al progetto in questione.

Previo consenso informato, ad ogni paziente entrato nello studio è stato effettuato un prelievo ematico prima dell'inizio della terapia con Ramucirumab (8 mg/kg) e Paclitaxel (80 mg/m²) che rappresenta il T0 (tempo di riferimento), e durante la terapia, secondo lo schema di seguito riportato:



Lo studio prevede nei primi tre mesi della terapia 9 prelievi ematici complessivi, che costituiscono per ciascun paziente delle misurazioni ripetute e correlate. Dopo il terzo ciclo di terapia, alla fine del terzo mese, i pazienti sono sottoposti ad esami diagnostici strumentali al fine di valutare lo stato di avanzamento della malattia. Nel caso in cui venga riscontrata una rapida progressione viene modificato il piano terapeutico, mentre nei casi di malattia stazionaria o di regressione si prosegue la terapia in atto e vengono eseguiti ulteriori prelievi ematici.

Dai campioni ematici di ciascun paziente si ottengono aliquote di siero, plasma e linfomonociti che sono conservate presso la Biobanca del nostro Istituto. Ciascun campione è reso anonimo in base al regolamento della Biobanca.

Risultati

Nella tabella vengono riportati, per ciascuno dei 15 pazienti arruolati sino ad oggi, i campioni di siero che verranno sottoposti ad una prima analisi. In accordo con l'Unità di Oncologia abbiamo deciso di considerare in questa prima fase il primo tempo (T1) di ogni ciclo (triangoli verdi) a cui si aggiunge il prelievo che segna la progressione di malattia (triangoli rossi). Come si può notare, per alcuni pazienti la progressione può essere ritenuta veloce e si osserva già entro il terzo mese di terapia. In questo caso la terapia è stata interrotta immediatamente prima o subito dopo la prima TC. Ci sono pazienti che presentano un controllo della malattia ed altri segni di regressione e pertanto

stanno continuando la terapia. In un paziente si è osservata progressione della malattia all'ottavo ciclo e pertanto si è proceduto a modificare il protocollo terapeutico.

Pazienti	1° ciclo T0	2° ciclo T1	3° ciclo T1	TC	4° ciclo T1	5° ciclo T1	6° ciclo T1	TC	7° ciclo T1	8° ciclo T1
C F	△	△	△	not responder						
M M	△	△	△	not responder	△					
M V	△	△	△	not responder						
P M	△	△	△	responder	△	△	△	responder	△	△
C C	△	△	△	responder	△	△	△	responder	△	
C C	△	△	△	responder	△	△	△	responder	△	
M C	△	△	△	responder	△	△	△	responder		
L G	△	△	△	responder	△					
P R	△	△	△	responder	△					
B M R	△	△	△	not responder						
C V	△	△	△	not responder						
Q G	△	△	△	responder	△					
D C A	△	△	△	not responder						
L M	△	△	△	not responder						

In ciascun campione di siero sono in fase di analisi i livelli di 17 dei principali fattori coinvolti nel processo di angiogenesi con la tecnologia Bio-PlexMagPIX Suspension Array System che è un sistema integrato per analisi quantitative multiparametriche di molecole biologiche in sospensione ottenute da campioni di siero, plasma, medium di colture cellulari, fluidi biologici in genere. Il sistema permette un'analisi simultanea di differenti biomolecole all'interno dello stesso campione.

Di seguito viene riportato l'elenco delle molecole in fase di analisi:

1. VEGF-A
2. VEGF-C
3. VEGF-D
4. sVEGFR-1
5. sVEGFR-2
6. PDGF-AB/BB
7. FGF-basic
8. EGF
9. sEGFR
10. PLGF
11. sTIE-2
12. Angiopoietin-2
13. SCF
14. IL-4
15. IL-7
16. IL-10
17. IL-12(p70)

Sugli stessi campioni di siero sono in corso la valutazione dei livelli dei miRNA coinvolti nel GC e di cui si è dimostrato una relazione con il VEGF.

miR-17-5p target VEGF-A
miR-21-5p target VEGF-A

miR-106a-5p	target VEGF-A
miR-93-5p	target VEGF-A
miR-200c-3p	target VEGF-A
miR-101-3p	target VEGF-C

Dall’analisi dinamica dei livelli sierici dei fattori di crescita e dei ncRNA prima e in corso di trattamento combinato con Ramucirumab e Paclitaxel, ci aspettiamo possibili variazioni nell’espressione di alcuni di questi fattori nel tempo. Variazioni da correlare con la risposta al trattamento farmacologico.

Per quanto riguarda le sperimentazioni *in vitro* previste nello studio, sono già state allestite colture utilizzando le seguenti linee cellulari di carcinoma gastrico umano:

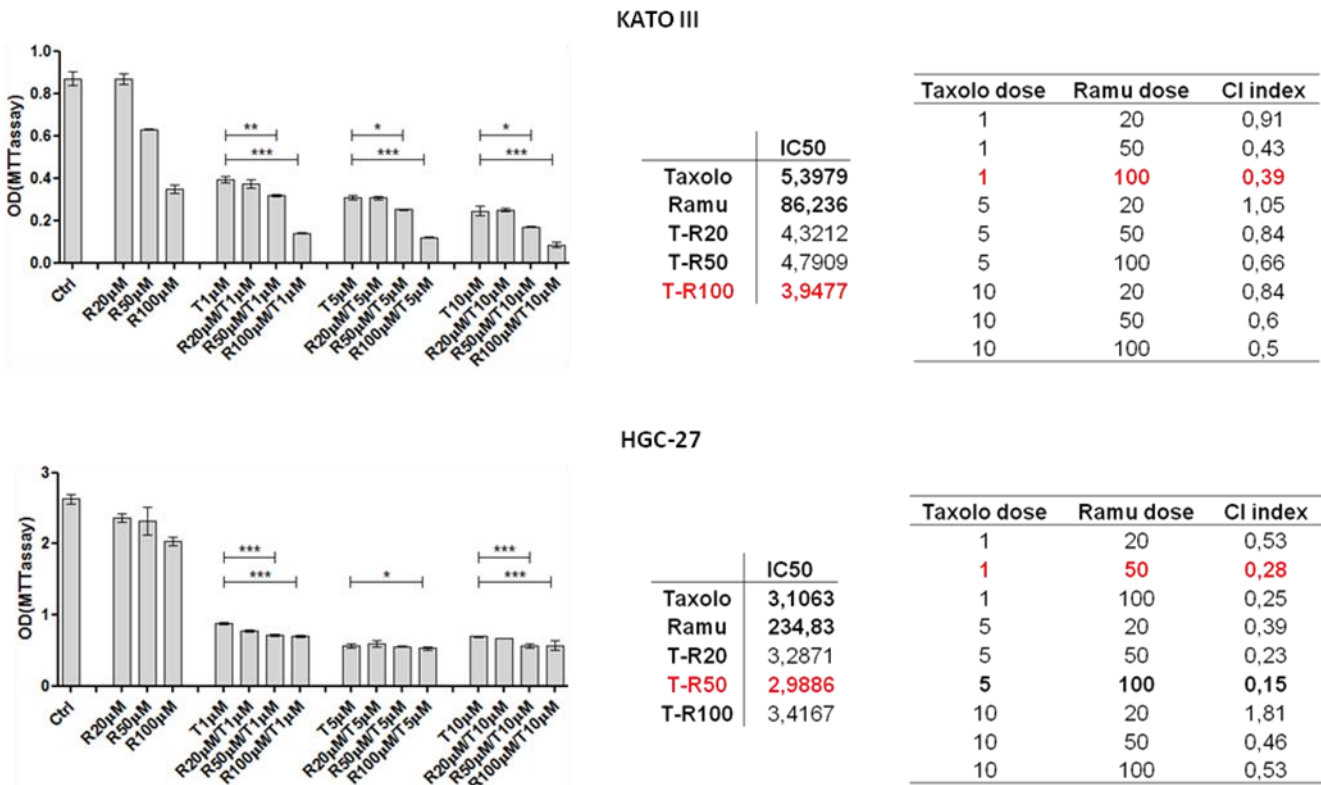
HGC-27

AGS

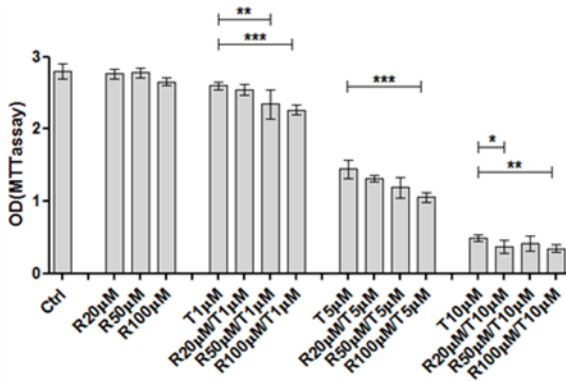
NCI-N87

KATO III

Le cellule in esame sono state sottoposte a trattamenti con Ramucirumab e Paclitaxel somministrati singolarmente ed in combinazione al fine di valutare proliferazione, apoptosi e migrazione cellulare. Di seguito sono riportati i risultati ottenuti negli esperimenti di proliferazione che ci hanno permesso di valutare i valori di IC50 per ciascun farmaco o coppia di farmaci e di CI per ciascuna combinazione degli stessi.



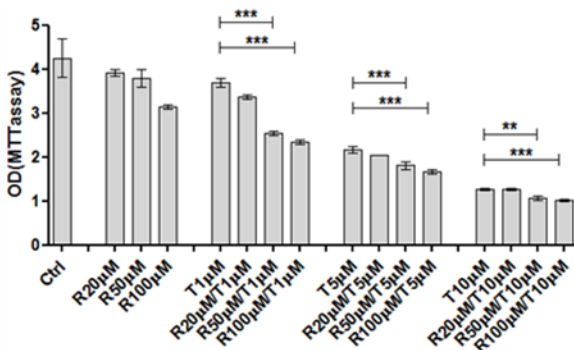
AGS



	IC50
Taxolo	5,8371
Ramu	1030,9
T-R20	5,4965
T-R50	5,2646
T-R100	5,0891

Taxolo dose	Ramu dose	CI index
1	20	0,86
1	50	0,73
1	100	0,68
5	20	1,48
5	50	1,27
5	100	1,06
10	20	0,5
10	50	0,6
10	100	0,45

N-87

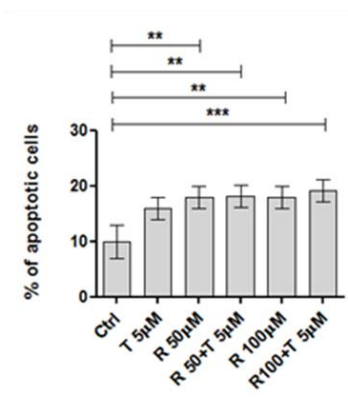


	IC50
Taxolo	6,4178
Ramu	200,1
T-R20	6,6474
T-R50	5,7404
T-R100	6,4547

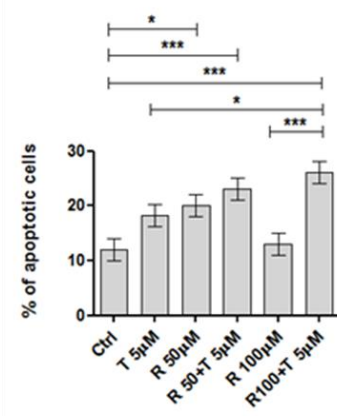
Taxolo dose	Ramu dose	CI index
1	20	0,97
1	50	0,46
1	100	0,4
5	20	1,15
5	50	0,89
5	100	0,74
10	20	0,84
10	50	0,6
10	100	0,56

Si riportano i risultati relativi agli esperimenti di apoptosi

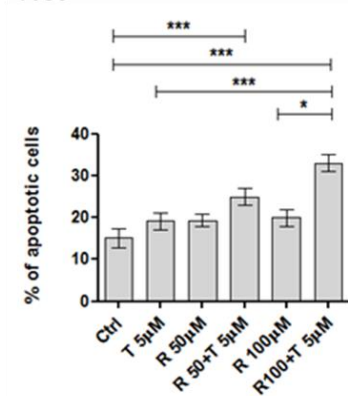
KATO III



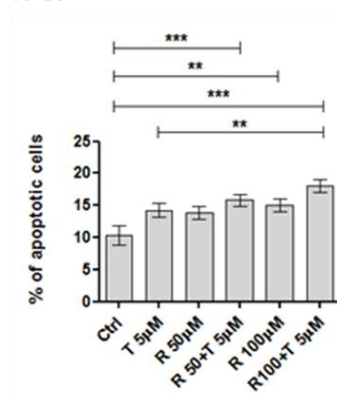
HGC-27



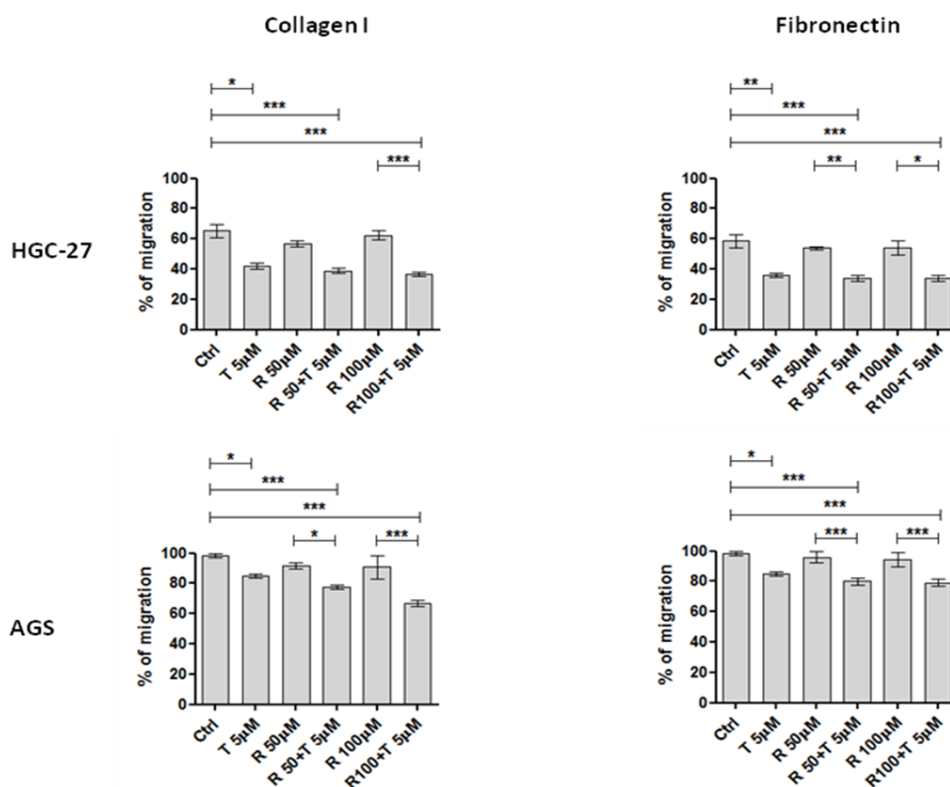
AGS



N-87



Si riportano i risultati relativi agli esperimenti di migrazione



Stabulario

Lo stabulario dell'IRCCS "S. de Bellis" è attivo dal 2011 (Aut.Min. n. 84/2011) come "Stabilimento utilizzatore di animali da esperimento topi e ratti", con rinnovo dell'autorizzazione (n° 03/2017-UT) a partire da febbraio 2017.

Dal 2013 ad oggi è autorizzato come "Stabilimento produttore di animali da esperimento topi e ratti". Lo stabulario alloggia animali da esperimento previsti da Progetti di Ricerca Corrente e Finalizzata, finanziati dal Ministero della Salute.

Lo stabulario è dotato di:

- un laboratorio attrezzato con tecnologia idonea ad eseguire in loco le procedure sugli animali
- Camera di stabulazione per topi (circa 1000 topi)
- Camera di stabulazione per ratti (circa 120 ratti)
- Camera di stabulazione per breeding (56 gabbie)
- Camera di stabulazione per "topi nude" (circa 300 topi)

Tutti i protocolli di stabulazione e di allevamento sono concepiti per garantire la salute e il benessere degli animali. L'accesso allo stabulario è strettamente controllato e limitato per garantire il mantenimento di condizioni microbiologiche SPF e semestralmente vengono effettuate le procedure di sanitizzazione dei locali.

Gli animali sono stabulati in racks a ventilazione forzata (IVC) e mantenuti nel rispetto delle norme Ministeriali vigenti (D.Lgs 26/2014). Giornalmente vengono registrati tutti i movimenti degli animali come carichi (arrivi, svezzamento) e scarichi (mortalità, trasferimenti).

L'attività di ricerca dello Stabulario nel corso dell'anno 2017 si è svolta nell'ambito diversi progetti di ricerca nei quali il personale dello Stabulario è stato impegnato sia nell'esecuzione degli esperimenti che nel contenimento degli animali. Gli studi pre-clinici svolti presso il nostro stabulario sono studi nutrizionali, in linea con le specificità dell'Ente; tali studi permettono di valutare gli effetti di specifici nutrienti della dieta sull'attività proliferativa del tratto gastrointestinale di topi *wild type* o transgenici.

Tutti i progetti di ricerca sono stati sottoposti al vaglio e all'autorizzazione del competente ufficio ministeriale e hanno seguito l'iter procedurale previsto dalle linee guida Ministeriali (decreto legislativo n. 26/2014). Il personale laureato dello stabulario è a supporto dei ricercatori per la predisposizione dei protocolli sperimentali, per il controllo e la stesura della documentazione da trasmettere alle autorità competenti secondo le disposizioni di legge. Il personale tecnico supporta i ricercatori nella preparazione e nel contenimento degli animali.

Progetto: “Modelli animali di patologie umane e monitoraggio genetico di colonie transgeniche murine” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: dott.ssa Angela Tafaro (Contrattista), dott.ssa Giusy Bianco (Contrattista), sig. Vito Spilotro (tecnico stabularista)

Introduzione

I modelli animali di laboratorio sono sviluppati e utilizzati per studiare la causa, la natura e la cura di malattie umane. A parte le ricerche *in vitro* che rimangono fondamentali perché preliminari alle ricerche *in vivo*, l'utilizzo di modelli animali è in grado di dimostrare la presenza di un effetto sull'intero organismo. Ogni modello è unico e permette di studiare i processi biologici e comportamentali di base, fornendo una piattaforma per lo studio dei processi patologici, quali ad esempio le malattie neoplastiche, come il cancro colon rettale (CRC). Studi di comparazione sui modelli animali degli ultimi anni, hanno dimostrato come l'importanza dei risultati derivati dalla sperimentazione *in vivo* dipende dalla scelta di un adeguato modello.

Obiettivi

Primario: Attivare presso lo Stabulario dell'Istituto una sezione dedicata alla riproduzione (breeding) di colonie di topo *wild-type* e transgenici

Secondario: Soddisfare in tempi brevi e con abbattimento dei costi le necessità di *un modello animale* in loco, da utilizzare nella ricerca biomedica, per lo studio di patologie complesse a eziologia multipla, quali l'epatocarcinoma, l'infiammazione cronica intestinale e il cancro del colon retto.

Attività svolte

Il progetto “breeding” ha portato alla stabilizzazione di una linea murina nuova, considerata un modello unico per lo studio della colite ulcerosa (modello Winnie), in quanto, a causa della mutazione del gene *Muc2*, nell'animale si sviluppa spontaneamente una patologia infiammatoria, estremamente simile a quella umana. Per controllare il background genetico delle colonie in breeding è stato effettuato periodicamente lo studio del genotipo mediante analisi del DNA estratto dalle code.

Inoltre, l'attività sperimentale del personale dello stabulario nel corso del 2017 ha riguardato soprattutto lo svolgimento dei seguenti progetti di ricerca:

1. EFFETTI DELLA QUERCETINA SULLA CARCINOGENESI DEL COLON ATTRAVERSO LA MODULAZIONE DEL SISTEMA ENDOCANNABINOIDE E DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE LDL: STUDIO IN VITRO E IN VIVO (responsabile scientifico dott.ssa Notarnicola)
2. MODULAZIONE MORFOLOGICA E FUNZIONALE DELLA COLITE ULCEROSA MEDIANTE L'UTILIZZO DI SOTTOPOPOLAZIONI CELLULARI TNF α -KO NEL MODELLO MURINO *Winnie* (responsabile scientifico dott. Chieppa)
3. EFFETTO PROTETTIVO DELL'LGG SULLA BARRIERA EPITELIALE INTESTINALE IN SEGUITO A DANNO INDOTTO DALLA GLIADINA. RUOLO DELLE POLIAMMINE CELLULARI (responsabile scientifico dott. Russo)
4. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI BIOCHELANTI DI ORIGINE VEGETALE SULLA PREVENZIONE DELLA DISBIOSI INTESTINALE NEL MODELLO MURINO WINNIE (responsabile scientifico dott. Chieppa)
5. LA CRESCITA TUMORALE AUTOCRINA-PARACRINA MEDIATA DALL'ACIDO LISOFOSFATIDICO COME NUOVO APPROCCIO TERAPEUTICO NEL CANCRO AL FEGATO" (responsabile scientifico dott. Mazzocca)

Le principali procedure effettuate sono state:

- Somministrazione di diete speciali
- Misure e calcolo diametri tumorali
- Esame autoptico
- Campionamento dei diversi organi e/o tessuti
- Somministrazione di probiotico a cuccioli di ratto
- Prelievo sangue periferico intra-vitam (coda, femorale, retrorbitale) e peri-mortem (intracardiaco)
- Prelievo feci
- Genotipizzazione
- Inclusione in paraffina di organi e tessuti

Inoltre nell'ambito delle competenze scientifiche dello Stabulario, nel corso dell'anno 2017, l'Organo Preposto al Benessere Animale (OPBA) ha sottoposto al vaglio e all'autorizzazione del competente ufficio ministeriale i progetti di ricerca sotto elencati, dopo aver curato il controllo e la stesura della documentazione da trasmettere alle autorità competenti secondo le disposizioni di legge. Progetti autorizzati dal Ministero nel 2017:

1. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI UNA MISCELA DI FITOESTROGENI, SOSTANZE ANTINFIAMMATORIE E FIBRE NEL PROCESSO DI CARCINOGENESI SU BASE INFIAMMATORIA E GENETICA, RISPETTIVAMENTE NEI MODELLI MURINI AOM/DSS E APC^{MIN/+} (resp. Dott. Di Leo)

2. IMPATTO DELL'INFIAMMAZIONE SISTEMICA SULL' INDUZIONE /PROGRESSIONE DEL CARCINOMA EPATOCELLULARE (resp. dott. Dituri)
3. STUDIO DI DIREZIONAMENTO FISICO AL TESSUTO EPATICO DI NANOPARTICELLE MAGNETICHE SOLIDE LIPIDICHE VEICOLANTI SORAFENIB (resp. Dott. Denora)
4. VALUTAZIONE DELLA SOMMINISTRAZIONE E DEGLI EFFETTI ANTI INFIAMMATORI DEL FARMACO ANAKINRA NEI MODELLI MURINI WINNIE E WINNIE-TNF α KNOCKOUT (resp. Dott. Chieppa)

Laboratorio di Biochimica Nutrizionale

Il Laboratorio di Biochimica Nutrizionale, in linea con le specificità dell'Istituto, ha identificato nello studio delle vie metaboliche e dei profili enzimatici del metabolismo lipidico e glucidico la sua principale area di ricerca. In particolare, ha focalizzato la sua attenzione sugli effetti di alimenti tipici della Dieta Mediterranea in soggetti con sindrome metabolica, obesità e steatosi epatica e con neoplasie del tratto gastrointestinale, conducendo studi sperimentali *in vitro* e studi clinici.

Un altro target di studio del Laboratorio è il tessuto adiposo che ha sicuramente un ruolo chiave nel metabolismo lipidico. E' noto infatti, che cambiamenti nell'espressione degli enzimi e recettori coinvolti nel metabolismo dei lipidi sono presenti nei pazienti con cancro coloretale.

Anche la valutazione della composizione lipidica delle membrane dei globuli rossi è un campo di studio del Laboratorio di Biochimica Nutrizionale. L'analisi lipidomica, applicata alla comprensione di patologie metaboliche e del tumore colo-rettale, si inserisce in un tentativo di esplorare nuove strategie di intervento per queste patologie.

Le principali procedure sperimentali effettuate nel Laboratorio di Biochimica Nutrizionale sono:

- Analisi in gas cromatografia
- Tecniche di biologia molecolare
- Tecniche radiometriche
- Tecniche di colture cellulari

La maggior parte delle apparecchiature oggi in uso nel Laboratorio sono state acquistate grazie al Grant: Reti LAIFF (codice n. 47); "PO Puglia FESR 2007-2013, Asse I, Linea 1.2. Accordo di Programma Quadro in materia di Ricerca Scientifica. Intervento "Reti di Laboratori Pubblici di Ricerca"

L'attività di ricerca del Laboratorio di Biochimica Nutrizionale nell'anno 2017 si è svolta nell'ambito n° 2 progetti di ricerca corrente e n°1 progetto di ricerca finanziato con 5xmille 2015.

Progetto: "Effetti della Quercetina sulla carcinogenesi del colon attraverso la modulazione del sistema endocannabinoide e dell'espressione del recettore LDL: studio in vitro e in vivo"
(Termine del progetto: 31/12/2017).

Responsabile: Dott.ssa Maria Notarnicola

Personale coinvolto: dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott.ssa Caterina Messa, dott.ssa Rosalba D'Alessandro (Contrattista), dott.ssa Valeria Tutino (Contrattista), dott.ssa Angela Tafaro (Contrattista), dott.ssa Giusy Bianco (Contrattista), sig. Valentina De Nunzio (Borsista), sig. Vito Spilotro (tecnico stabularista)

Introduzione

Studi recenti hanno dimostrato che la Quercetina esercita attività antiproliferativa e antineoplastica in diverse linee cellulari tumorali umane, in modelli di tumore del colon, della mammella, del polmone, del fegato e della prostata. Tra i meccanismi d'azione noti della quercetina, uno dei più importanti risulta essere quello della regolazione del pathway Wnt/ β -catenina che è coinvolto nella regolazione dell'espressione di geni implicati nella proliferazione e differenziazione cellulare, adesione e polarità cellulare. Un'alterazione di questa via risulta cruciale nello sviluppo del processo di carcinogenesi, in quanto porta ad un accumulo di β -catenina nel citoplasma e alla sua successiva traslocazione nel nucleo, dove interagisce con le proteine TCF/LEF, attivando la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare (c-myc, ciclina D1). Studi sperimentali *in vitro* hanno dimostrato che la Quercetina esercita i suoi effetti inibitori direttamente sul legame della β -catenina al complesso trascrizionale TCF/LEF, avendo come effetto finale un blocco della trascrizione dei geni a valle ed una diminuzione dei suoi livelli nel nucleo.

Obiettivi

Primario: Esplorare i meccanismi d'azione della Quercetina in due linee di adenocarcinoma umano del colon a diverso grado di differenziazione, Caco-2 e SW480. In particolare si valuterà l'effetto della Quercetina sul sistema Endocannabinoide (EC) e sull'espressione del recettore LDL. Inoltre, si studieranno le vie del segnale implicate nei processi di proliferazione, del ciclo cellulare, dell'apoptosi, della migrazione e dell'invasione cellulare.

Secondario: Studiare gli effetti della Quercetina in un sistema sperimentale *in vivo* di carcinogenesi del colon. La valutazione delle possibili interazioni tra Quercetina, sistema EC e recettore per le LDL sarà effettuata sia sul tessuto tumorale che sulla mucosa sana lontana dal tumore. I dati ottenuti costituiranno la base per lo studio di possibili terapie combinate al fine di rendere più efficace l'azione della Quercetina nella inibizione della crescita e progressione neoplastica del colon.

Attività svolta

L'anno 2017 è stato l'anno conclusivo del progetto. Lo studio *in vitro*, condotto nei primi 2 anni del progetto, ha dimostrato che la Quercetina esercita i suoi effetti inibitori direttamente sul legame della β -catenina, avendo come effetto finale un blocco della trascrizione dei geni a valle ed una diminuzione dei suoi livelli nel nucleo. Le sue proprietà antitumorali, sono inoltre sostenute da meccanismi pro-apoptotici attraverso l'interazione con i recettori estrogenici (ER α e ER β) e con il recettore degli endocannabinoidi CB1.

Durante il 2017 è stato condotto lo studio *in vivo*, al fine di valutare gli effetti della quercetina in un sistema sperimentale *in vivo* di carcinogenesi del colon. Il disegno sperimentale prevedeva l'utilizzo di topi maschi e femmine trattati con AOM per indurre la carcinogenesi intestinale e verificare se il trattamento della quercetina con la dieta potesse modulare la trasformazione neoplastica della mucosa colica di questi animali.

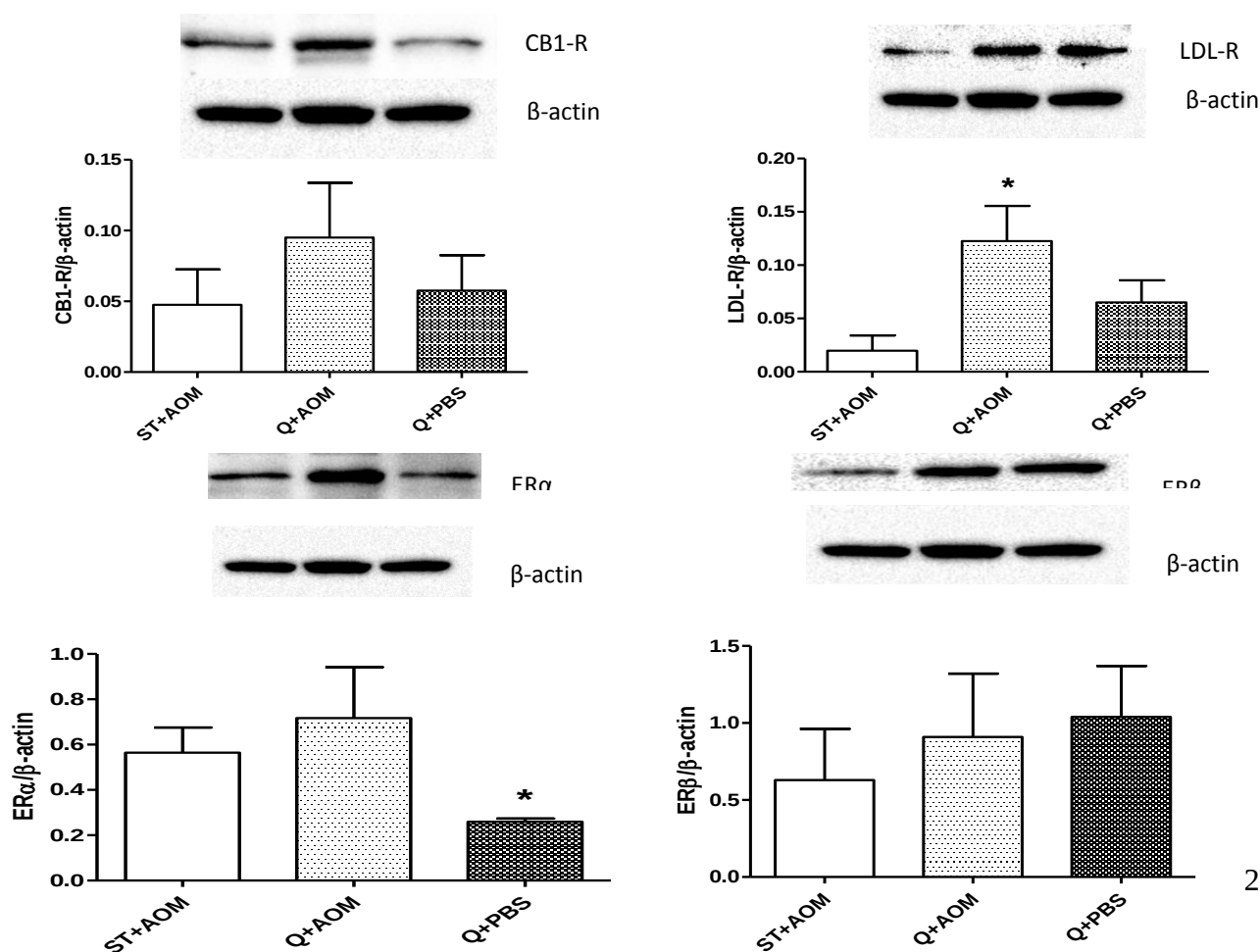
Sono stati allestiti i seguenti gruppi di trattamento:

Gruppi sperimentali	N° di topi	Trattamento	Tempo del sacrificio
C57BL/6 F/M + AOM	20	Dieta con Quercetina (0.5%)	Dopo 8 (10 animali) e dopo 35 settimane (10 animali)
C57BL/6 F/M + AOM	20	Dieta Standard	Dopo 8 (10 animali) e dopo 35 settimane (10 animali)

Gruppi Placebo	N° di topi	Trattamento	Tempo del sacrificio
C57BL/6 F/M + PBS	20	Dieta con Quercetina (0.5%)	Dopo 8 (10 animali) e dopo 35 settimane (10 animali)
C57/BL 6 F/M + PBS	20	Dieta Standard	Dopo 8 (10 animali) e dopo 35 settimane (10 animali)

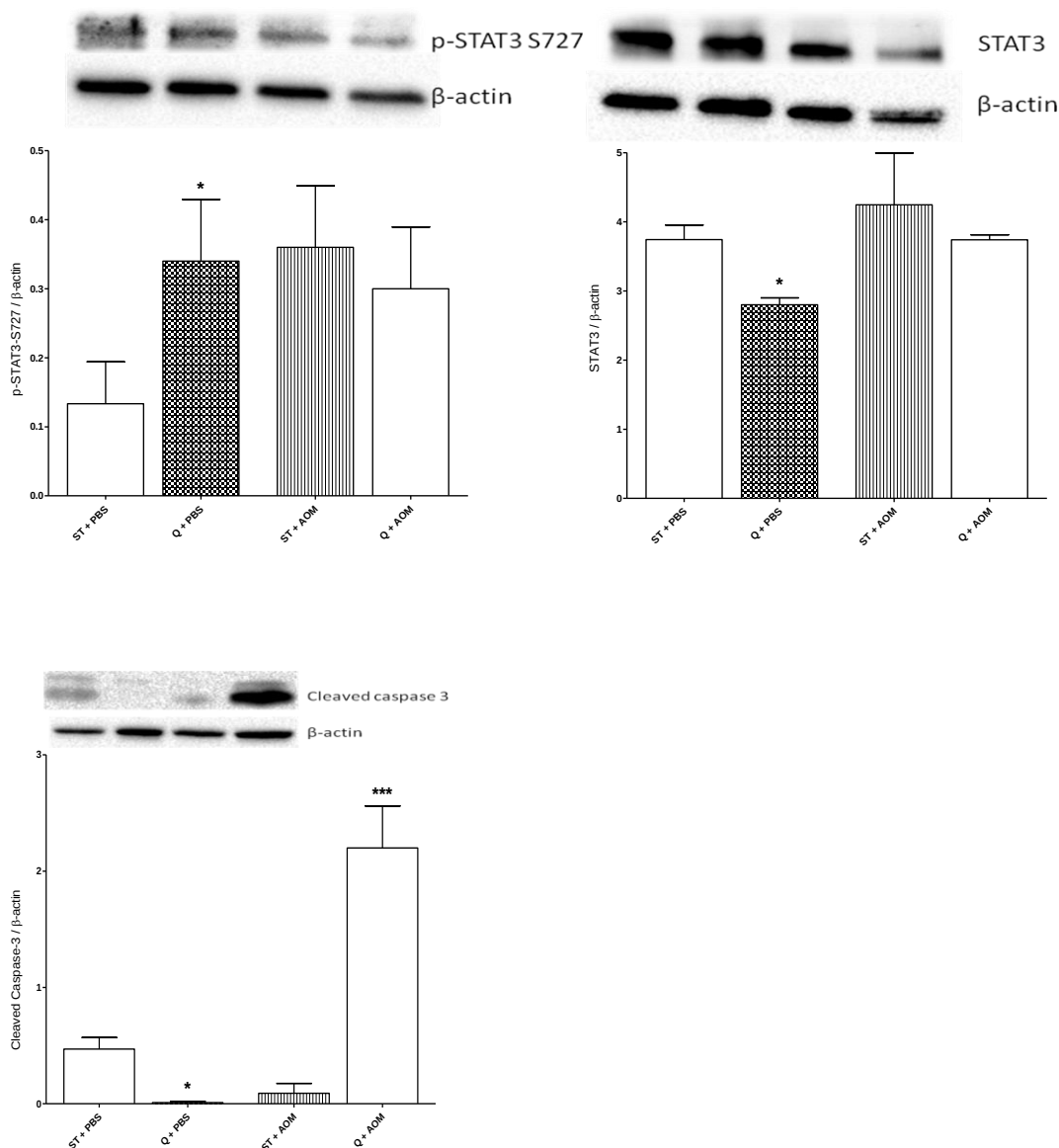
Risultati

Dagli esperimenti a 8 settimane di trattamento abbiamo ottenuti i seguenti risultati:



I risultati dimostrano che anche in un sistema *in vivo* di carcinogenesi del colon, la quercetina è in grado di indurre i recettori CB1-R, LDL-R e ER β e ridurre l'espressione di ER α , quest'ultimo considerato un mediatore positivo della proliferazione cellulare.

Dopo 35 settimane di trattamento, oltre allo studio dei recettori è stata valutata l'attività proliferativa ed apoptotica:



UOC di Patologia Clinica

L'UOC di Patologia Clinica svolge da diversi anni attività di ricerca in collaborazione con gli altri laboratori e reparti dell'Istituto, oltre a numerose collaborazioni esterne con altri IRCCS, Università, CNR e Società Scientifiche.

Nel corso di questi anni l'attività di ricerca si è concentrata sullo studio di nuovi biomarcatori applicati alla gastroenterologia, in particolare nell'ambito dell'oncologia, delle epatopatie croniche, delle IBD, delle intolleranze alimentari e dei disturbi della nutrizione. Infine, grande attenzione è stata rivolta alla standardizzazione delle metodiche immunometriche e alle tecniche di biologia molecolare. Inoltre, è operativa una biobanca per lo stoccaggio dei campioni biologici rivenienti dall'attività clinica dei diversi reparti.

Progetto: “Biopsia liquida: dosaggio del ctDNA (DNA tumorale circolante): stato mutazionale in pazienti affetti da GIST” (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile: Dr. M. Correale;

Partecipanti: I. Lolli (Oncologia), M.G. Bianco (Contrattista), C. Lotesoriere (Oncologia), P.A. Iacovazzi (Patologia Clinica), A.M. Mastrosimini (Patologia Clinica), V. Disciglio (Patologia Clinica Contrattista), M. Liso (Borsista), R. Lentini (Oncologia Borsista), C. M. Leone (Patologia Clinica Borsista), P.L. Pesole (Patologia Clinica Borsista), T. Pinto (Patologia Clinica Borsista)

Introduzione

I tumori gastrointestinali (GIST) sono neoplasie rare e rappresentano la forma più comune di tumori mesenchimali del tratto gastrointestinale. In Italia l'incidenza è di circa 1 – 1,5 casi per 100.000 abitanti/anno. Per la regione Puglia (4.063.088 abitanti) è possibile stimare 48 nuovi casi attesi per anno, considerando un tasso di densità di incidenza pari a 1,18/100.000/anno e assumendo che la densità di incidenza del tumore sia omogenea in tutto il territorio nazionale. Attualmente lo standard terapeutico per i pazienti affetti da GIST in fase metastatica è rappresentato da imatinib, un inibitore tirosinchinasico^[1]. Tale farmaco viene inoltre utilizzato come trattamento neoadiuvante ed adiuvante nei pazienti con diagnosi di GIST in fase localizzata che hanno subito la rimozione completa del tumore. Per i pazienti affetti da GIST, la risposta alla terapia è valutata mediante diagnostica per immagini il cui limite è rappresentato da una limitata sensibilità e specificità. La maggior parte dei GIST (85%) presenta mutazioni nei recettori tirosinchinasici trans membrana: KIT (tyrosine-protein kinase Kit) e PDGFR-alpha (platelet-derived growth factor receptor alpha)^[2]. La normale pratica clinica prevede che la diagnosi di questa malattia avviene mediante un esame morfologico dei campioni istologici, completato dalla valutazione dello stato molecolare dei geni *KIT* e *PDGFRA* nel DNA tumorale^[1]. Caratteristica dei GIST è la variabilità delle mutazioni presenti e la comparsa, nel decorso della malattia, di mutazioni secondarie responsabili dell'insorgenza di resistenza al trattamento. Le mutazioni che insorgono secondariamente nei pazienti GIST sono localizzate in due domini principali della proteina KIT: i) il dominio ATP-binding pocket, codificato dagli esoni 13 e 14 del gene KIT, che interferisce direttamente con il farmaco; ii) il dominio “activation loop”, dove le mutazioni possono stabilizzare la proteina KIT nella conformazione attiva ed impedire quindi l'interazione con il farmaco^[3-4]. Al momento, la sola fonte di DNA tumorale utile per valutazioni biomolecolari o genomiche è assicurata dai campioni di tessuto neoplastico ottenuto da procedure chirurgiche o biotiche. L'invasività di tali metodiche rende difficile il campionamento di tessuto tumorale ripetuto nel tempo. Di conseguenza è possibile ottenere solo un'immagine statica dell'assetto molecolare del tumore, quella relativa alla diagnosi, mentre viene preclusa la possibilità di cogliere in tempo, l'insorgenza di mutazioni secondarie caratterizzanti l'eterogeneità molecolare dei GIST. Questo comporta difficoltà e ritardi nella prescrizione di terapie in grado di contrastare la maggiore aggressività della malattia. Le limitazioni proprie delle biopsie tissutali possono essere superate ricorrendo alla “biopsia liquida” che permette, mediante un prelievo di sangue venoso, di ottenere DNA tumorale circolante (ctDNA) da utilizzare per valutazioni biomolecolari^[5-7]. Studi recenti hanno dimostrato che alterazioni somatiche dei geni KIT e PDGFRA identificate nel tessuto tumorale possono essere identificate nel ctDNA di pazienti affetti da GIST^[8-10]. Questa strategia diagnostica potrebbe integrare, e/o in futuro sostituire, la biopsia tradizionale, con vantaggi sia per il paziente, che usufruirebbe di una metodica non invasiva, sia per il clinico che potrebbe meglio monitorare la malattia per la possibilità di

prelievi ematici seriali nel tempo. Nostro intento è quello di verificare, nei pazienti afferenti la U.o.s. di Oncologia affetti da GIST, l'applicabilità clinico-diagnostica di questa metodologia.

Obiettivi del progetto:

Il presente studio si pone i seguenti obiettivi: i) stimare l'efficienza della biopsia liquida (analisi del ctDNA) nel confronto della biopsia tessutale (analisi del DNA tumorale tissutale); ii) determinare la sensibilità clinica e la specificità clinica della biopsia liquida e definire la percentuale di concordanza fra i due test; iii) correlare i dati di sensibilità clinica e specificità clinica della biopsia liquida con le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti: malattia localizzata, malattia metastatica, sede anatomica del tumore, carico tumorale, indice mitotico, infiltrazione vascolare. Per il presente studio prevediamo di arruolare 35 casi GIST in 36 mesi. In caso di mancato raggiungimento del numero ci prefiggiamo di coinvolgere altri centri per l'arruolamento di nuovi casi. Per tutti quanti i casi che saranno analizzati, verranno determinate la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA^[11] e tali dati verranno correlati alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

Attività svolta:

Nel nostro istituto, che rappresenta l'istituto gastroenterologico nazionale, presso la U.O.s di Oncologia Medica afferiscono pazienti affetti da GIST in fase localizzata o metastatica che vengono avviati a terapia mirata con farmaci a bersaglio molecolare. Da gennaio 2017 sino ad oggi cinque pazienti GIST in fase avanzata sono giunti all'osservazione dell'unità di Oncologia del nostro Istituto. Di tre pazienti è in corso l'analisi molecolare dei geni *PDGFRA* e *KIT* su DNA estratto da tessuto tumorale. I restanti due pazienti sono stati inclusi nel presente studio per l'analisi molecolare del ctDNA. Le caratteristiche clinico-patologiche dei casi GIST sino ad ora inclusi nello studio sono riportati nella Tabella 1. Il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti, e campioni di sangue sono stati raccolti prima dell'inizio della terapia farmacologica. I campioni di sangue sono stati subito processati per la raccolta del plasma, mediante 2 centrifugazioni successive (2500 g x 10 minuti, a 4°C). Il plasma recuperato è stato suddiviso in aliquote da 1 mL e conservato alla temperatura di -80°C fino alla successiva estrazione degli acidi nucleici circolanti. L'estrazione del DNA libero circolante è stata effettuata manualmente utilizzando il kit commerciale "QIAamp® Circulating Nucleic Acid kit" (Qiagen), seguendo il protocollo della ditta produttrice e partendo da una aliquota di 1mL di plasma. Il DNA totale libero circolante è stato quantificato mediante il fluorimetro Qubit e utilizzando il kit "Qubit® dsDNA HS (High. Sensitivity) Qubit Assay" (ThermoFisher Scientific).

Tabella 1: caratteristiche clinico-patologiche dei casi GIST.

Caso	Età diagnosi / sesso	Tumore Primitivo				Risposta alla terapia	Tumore Secondario			
		Loc.	Dim. (cm)	Cont a mitotica	Mutazione		Loc.	Dim. (cm)	Cont a mitotica	Mutazione
1	39/F	Retto	6,5x6	>5/50 HPF	<i>KIT</i> esone 11 del Q556-K558	Buona risposta a Imatinib (400 mg al giorno) per 3 anni.	Retto	3x3	-	Analisi in corso
2	49/M	Stomaco	14	<5/50 HPF	<i>KIT</i> esone 11 p.V559D	Buona risposta a Imatinib (400 mg al giorno)	-	-	-	-

Risultati conseguiti:**Caso 1:**Descrizione clinica:

Una donna all'età di 39 anni si è sottoposta ad intervento di resezione marginale del retto e del coccige (data intervento 13/04/2010) per una neoformazione (6x5cm) sferoidale dello scavo pelvico con coinvolgimento extramucoso della parete posteriore del retto distale fino al giunto anorettale. L'esame istologico (data 11/05/2010), eseguito sul tessuto tumorale asportato chirurgicamente, ha permesso di diagnosticare una neoplasia a cellule fusate della parete del retto con un indice mitotico >5/50HPF, con caratteri morfologici riferibili a tumore stromale gastrointestinale e ad alto rischio di recidiva. L'analisi molecolare dei geni *KIT* e *PGFRA*, eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, identifica la presenza di una delezione di 9 paia di basi nell'esone 11 del gene *KIT* coinvolgente gli amminoacidi Q556, W557 e K558 della proteina KIT (data 18/06/2010). La paziente viene subito sottoposta a terapia adiuvante con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno (data 30/05/2010) per tre anni che viene sostanzialmente ben tollerata. Segue follow-up negativo fino ai 6 anni, quando esegue risonanza magnetica (data 12/07/2016) che rivela in corrispondenza della parete posteriore del terzo medio del retto una formazione rotondeggiante di 3x3 cm circa a margini regolari. L'endoscopia rettale evidenzia formazione ovalare disomogenea ipoecogena, vascolarizzante, delle dimensioni di 38x30 mm a contatto con la parete rettale. L'esame istologico eseguito su agoaspirato evidenzia materiale prevalentemente ematico inglobante frammenti puntiformi di neoplasia ed elementi fusocellulari ed epitelioide. Tale esame determina ipotesi diagnostica di recidiva di GIST rettale. La paziente viene pertanto subito sottoposta ad intervento chirurgico di proctomia totale con resezione intersfinterica per via laparoscopica transanale (data 28/12/2016). L'esame istologico rivela: i) segmento di parete retto-ale comprendente GIST ad alto rischio di metastatizzazione recidivo. I margini di resezione chirurgica prossimale, distale e radiale sono esenti da neoplasia; ii) cistoadenoma dell'ovaio; iii) neoformazione cutanea benigna

polipoide a struttura fibrovascolare. Dopo 4 mesi dall'intervento chirurgico riprende terapia con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno. Prima dell'inizio della ripresa della terapia con Imatinib è stato eseguito prelievo di sangue per l'analisi del DNA tumorale circolante.

Analisi della variante p.Q556_K558del identificata nel gene KIT:

La variante, identificata nel DNA estratto da tessuto tumorale primitivo della paziente, determina la delezione di 3 amminoacidi (556, 557, 558) coinvolgenti il dominio juxtamembrana della proteina KIT. Sebbene sino ad oggi non sono stati pubblicati lavori scientifici in merito alla caratterizzazione funzionale di tale variante, studi riguardanti le varianti del gene *KIT* coinvolgenti gli amminoacidi 557, 558 e 559 hanno dimostrato che quest'ultima determina un'attivazione costitutiva della proteina^[12-14]. È pertanto possibile ipotizzare che anche la variante identificata nella paziente determini l'attivazione della proteina KIT. La ricerca della variante p.Q556_K558 nel database COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer), ha permesso di individuare 6 lavori scientifici in cui tale variante è stata identificata in 6 tessuti tumorali di pazienti affetti da GIST (Tabella 2)^[15-20]. Di 6 pazienti riportati in letteratura, solo di 3 pazienti con la variante p.Q556_K558del sono riportate informazioni clinico-patologiche: i tre casi descritti hanno sviluppato tumore GIST ad alto rischio di recidiva.

Tabella 2: Pazienti GIST riportati in letteratura in cui è stata identificata la variante p.Q556_K558del

Età / Sesso	Localizzazione / Dimensioni (cm)	Conta mitotica	Rischio	Progressione di malattia	Sopravvivenza globale (mesi)	Terapia	Pubmed ID
56/M	Intestino / 6.5 cm	>5/50 HPF	Alto	Sviluppo di metastasi epatiche	Deceduto per progressione tumorale (19)	N.D.	16166437
56/M	Intestino / <10 cm	>10/50 HPF	Alto	N.D.	Deceduto per progressione tumorale (19)	N.D.	17673922
68/M	Stomaco / 17	2/50 HPF	Alto	N.D.	N.D.	N.D.	22866155
M/56	Retto / N.D.	N.D.	N.D.	Sviluppo di metastasi epatiche e ossee	Deceduto per progressione tumorale (N.D.)	400 mg per 10 mesi; 800 mg per progressione tumorale.	19369884
N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	19900103
N.D.	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	20718716

N.D.: Dato non disponibile.

Analisi del DNA tumorale circolante:

La paziente è stata sottoposta a prelievo di sangue venoso (10 mL) prima dell'inizio della ripresa della terapia con Imatinib. L'estrazione del DNA circolante è stata effettuata partendo da 1 mL di plasma e il suo dosaggio determinato mediante Qubit ha rilevato una concentrazione pari a 0,176 ng/μL.

L'analisi molecolare dei geni *KIT* e *PDGFRA* su tessuto tumorale secondario è in corso al fine di verificare la presenza di eventuali mutazioni insorte secondariamente nel gene *KIT*. Le varianti identificate verranno successivamente analizzate mediante Droplet Digital PCR (strumento in fase di acquisizione da parte dell'ente "IRCCS S. De Bellis") nel DNA tumorale circolante.

Caso 2:

Descrizione clinica:

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 49 anni ha sviluppato GIST. Il primo esame TAC addome rivela una lesione rotondeggiante a pareti regolari con alcune calcificazioni e contenuto disomogeneamente liquido con diametro di circa 14 cm strettamente adesa alla grande curvatura gastrica. Si ipotizza che la lesione possa essere riferibile a GIST. Il paziente si sottopone quindi ad intervento chirurgico (data 18/11/2015) per asportazione di tumore cistico con resezione del tratto di stomaco coinvolto e colecistectomia. L'esame istologico rivela tumore stromale gastrointestinale fuso-cellulare dello stomaco con fenomeni cistico degenerativi ed estesi focolai di necrosi e calciosi, e con indice mitotico pari a <5 per 50 HPF (rischio intermedio). Per recidiva di malattia a gennaio 2017, è stata eseguita analisi molecolare dei geni *KIT* e *PDGFRA* su DNA estratto da tessuto tumorale primitivo mediante sequenziamento diretto, che ha rilevato la presenza della variante p.Val559Asp. Dal 27 febbraio 2017 il paziente ha iniziato terapia con Imatinib al dosaggio di 400mg al giorno. Il paziente tollera bene il farmaco e sino ad oggi la malattia è stazionaria senza progressione. Prima dell'inizio della terapia è stato eseguito prelievo di sangue per l'analisi del DNA tumorale circolante.

Analisi della variante p.Val559Asp identificata nel gene KIT:

La variante p.Val559Asp identificata nel tessuto tumorale primitivo del paziente, è localizzata nel dominio iuxtamembrana della proteina KIT (codificato dall'esone 11 del gene) e determina l'attivazione costitutiva della proteina^[12; 21]. Nel dataset COSMIC tale variante (COSM1252; COSM12435) è stata identificata in 242 casi e ricorre nel 2,6% dei casi totali (N = 9300) riportati nel database.

Analisi del DNA tumorale circolante:

Il paziente è stato sottoposto a prelievo di sangue venoso (10 mL) prima dell'inizio della terapia con Imatinib. L'estrazione del DNA circolante è stata effettuata partendo da 1 mL di plasma e il suo dosaggio determinato mediante Qubit ha rilevato una concentrazione pari a 0,210 ng/μL.

L'analisi molecolare della variante p.Val559Asp del geni *KIT* verrà analizzata mediante digital droplet PCR (strumento in fase di acquisizione da parte dell'ente "IRCCS S. De Bellis") nel DNA tumorale circolante.

Bibliografia

1. Linee guida SARCOMI DEI TESSUTI MOLLI E GIST, Aiom - Edizione 2014
2. Ravegnini G et al., Personalized Medicine in Gastrointestinal Stromal Tumor (GIST): Clinical implications of the Somatic and Germline DNA Analysis 5 Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 15592-15608;
3. Heinrich MC et al., Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors.

J Clin Oncol. 2006 Oct 10;24(29):4764-74.

4. Maier J et al., Detection of Mutant Free Circulating Tumor DNA in the Plasma of Patients with Gastrointestinal Stromal Tumor Harboring Activating Mutations of CKIT or PDGFRA. Clin Cancer Res; 19(17) September 1, 2013

5 Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA Cancer Discov. 2014 June; 4(6): 650–661

6. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA Nature, 108, vol. 497, 2 May 2013

8. Wan JC et al., Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA Nat Rev Cancer. 2017 Apr;17(4):223-238. Epub 2017 Feb 24.

9. Maier J et al., Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA. Clin Cancer Res. 2013 Sep 1;19(17):4854-67.

10. Kang G.et al., Detection of KIT and PDGFRA mutations in the plasma of patients with gastrointestinal stromal tumor. Target Oncol. 2015 Dec;10(4):597-601.

11. Lee JY et al., Longitudinal monitoring of EGFR mutations in plasma predicts outcomes of NSCLC patients treated with EGFR TKIs: Korean Lung Cancer Consortium (KLCC-12-02).

12. Hirota S. et al., Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. Science. 1998 Jan 23;279(5350):577-80.

13. Corless CL et al., Biology of gastrointestinal stromal tumors. J Clin Oncol. 2004 Sep 15;22(18):3813-25.

14. Wardelmann E. et al., Deletion of Trp-557 and Lys-558 in the juxtamembrane domain of the c-kit protooncogene is associated with metastatic behavior of gastrointestinal stromal tumors. Int J Cancer. 2003 Oct 10;106(6):887-95.

15. Haller F. et al., Prognostic role of E2F1 and members of the CDKN2A network in gastrointestinal stromal tumors. Clin Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6589-97.

16. Haller F. et al., Site-dependent differential KIT and PDGFRA expression in gastric and intestinal gastrointestinal stromal tumors. Mod Pathol. 2007 Oct;20(10):1103-11.

17. Mendoza Y. et al., Beginning of personalized medicine in Panama: Molecular and pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumors from archival paraffin-embedded tissue. Oncol Lett. 2011 Sep 1;2(5):941-947.

18. Armbrust T. et al., Does imatinib turn recurrent and/or metastasized gastrointestinal stromal tumors into a chronic disease? - single center experience. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2009 Jul;21(7):819-23

19. Kwon JE et al., Pathological characteristics of gastrointestinal stromal tumours with PDGFRA mutations. Pathology. 2009;41(6):544-54.

20. Tryggvason G et al., Tyrosine kinase mutations in gastrointestinal stromal tumors in a nationwide study in Iceland. APMIS. 2010 Sep 1;118(9):648-56.

21. Wasag B et al., Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. Exp Hematol. 2011 Aug;39(8):859-65.e2.

Presentazioni a congresso (Poster):

- 1) Nuova variante del gene *KIT* associata a tumore stromale gastrointestinale metastatico: descrizione di un caso e revisione della letteratura

V. Disciglio, C. Fasano, L. Russo, G. Forte, P. Sanese, V. Celestini, A. Peserico, M. Lepore Signorile, V. Grossi, L. Troiani, **I. Lolli**, C. Simone. (SIGU 2017, Napoli)

- 2) L'oncosoppressore FoxO3A protegge le cellule tumorali da stress metabolico e da chemioterapia grazie alla sua localizzazione mitocondriale C. Fasano, V. Celestini, T. Tezil, L. Russo, P. Sanese, G. Forte, A. Peserico, M. Lepore Signorile, **V. Disciglio**, D. De Rasmio, A. Signorile, G. Raffaella, N. Scialpi, M. Terao, E. Garattini, T.M. Cocco, G. Villani, A. Moschetta, V. Grossi, C. Simone. (SIGU 2017, Napoli)
- 3) Caratterizzazione molecolare e funzionale di una nuova isoforma mitocondriale del fattore di trascrizione FoxO3A. L. Russo, V. Celestini, T. Tezil, C. Fasano, G. Forte, P. Sanese, A. Peserico, M. Lepore Signorile, **V. Disciglio**, D. De Rasmio, A. Signorile, R. Gadaleta, N. Scialpi, M. Terao, E. Garattini, T.M. Cocco, G. Villani, A. Moschetta, V. Grossi, C. Simone. (SIGU 2017, Napoli)
- 4) Nuove terapie mirate a bersaglio molecolare: vincere la chemioresistenza inibendo la metiltransferasi SMYD3 P. Sanese, A. Peserico, V. Celestini, C. Fasano, V. Grossi, M. Lepore Signorile, L. Russo, G. Forte, **V. Disciglio**, G. Caretti, A. Del Rio, C. Simone. (SIGU 2017, Napoli)
- 5) L'asse MAPK/c-Myc nel cancro del colon-retto: nuovi meccanismi patogenetici e approcci terapeutici M. Lepore Signorile, V. Grossi, P. Sanese, V. Celestini, C. Fasano, G. Forte, L. Russo, **V. Disciglio**, C. Simone. (SIGU 2017, Napoli)

UOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva

L'UOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva si occupa prevalentemente di malattie infiammatorie dell'intestino e di malattie delle vie biliari. Ha un servizio di endoscopia digestiva ed una UOS di fisiopatologia digestiva. Ha un ambulatorio dedicato alle infusioni di farmaci biologici per le IBD.

Il reparto accoglie comunque pazienti con ogni tipo di patologia gastroenterologica attraverso i canali delle urgenze e dell'ambulatorio.

Le neoplasie gastrointestinali nel mondo rappresentano il 25% circa di tutte le neoplasie diagnosticate e producono tassi di mortalità variabili in relazione alla sede di insorgenza e all'istotipo.

Epidemiologicamente, l'incidenza di cancro gastrico in Asia, Europa e Nord America è più alta che nel resto del mondo. La sua incidenza è in incremento e rappresenta il quinto tumore per incidenza (1 milione circa nel 2012) e il terzo per mortalità. Risulta più frequente negli uomini. L'incidenza dei tumori non cardiaci si è ridotta con l'eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori*, il miglioramento dell'igiene e della sanità pubblica, l'aumentata disponibilità di frutta e verdura fresche e l'uso meno frequente dei processi di conservazione del cibo sotto sale e con affumicatura. Tuttavia, il cancro gastrico non cardiaco resta comune in Cina, Giappone, Europa dell'Est e America Centro-Meridionale; mentre il cancro gastrico cardiaco è aumentato nei paesi Occidentali.

Il cancro colo-rettale è il terzo cancro più comune al mondo dopo quello del polmone e della mammella e produce una mortalità inferiore rispetto al cancro gastrico e al cancro bilio-pancreatico. Il cancro esofageo è l'ottavo cancro più comune al mondo. La sua incidenza aumenta con l'avanzare dell'età ed è simile tra i due sessi. Il carcinoma a cellule squamose dell'esofago (SCC) costituisce la maggior parte dei casi seguito dall'adenocarcinoma (AC). Sebbene l'incidenza del carcinoma a cellule squamose si sia ridotta nei paesi più sviluppati, dove l'incidenza annuale è generalmente meno di 10 nuovi casi su 100.000 abitanti per anno, l'incidenza è rimasta piuttosto

alta in alcuni paesi meno sviluppati, dove il tasso di incidenza può superare i 100 nuovi casi su 100.000 abitanti per anno, in particolare in aree ad alto rischio della Cina, dell'Iran e del Sud Africa.

In Italia, nel 2013 (anno più recente per il quale si dispone di dati ISTAT), sono avvenute 168.137 morti per neoplasie maligne. 51.128 (30.4%) sono avvenute per neoplasie del tratto digestivo, così suddivise: 1.815 esofago, 9595 stomaco, 18.756 colon, 9761 fegato e vie biliari e 11.201 pancreas. Le neoplasie del tratto digestivo, più delle altre, risultano in incremento. Si comprende l'importanza della diagnosi precoce delle neoplasie e il riscontro e la resezione endoscopica dei loro precursori. La diagnosi dei precursori neoplastici e delle lesioni early e il trattamento degli stessi per via endoscopica è l'obiettivo dei sistemi sanitari evoluti.

La realizzazione di questi obiettivi, però, richiede competenze professionali e risorse economiche importanti. Sebbene i costi siano da considerare vantaggiosi nel sistema complessivo di calcolo che includa il trattamento delle neoplasie avanzate. Per non parlare dei vantaggi in termini di qualità di vita delle persone.

Nell'IRCCS "De Bellis" l'incontro scientifico del 22-23 gennaio 2016 dal tema "Le neoplasie precoci gastrointestinali" ha segnato l'inizio ufficiale dell'attività di studio sulla diagnosi e il trattamento delle neoplasie precoci gastrointestinali.

Il suddetto incontro scientifico è stato la conclusione di un percorso formativo iniziato nel 2011 con la ricerca dei casi di displasia del tratto digestivo superiore tra i soggetti sottoposti nell'IRCCS "De Bellis" a esofagogastroduodenoscopia e con diagnosi di esofago di Barrett e gastrite cronica atrofica con metaplasia intestinale. Tale percorso è proseguito con la frequenza di centri dediti alle dissezioni sottomucose gastrointestinali come il Policlinico "Gemelli" di Roma e l'Istituto Humanitas di Milano, fino al fellowship presso il National Cancer Center Hospital di Tokyo a fine 2016 da parte della dott.ssa Alba Panarese.

L'attività scientifica di ricerca, dal 2011 al 2017, è stata incentrata sulla valutazione epidemiologica della displasia nell'esperienza del nostro centro, con la casistica relativa la displasia nell'esofago di Barrett e nelle gastriti croniche atrofiche.

Nel 2015, la proponente, ha presentato un protocollo di ricerca relativo all'incidenza di displasia nelle coliti infiammatorie croniche idiopatiche. Il protocollo *"Incidenza di displasia e cancro colo-rettale nei soggetti affetti da colite infiammatoria cronica idiopatica in terapia con farmaci biologici, mesalazina, immunosoppressori ed associazioni di farmaci"* prevede una fase retrospettiva ed una prospettica.

Progetto: "Incidenza di displasia e cancro colo-rettale nei soggetti affetti da colite infiammatoria cronica idiopatica in terapia con farmaci biologici, mesalazina, immunosoppressori ed associazioni di farmaci" (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa Alba Panarese

Partecipanti: Dott. Pietro Giorgio (Gatreenterologia 2), Dott. Renato Cuppone (Gatreenterologia 2), Dott. Mauro Mastronardi (Gatreenterologia 2), Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott. Raffaele Armentano (Anatomia Patologica), Dott. Alberto R. Osella (Epidemiologia e Biostatistica)

Introduzione

I dati della letteratura documentano che le malattie infiammatorie croniche intestinali (retto colite ulcerosa e morbo di Crohn) determinano, nel tempo, rispetto alla popolazione generale, un

incremento del rischio di sviluppare displasia e cancro del colon-retto, per la flogosi cronica che esse comportano e con le differenze che le due malattie presentano. La progressione da mucosa normale a displasia e, poi, a cancro è più rapida che nella sequenza adenoma-carcinoma della popolazione non affetta da colite infiammatoria cronica idiopatica e, per i pazienti che effettuano regolari controlli, più spesso associata a forme early di neoplasia colo-rettale.

Una metanalisi degli studi pubblicati, nel 2001, ha riportato un rischio di cancro associato a colite (CAC), a 10 anni dalla diagnosi del 2%, a 20 anni dell'8% e a 30 anni del 18%. La metanalisi di Jess e coll., più recente (2012), ha riportato un rischio di CAC di 1.6% entro 14 anni dalla diagnosi. Lo stesso autore stabilisce che, a 30 anni dalla diagnosi di IBD, il rischio di CAC non è maggiore di quello di CRC nella popolazione generale, forse in considerazione dell'aumentato rischio di CRC nella popolazione generale occidentale.

Uno studio ancora più recente conclude che il rischio di CAC, nonostante le moderne terapie, resta alto, sebbene sia alta la frequenza dell'early cancer.

Nel CAC è assente la classica sequenza adenoma-adenocarcinoma tipica del CRC sporadico. Invece, è presente l'associazione con i processi di flogosi cronica, anche quando solo istologicamente documentati; la progressione da mucosa normale a displasia e, poi, a cancro è più rapida che nella sequenza adenoma-carcinoma della popolazione non IBD; aumenta la frequenza di neoplasie maligne sincrone multiple; aumenta il rischio di malignità contestuale a tutta la mucosa colica interessata da displasia/cancro, a causa di alterazioni molecolari e genetiche diffuse.

Fattori di rischio che possono concorrere a determinare l'evoluzione in displasia e carcinoma colo-rettale associati a colite infiammatoria cronica idiopatica sono: l'estensione della malattia, la presenza di attività, la severità della stessa, la durata, l'associazione con la colangite sclerosante. Nella malattia di Crohn l'interessamento di un solo segmento del colon non si associa a maggiore incidenza di displasia, rispetto alla popolazione generale.

Secondo le attuali linee guida, americane ed europee, la colonscopia di sorveglianza deve essere effettuata dopo 8-10 anni di malattia, rispettando la periodicità di due anni fino al 20° anno di malattia e, poi, ogni anno, sebbene, di recente, vengano proposti tempi di follow-up variabili in relazione ai riscontri endoscopici precedenti.

La colonscopia di sorveglianza deve essere effettuata in fase di remissione e con biopsie multiple, con utilizzo delle tecnologie endoscopiche appropriate (la magnificazione presenta detection rate migliore rispetto alla luce bianca, soprattutto se in associazione con la cromoendoscopia).

Nei pazienti con colite cronica infiammatoria idiopatica le terapie farmacologiche in uso riducono l'incidenza di displasia.

Una rassegna sistematica ha concluso a favore di un effetto chemio preventivo della mesalazina. In ogni caso, è stata riportata un'associazione protettiva tra uso di mesalazina e cancro associato a colite (colitis associated carcinoma CAC) con un odd ratio di 0.51 per CAC/displasia. Questi dati, in studi successivi, anche recenti, sono rimasti controversi.

L'introduzione dei farmaci biologici nel trattamento dei soggetti con inflammatory bowel disease (IBD) ha modificato la qualità di vita ed anche la storia naturale della malattia. Non è noto quanto i farmaci biologici abbiano migliorato la storia clinica di queste patologie modificando l'incidenza di displasia e cancro colo rettale.

La terapia delle malattie infiammatorie croniche intestinali idiopatiche (IBD), nell'ultimo decennio, ha visto profonde variazioni e, ormai, l'uso dei farmaci biologici è frequente nelle forme moderate-severe, particolarmente se estese. La mesalazina ha indicazione nella terapia delle forme lievi-moderate.

Obiettivi del progetto

Obiettivi di questo studio sono:

Primari:

- Stimare l'incidenza di displasia e CAC nei pazienti con colite infiammatoria cronica idiopatica che afferiscono al nostro centro per la sorveglianza endoscopica
- Stimare l'effetto dei diversi trattamenti sull'incidenza di displasia e CAC
- Costruire un modello prognostico e proporre delle linee guida istituzionali

Secondari:

Istituire un registro dei pazienti con diagnosi di IBD

Lo studio viene condotto su soggetti con diagnosi di colite infiammatoria cronica idiopatica da almeno otto anni, che, negli ultimi 10 anni, siano stati sottoposti a colonscopia presso il nostro istituto (studio pilota retrospettivo) e sui soggetti che, con gli stessi criteri di inclusione, si presentano alla nostra attenzione per effettuare la colonscopia di sorveglianza con campionamento biotico. In tal caso verranno effettuati esami endoscopici con strumentazione Olympus CF190 H e con cromoendoscopia (indaco carminio).

Gli outcomes includono:

- 1) **Displasia e cancro colo rettale nelle coliti infiammatorie croniche idiopatiche: incidenza (riduzione in corso di terapia) nei diversi gruppi in trattamento farmacologico**
- 2) **Neoplasie di altri organi e apparati: incidenza**

L'analisi statistica prevede la descrizione dei dati (variabili continue analizzate con misure di posizione centrale, di dispersione e t-test; variabili discrete, confronto di proporzioni, chi-quadro) e la modellistica dell'effetto dell'esposizione (terapia) sull'insorgenza dell'outcome (displasia e CAC). Verranno usate a questo scopo la regressione di Poisson e modelli di analisi della sopravvivenza parametrici flessibili. L'uso di modelli di analisi della sopravvivenza con parametrici flessibili esplora la funzione basale di rischio, che è molto importante in medicina perché è una misura clinica immediata del decorso di una malattia, ma anche perché è la misura di partenza per la stima di qualsiasi misura di rischio.

Attività svolta

Nella fase retrospettiva dello studio sono stati raggruppati i casi di soggetti con colite infiammatoria cronica idiopatica valutati dal nostro centro con endoscopia e istologia per l'esclusione della displasia dal 2010 al 2015. I dati sono in fase di elaborazione e verifica perché la documentazione cui fare riferimento è di tipo cartaceo e questo porta via molto tempo.

Nella fase prospettica sono stati sottoposti a colonscopia di sorveglianza, con i criteri sopra enunciati, i soggetti con IBD long standing rispondenti ai criteri di inclusione e senza criteri di esclusione.

La colonscopia di sorveglianza viene effettuata con strumentazione Olympus CF190 H in white light e in cromoendoscopia (tradizionale e virtuale).

La colonscopia di sorveglianza, previa adeguata toilette intestinale (se necessario irrigando la mucosa con soluzione di lavaggio e simeticone durante l'esame), viene effettuata in cromoendoscopia con colorante di contrasto indaco carminio diluito in soluzione fisiologica alla concentrazione di 40mg (ossia due ampole di indaco carminio 0.8% 5 ml) in 250 ml di acqua (soluzione allo 0.03%). La soluzione così ottenuta, con pompa di lavaggio, viene distribuito sulla

superficie intestinale per migliorare la detection rate delle lesioni di mucosa. Individuata una lesione, viene effettuata la cromoendoscopia target iniettando, con catetere spray, la soluzione di indaco carminio diluito allo 0.13% (un'ampolla di indaco carminio 0.8% 5ml in 25 ml di acqua). Quindi, se indicato, si rimuove la lesione.

Le biopsie ottenute dai diversi segmenti del colon e da eventuali lesioni vengono inviate all'esame istologico che esclude l'attività di malattia e la displasia.

I soggetti sottoposti a colonscopia di sorveglianza sono suddivisi in gruppi in relazione alla terapia assunta.

I dati vengono raccolti in schede informative individuali dei casi studiati e descritti in un registro ad hoc denominato "colonscopie di sorveglianza per la ricerca di displasia nelle ibd long standing".

Il protocollo è stato registrato in ClinicalTrials.gov PRS.

Risultati conseguiti

Nella fase retrospettiva dello studio sono valutati i casi di soggetti con colite infiammatoria cronica idiopatica valutati dal nostro centro con endoscopia e istologia per l'esclusione della displasia. Come sopra detto i risultati sono in via di definizione.

La fase prospettica è iniziata nel 2016 ed è in atto.

Nel 2016 il nostro centro ha sottoposto a colonscopia di sorveglianza 138 soggetti con colite infiammatoria idiopatica long-standing (più di 8 anni di malattia) in remissione endoscopica e istologica. Tra questi abbiamo valutato 95 rettocoliti ulcerose e 43 coliti di Crohn; 77 maschi e 61 femmine. I casi di displasia lieve sono stati 14 e quelli di displasia severa 3. La displasia lieve è stata riscontrata su biopsie random e la displasia severa su biopsie mirate (tab 1). I soggetti con displasia severa focale lesionale era stati trattati negli anni precedenti con mesalazina e avevano mantenuto la remissione per periodi prolungati, sebbene alternati a lieve attività. Nessuna di essi riportava familiarità per adenoca del colon-retto e/o familiarità oncologica in genere (tab 2).

DATI 2016	Rettocolite ulcerosa	Malattia di Crohn
Colonscopie di sorveglianza	95	43
Sesso	77	61
Età media	53	56
Displasia lieve	13	1
Displasia severa	3	0
Durata di malattia (anni)	21	26
CDAI >150	-	43
Mayo Full 0	95	-
CDEIS <3	-	43
Mayo endoscopic 0	95	-
Remissione istologica	95	43
BBPS ≥ 7	95	43

Tab 1. Dati dell'IRCCS "De Bellis" riferiti ai soggetti con colite idiopatica cronica long-standing valutati nel 2016.

	Displasia lieve	Displasia severa
N° di casi	14	3
Familiarità per CCR	No	No
Familiarità oncologica	No	No
Età media	56	57
Durata di malattia (anni)	26	31
Terapie assunte	Mesalazina (12), Azatioprina (1), Associazioni (1)	Mesalazina (2), Associazioni (1)

Tab 2. Dati dell'IRCCS "De Bellis" riferiti ai soggetti con colite idiopatica cronica long-standing valutati nel 2016.

Nel 2017, in fase prospettica, abbiamo, ad oggi, i dati completi per 28 soggetti con colite infiammatoria idiopatica long-standing. 4 di essi hanno riportato la diagnosi di displasia lieve su biopsie random. Non abbiamo riscontrato casi di displasia severa. I dati raccolti sono relativi, quindi, ad una casistica ancora ristretta per la brevità del periodo di osservazione (tab 3 e 4).

DATI 2016-2017	Rettocolite ulcerosa	Malattia di Crohn
Colonscopie di sorveglianza (n° soggetti valutati)	132	73
Sesso (M/F)	78/54	37/36
Età media (anni)	64	68
Displasia lieve (n° casi)	23	5
Displasia severa (n° casi)	3	1
Durata di malattia (anni)	16	19
CDAI >150	-	43
Mayo Full 0	95	-
CDEIS <3	-	43
Mayo endoscopic 0	95	-
Remissione istologica (%)	95	93
BBPS ≥ 7 (%)	85	83

Tab 3. Dati dell'IRCCS "De Bellis" riferiti ai soggetti con colite idiopatica cronica long-standing valutati nel 2016-17

	Displasia lieve	Displasia severa
N° di casi	28	4
Familiarità per CCR (%)	-	-
Familiarità oncologica	-	-
Età media	56	57
Durata di malattia (anni)	26	21
Terapie assunte	Mesalazina (16), Azatioprina (2), Associazioni (10)	Mesalazina (3), Associazioni (1)

Tab 4. Dati dell'IRCCS "De Bellis" riferiti ai soggetti con colite idiopatica cronica long-standing valutati nel 2016-2017.

Pubblicazioni

Le attività svolte finora hanno consentito piccoli report sottoforma di abstract. Si attende la conclusione della fase prospettica e la completezza dei dati retrospettivi per poter avviare papers. Panarese. ESD of nonpolypoid lesions associated with long standing IBD colitis. 6th Japan-Italy meeting 2018. Roma, 2-3 marzo 2018.

Laboratorio di Immunoistochimica e Biologia Molecolare

Il laboratorio di Immunoistochimica e Biologia Molecolare svolge principalmente attività di supporto alla diagnostica istopatologica e fornisce agli oncologi informazioni fondamentali per la eleggibilità dei pazienti alla terapia target anti EGFR (determinazione stato mutazionale di *RAS* e *BRAF* nel carcinoma coloretale), con temozolomide (determinazione metilazione del gene *MGMT* nel carcinoma del colon e nel glioblastoma), target anti –*HER2* (overespressione e amplificazione di *HER2* nel carcinoma gastrico).

Le maggiori applicazioni diagnostiche dell'immunoistochimica sono nell'ambito della diagnosi differenziale tra neoplasie di diversa istogenesi, nella migliore caratterizzazione di neoplasie appartenenti ad uno stesso gruppo, nella identificazione dell'origine di una metastasi di cui non si conosce il tumore primitivo e nella produzione di dati di utilizzo prognostico e predittivo di risposta terapeutica.

Progetto: *“PD-L1: target della immunoterapia oncologica con gli inibitori dei check-point immunitari. Studio preliminare del carcinoma colo-rettale” (Termine del progetto: 31/12/2018).*

Responsabile: *Dott.ssa Annamaria Valentini*

Partecipanti: *Dott.ssa Caruso M.L. (Anatomia Patologica), Dott. Pirrelli Michele (Anatomia Patologica), Dott.ssa Cariola Filomena (Genetica Medica), Dott. Lotesoriere Claudio (Oncologia), Dott.ssa Cavalcanti Elisabetta (Contrattista), Dott.ssa Di Pinto Federica (Borsista)*

Programmed death- ligand 1 (PD-L1) è una proteina di transmembrana, ligando del recettore di membrana Programmed Death 1 (PD-1). Il PD1 è un recettore immunoinibitorio, il PDL1 è un regolatore negativo della risposta immunitaria. L'interazione tra PD-1 e PD-L1 rappresenta un importante checkpoint immunitario perchè svolge un ruolo chiave nel modulare la severità della risposta immunitaria durante i processi infiammatori, prevenendo, in condizioni fisiologiche, l'insorgenza di patologie autoimmuni. In condizioni fisiologiche il PD-1 e PD-L1 sono presenti sulla superficie di cellule immunocompetenti quali linfociti T, linfociti B , cellule dendritiche e macrofagi, non sulle cellule epiteliali.

Nel microambiente tumorale si verifica invece una up-regolazione del PDL1 , costitutiva o indotta che determina la espressione di PDL1 sulle cellule neoplastiche. Quella costitutiva è la conseguenza di alterazioni genetiche e/o della attivazione di oncogeni , quella indotta è dovuta alla stimolazione che le cellule neoplastiche subiscono da parte dell' IFN prodotto dai linfociti T attivati (TIL)i. Pertanto le cellule neoplastiche, attraverso il legame tra PDL1 e PD1 espresso sui linfociti intratumorali utilizzano lo stesso checkpoint immunitario per eludere la risposta dell'ospite e favorire la crescita tumorale.

E' stato dimostrato che l'utilizzo di inibitori anti PD-1 e anti PD-L1 può revertere il meccanismo di evasione della risposta immunitaria da parte delle cellule neoplastiche, ripristinando l'attività tumore specifica dei linfociti T. per questo motivo il PD-L1 e il PD1 sono considerati interessanti target nella immunoterapia contro i *checkpoint immunitari*. Questo tipo di immunoterapia è già in

uso con successo nei pazienti con melanoma e carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Attualmente, la metodica immunoistochimica rappresenta lo strumento diagnostico per valutare l'espressione di PD-L1 nelle cellule neoplastiche e nei linfociti T al fine di selezionare i pazienti eleggibili alla terapia.

Il recettore PD-L1, già utilizzato come marcatore predittivo di risposta all'immunoterapia con inibitori dei checkpoint immunitari in neoplasie quali il melanoma, il carcinoma polmonare non a piccole cellule e il carcinoma renale, necessita ancora una più approfondita caratterizzazione nel carcinoma coloretale.

Pertanto il progetto aveva lo scopo di valutare l'espressione immunoistochimica di PD-L1 nel carcinoma del colon-retto e nel suo microambiente, correlandola con le caratteristiche istomorfologiche e molecolari dei campioni.

I risultati ottenuti dallo studio sono stati pubblicati sulla rivista Oncotarget. Vol. 9, (No. 9), pp: 8584-8596

Di seguito la sinossi del lavoro.

Lo studio è stato condotto su un totale di 63 campioni di carcinomi coloretali fissati in formalina e inclusi in paraffina, provenienti da 61 pazienti (31 maschi e 30 femmine) sottoposti ad intervento chirurgico tra il 2010 e il 2016 presso il nostro Istituto. Il materiale d'archivio è stato scelto riesaminando le diagnosi istopatologiche dei pazienti ed effettuando una ricerca per istotipo. Sezioni istologiche colorate in ematossilina-eosina di tutti i campioni sono state revisionate dai patologi per confermare la presenza di adeguata quantità di tessuto tumorale e per valutare il grading del tumore, il coinvolgimento dei linfonodi regionali (pN status), il pattern del fronte di avanzamento, il budding tumorale, la presenza di neutrofili (TANs) e dell'infiltrato immunitario (IICs) comprendente linfociti intra e peri tumorali, macrofagi e plasmacellule. Le caratteristiche clinicopatologiche dei 63 carcinomi coloretali sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1: caratteristiche clinicopatologiche dei 63 carcinomi coloretali.

	n (%)
Sex	
Male	31 (50.8)*
Female	30 (49.2)*
Age (M±DS)	58.87±14.84
Tumor site	
Right colon	31 (49.21)
Left colon	32 (50.79)
Histological type	
Adenocarcinoma	52 (82.54)
Medullary	11 (17.46)
Tumor grade	
G1+G2	33 (52.38)
G3	30 (47.62)
Pattern of advancing border	
Pushing	28 (44.44)
Infiltrating	35 (55.56)
Tumor Budding	
Absent	11 (17.46)

Present	52 (82.54)
IICs	
Absent/Mild	19 (30.16)
Moderated/Marked	44 (69.84)
TANs	
Sporadic	19 (30.16)
Massive	44 (69.84)
pN status	
N0	46 (73.02)
N1	17 (26.98)

TANs= Tumor Associated Neutrophils; IICs= Infiltrating Immune Cells.*=One male and one female have 2 tumors

Si è proceduto inizialmente alla valutazione dell'espressione di membrana di PD-L1 con due diversi anticorpi: SP142 e E1L3N. I due anticorpi, diretti entrambi contro il dominio intracitoplasmatico di PD-L1, hanno mostrato pattern immunoistochimici sovrapponibili, ma E1L3N ha mostrato una maggiore sensibilità con minor colorazione di fondo. Pertanto si è scelto l'anticorpo E1L3N per la valutazione dei campioni. Nei campioni è stata valutata l'espressione di membrana di PD-L1 sia nelle cellule neoplastiche (NCs) che nell'infiltrato immunitario intra/peri tumorale (IICs), utilizzando un cut-off >5%. La tipizzazione immunoistochimica delle cellule immuni infiltranti il tumore è stata effettuata mediante l'utilizzo di anticorpi anti-CD3 e anti-CD68 al fine di meglio interpretare la distribuzione topografica e la composizione dell'infiltrato immune PD-L1 positivo.

Parallelamente alla metodica immunoistochimica, si è proceduto all'estrazione del DNA dei campioni mediante QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), ai fini sia della valutazione dello stato mutazionale dei geni KRAS e BRAF e sia dell'instabilità dei microsatelliti (MSI status). Il laboratorio di Genetica dell'Istituto ha provveduto alla determinazione dell'instabilità dei microsatelliti utilizzando i 5 marcatori raccomandati dal National Cancer Institute: BAT25, BAT26, D5S346, D17S250 e D2S123.

Su tutti i campioni è stato valutato lo stato mutazionale dei geni KRAS e BRAF mediante pirosequenziamento (Pyromark Q24, Qiagen, Hilden, Germany). Le sequenze sono state analizzate mediante il software PyroMark Q24.

Il PD-L1 ha mostrato positività sia nelle NCs che nelle IICs.

Le NCs hanno mostrato un pattern di colorazione prevalentemente focale. La positività delle NCs era prevalentemente localizzata all'interfaccia tumore-stroma. Le IICs hanno mostrato un pattern di colorazione prevalentemente di tipo diffuso. Immagini rappresentative dell'espressione di PD-L1 in NCs e IICs sono mostrate in Figura 1 e Figura 2.

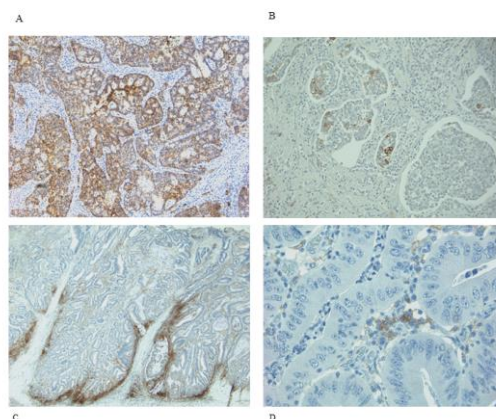


Figure 1

Figura 1. Espressione immunoistochimica di PD-L1 in NCs e IICs. A B: Espressione diffusa e focale nelle NCs; C e D: Espressione diffusa e focale nelle IICs.

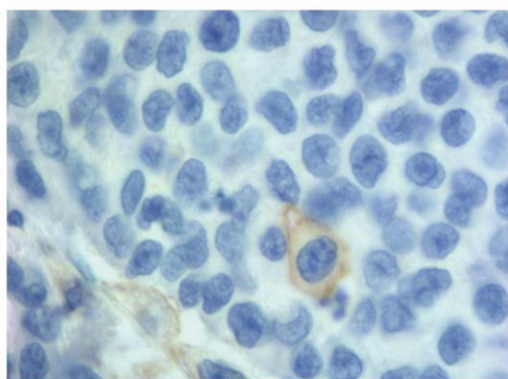


Figure 2

Figura 2: Evidente espressione di membrana di PD-L1 in una singola cellula neoplastica.

L'espressione di PD-L1 nelle cellule neoplastiche è risultata essere significativamente correlata con l'età avanzata ($p=0.04$), localizzazione nel colon destro ($p=0.004$), istotipo midollare ($p<0.001$), grading tumorale G3 ($p<0.001$), sporadici TANs ($p=0.003$), BRAF mutato ($p=0.001$) e MSI status ($p=0.003$) (Tabella 2). Correggendo il modello statistico per sesso ed età, l'espressione di PD-L1 nelle cellule neoplastiche è risultata essere significativamente associata con localizzazione nel colon destro (OR 6.25; 95% CI 1.44-27.17; $p=0.01$), istologia midollare (OR 62.81; 95% CI 6.61-596.77; $p<0.001$), TANs sporadici (OR 6.41; 95% CI 1.70-24.13; $p=0.006$), N1 status (OR 5.33; 95% CI 1.20-23.66; $p=0.03$), BRAF mutato (OR 18.41; 95% CI 2.15-157.93; $p=0.008$) e MSI status (OR 10.79; 95% CI 2.37-49.12; $p=0.002$).

L'espressione di PD-L1 nelle IICs è risultata essere significativamente correlata con localizzazione nel colon destro ($p=0.005$), densità di IICs moderata/marcata ($p<0.001$) e MSI status ($p=0.03$). Correggendo il modello statistico per sesso ed età, l'espressione di PD-L1 nelle IICs è risultata essere significativamente associata con localizzazione nel colon destro (OR 7.94; 95% CI 1.51-41.70; $p=0.01$) e MSI status (OR 5.48; 95% CI 1.06-28.21; $p=0.04$) (Tabella 2).

Tabella 2: Caratteristiche clinicopatologiche e molecolari dei 63 carcinomi coloretali con espressione di PD-L1 in NCs e IICs.

	PD-L1 expression					
	NCs			IICs		
	PD-L1 + n=16 (25%)	PD-L1 - n=47 (75%)	P-Value	PD-L1 + n=49 (78%)	PD-L1 - n=14 (22%)	P-Value
Sex			NS			NS
Male	9 (56.25)	25 (53.19)		25 (51.02)	9 (64.29)	
Female	7 (43.75)	22 (46.81)		24 (48.98)	5 (35.71)	
Age (M±DS)	66.25±16.26	56.36±13.62	0.04	59.90±14.36	55.29±16.48	NS
Tumor site			0.004			0.005
Right colon	13 (81.25)	18 (38.30)		29 (59.18)	2 (14.29)	
Left colon	3 (18.75)	29 (61.70)		20(40.82)	12 (85.71)	
Histological type			<0.001			NS
Adenocarcinoma	6 (37.50)	46 (97.87)		38 (77.55)	14 (100)	
Medullary	10 (62.50)	1 (2.13)		11 (22.45)	0 (0)	
Tumor grade			<0.001			NS
G1+G2	0 (0)	33 (70.21)		23 (46.94)	10 (71.43)	
G3	16 (100)	14 (29.79)		26 (53.06)	4 (28.57)	
Pattern of advancing border			NS			NS
Pushing	7 (43.75)	21 (44.68)		22 (44.90)	6 (42.86)	
Infiltrating	9 (56.25)	26 (55.32)		27 (55.10)	8 (57.14)	
Tumor Budding			NS			NS
Absent	1 (6.25)	10 (21.28)		8 (57.14)	3 (21.43)	
Present	15 (93.75)	37 (78.72)		41 (83.67)	11 (78.57)	
IICs			NS			<0.001
Absent/Mild	3 (18.75)	16 (34.04)		7 (14.28)	12 (85.71)	
Moderated/Marked	13 (81.25)	31 (65.96)		42 (85.72)	2 (14.29)	
TANs			0.003			NS
Sporadic	10 (62.50)	9 (19.15)		14 (28.57)	5 (35.71)	
Massive	6 (37.50)	38 (80.85)		35 (71.43)	9 (64.29)	
pN status			NS			NS
N0	9(56.25)	37 (78.72)		37 (75.51)	9 (64.29)	
N1	7 (43.75)	10(21.28)		12 (24.49)	5 (35.71)	
RAS status			NS			NS
Mutant	5 (31.25)	17 (36.17)		17 (34.69)	5 (37.51)	
Wild-type	11 (68.75)	30 (63.83)		32 (65.31)	9 (64.29)	
BRAF status			0.001			NS
Mutant	7 (43.75)	2 (4.26)		9 (18.37)	0 (0)	
Wild-type	9 (56.25)	45 (95.74)		40 (81.63)	14 (100)	
MSI status			0.003			0.03
MSI	12 (75.00)	14 (29.79)		24 (48.98)	2 (14.29)	
MSS	4 (25.00)	33 (70.21)		25 (51.02)	12 (48.98)	

Abbreviations: NCs= Neoplastic Cells; TANs= Tumor Associated Neutrophils; IICs= Infiltrating Immune Cells. NS= not significant

Tutti i campioni che esprimevano PD-L1 sulle NCs hanno mostrato espressione anche sulle IICs. Non sono stati osservati casi di espressione di PD-L1 esclusivamente nelle NCs. E' stato così possibile raggruppare i campioni in tre gruppi: gruppo A (14 campioni negativi sia in NCs che IICs), gruppo B (33 campioni con positività solo nelle IICs), gruppo C (16 campioni positivi sia in NCs che IICs). Le caratteristiche istologiche e molecolari dei tre gruppi sono evidenziate nella Tabella 3. I tumori del gruppo A, rispetto a quelli del gruppo B, sono risultati essere prevalentemente localizzati nel colon sinistro ($p=0.01$) e associati con assenti/scarse IICs ($p<0.0001$). I tumori del gruppo C, rispetto a quelli del gruppo A, sono risultati essere prevalentemente localizzati nel colon destro ($p<0.0001$) e associati con istologia midollare ($p<0.0001$), grado G3 ($p<0.0001$), densità di IICs moderata/marcata ($p<0.0001$), BRAF mutato ($p=0.001$) e MSI status ($p<0.0001$). I tumori del gruppo B, confrontati con quelli del gruppo C, sono risultati essere prevalentemente localizzati nel colon sinistro ($p=0.02$), e associati con istotipo adenocarcinoma ($p<0.0001$), grado G1/G2 ($p<0.0001$), presenza massiva di TANs ($p=0.0005$), status N0 ($p=0.05$), BRAF wild-type ($p=0.007$) e stabilità dei microsatelliti (MSS) ($p=0.008$)

Tabella 3: Caratteristiche istologiche e molecolari dei tre gruppi A , B, C.

	A NCs-/IICs- n=14 (23%)	B NCs-/IICs+ n=33 (52%)	C NCs+/IICs+ n=16 (25%)	P-Value	Comparison		
					A vs B	C vs A	B vs C
Sex				NS			
Males	9 (64.29)	16 (48.48)	9 (56.25)		NS	NS	NS
Age (M±DS)	55.28±16.47	56.82±12.47	66.25±16.26	NS	NS	NS	NS
Tumor site				0.01			
Right colon	2 (14.29)	16 (48.48)	13 (81.25)		0.01	<0.0001	0.02
Histological type				<0.001			
Medullary	0 (0.00)	1 (3.03)	10 (62.50)		NS	<0.0001	<0.0001
Tumor grade				<0.001			
G3	4 (28.57)	10 (30.30)	16 (100.00)		NS	<0.0001	<0.0001
Pattern of advancing border				NS			
Infiltrating	8 (57.14)	18 (54.55)	9 (56.25)		NS	NS	NS
Tumor Budding				NS			
Present	11 (78.57)	26 (78.79)	15 (93.75)		NS	NS	NS
IICs				<0.001			
Absent/Mild	12 (85.71)	4 (12.12)	3 (18.75)		<0.0001	<0.001	NS
TANs				0.001			
Sporadic	5 (35.71)	4 (12.12)	10 (62.50)		NS	NS	0.0005
pN status				NS			
N1	5 (35.71)	5 (15.15)	7 (43.75)		NS	NS	0.05
RAS status				NS			
Mutant	5 (35.71)	12 (36.36)	5 (31.25)		NS	NS	NS
BRAF status				0.001			
Mutant	0 (0.00)	2 (6.06)	7 (43.75)		NS	0.001	0.007
MSI status				0.003			
MSI	2 (14.29)	12 (36.36)	12 (75.00)		NS	0.0001	0.008

Abbreviations: NCs= Neoplastic Cells; TANs= Tumor Associated Neutrophils; IICs= Infiltrating Immune Cells. NS= not significant

Lo studio quindi ha mostrato che i tumori del gruppo A (caratterizzati da assenti/scarse IICs, presenza massiva di TANs e stabilità dei microsatelliti) sono caratterizzati da una scarsa capacità immunogenica, una scarsa risposta immunitaria, ma da una massiva presenza di granulociti, giustificando l'assenza di PD-L1 come checkpoint immunitario. I tumori del gruppo B (caratterizzati da moderata/marcata densità di IICs, presenza massiva di TANs e prevalente status MSS) sono probabilmente dei carcinomi coloretali più immunogenici, con una forte risposta immunitaria mediata dalle IICs, positive al PD-L1. Al gruppo C appartengono tumori con moderata/marcata densità di IICs, presenza sporadica di TANs e instabilità dei microsatelliti. Questi carcinomi coloretali sono probabilmente caratterizzati da una grande quantità di neoantigeni che hanno stimolato una notevole infiltrazione linfocitaria e una up-regolazione di PD-L1 nelle cellule tumorali per indurre tolleranza immunologica.

Il nostro studio sottolinea l'importanza di valutare l'espressione di PD-L1 nel microambiente del tumore, il tipo e la densità delle cellule immunitarie infiltranti, per meglio stratificare i carcinomi coloretali con differenti profili immunologici. Tutto questo si potrebbe riflettere in una diversa risposta all'immunoterapia da parte dei pazienti dei tre gruppi. Si può ipotizzare che i pazienti del gruppo C, a differenza di quelli del gruppo A, potrebbero essere i candidati ideali all'immunoterapia con inibitori dei checkpoint, mentre il gruppo B meriterebbe ulteriore approfondimento.

U.O. Diagnostica per Immagini

In relazione alle finalità dell'IRCCS, specializzato in Gastroenterologia, la Struttura Operativa Complessa (S.O.C.) di diagnostica per immagini e radiologia interventistica effettua prestazioni radiologiche atte alla diagnosi di patologie addominali gastro-intestinali ed epato-bilio-pancreatiche e alla stadiazione e successivi controlli di malattie oncologiche, specie di pertinenza dei distretti su citati.

Sono in dotazione macchine ultramoderne di Radiologia tradizionale, Ecografia Internistica, Tomografia computerizzata, Risonanza magnetica, Angiografia.

Progetto: “Studio di correlazione tra imaging e biomarcatori nel trattamento di HCC stadio intermedio mediante deb-tace”(Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile del progetto: dott. Fabio Fucilli

Partecipanti: Dr. M. Correale (Patologia Clinica)

Alla data odierna risulta concluso l'arruolamento e la raccolta sistematica dei campioni ematici pre e post-trattamento di chemio-embolizzazione selettiva, già iniziato con dati preliminari a partire dal gennaio 2015, e che attualmente comprende un campione di 40 pazienti circa.

Lo studio ha incrociato i dati sierologici ottenuti con la valutazione radiologica della risposta al trattamento secondo i criteri RECIST modificati.

I dati preliminari raccolti nel 2015 sono stati utilizzati per un primo studio pubblicato su Ligand Assay 2015, volume 20 n3 del settembre 2015 **“RUOLO DI ALFA FETO PROTEINA, PIVKA " E SPETTROMETRIA DI MASSA IN PAZIENTI CON HCC TRATTATI CON DEB-TACE” ***

Dal lavoro pubblicato risulta che il residuo di malattia neoplastica, valutato secondo i criteri RECIST, con controllo imaging di II livello, effettuato in media 45 giorni dopo il trattamento ha

evidenziato 4 risposte complete (CR) (Media AFP: 8,8 ng/mL; PIVKA II: 34,5 mAU/mL), 6 risposte parziali (PR) (Media AFP: 6,4 ng/mL; PIVKA II: 240 mAU/mL), 1 progressione (PD) (AFP: 22 ng/mL; PIVKA II: 660 mAU/mL).

Si è evidenziata una correlazione del 75% dei casi tra il riscontro radiografico e le modificazioni di PIVKA II nei pazienti con risposta completa mentre la stessa correlazione era del 50% per le modificazioni dell'AFP.

*V.M. Garrisi¹, I. Abbate¹, A. Daniele¹, A.M. Mastrosimini, P. Iacovazzi¹, C.M. Leone¹, R. Licinio¹, M. Correale¹, F. Fucilli³ *1UO.D. Patologia Clinica e Sperimentale -IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari 2U.O. C. Patologia Clinica e Laboratori - IRCCS "S. De Bellis" - Castellana Grotte 3UO.C. Diagnostica per immagini e Radiologia interventistica -IRCCS "S. De Bellis" - Castellana Grotte*

I dati sierologici e di proteomica sono stati correlati, come da disegno dello studio, con i dati di risposta alla terapia mediante la valutazione dell'imaging preliminare e di controllo secondo i criteri RECIST con la stesura di un manoscritto originale, da cui si rileva come i livelli di Citocheratina 19 siano correlati strettamente con la risposta al trattamento secondo un rapporto inverso e che gli studi di proteomica possano contribuire fortemente nella sorveglianza dei pazienti trattati, sebbene a discapito di alti costi di esercizio nella pratica clinica, lasciando a ulteriori approfondimenti in campo di screening e di follow up come la biopsia liquida.

PROTEOMICS CHANGING IN HCC TACE TREATED PATIENTS SERUM: A PILOT STUDY

Vito Michele Garrisi^{†1}, Simona De Summa¹, Giusi Graziano¹, Silke Kroll¹, Letizia Pesole², Mario Correale², Ines Abbate¹, Fabio Fucilli²

¹National Cancer Research Center "Istituto Tumori Giovanni Paolo II" – Viale Orazio Flacco 65, 70124 – Bari, Italy

²IRCCS S. De Bellis – Via Turi 27, 70013 – Castellana Grotte, Italy.

I dati conclusivi del campione saranno andranno a completare il lavoro summenzionato (basato su un campione limitato ai primi 20 pazienti) cercando di confutare alcuni dati inattesi e che sono stati messi in relazione dagli autori alla esiguità del campione.

Progetto: *“Uno studio preclinico per la valutazione della farmaco-resistenza al nab-paclitaxel nei tumori pancreatici”.*

Responsabile: *Dott. Ivan Lolli, Dirigente Medico*

Partecipanti: *Dott.ssa Angela Tafaro (Contrattista biologa).*

Introduzione

L'adenocarcinoma duttale pancreatico, *PDAC*, rappresenta più dell'80% di tutti i tumori del pancreas. *PDAC* è la quarta causa più comune della morte globale correlata al cancro. Con un tasso di sopravvivenza di 5 anni inferiore al 5% e una sopravvivenza media di 6 mesi dopo la diagnosi, *PDAC* ha la prognosi più scarsa di tutti i tumori solidi. Questa elevata mortalità è dovuta all'assenza di sintomi in fase iniziale senza alcuna prova di screening di routine per *PDAC*. Inoltre, non esiste

un trattamento specifico per il PDAC, perché l'intervento chirurgico associato o no con chemio e radioterapia aumenta solo la sopravvivenza di 5 anni al 20%. La maggioranza dei pazienti ha già una disseminazione di metastasi associata a una prognosi estremamente scarsa. Pertanto, vi è una urgente necessità di trovare nuovi obiettivi contro la formazione e la diffusione delle metastasi PDAC.

Purtroppo questi intervento chirurgico, molto impegnativi, sono associate a una mortalità che può arrivare al 10% e comunque non sono sempre possibili, dato che la malattia si diffonde con rapidità. Recentemente, il regime farmacologico, nab-paclitaxel (nab-P) + Gemcitabina (Gem), è correntemente in uso presso l'unità operativa di Oncologia quale chemioterapia di prima linea per il trattamento di prima linea per l'PDAC che ha dimostrato una sopravvivenza significativamente più lunga rispetto alla sola Gem. Lo studio di fase 3 MPACT (ClinicalTrials.gov NCT00844649) ha dimostrato un'efficacia superiore di nab-P + Gem rispetto alla sola gemcitabina per tutti gli endpoint in studio, tra cui l'endpoint primario, la sopravvivenza complessiva (OS, mediana, 8.7 vs 6.6 mesi; hazard ratio [HR], 0.72; $P < 0.001$) nei pazienti con carcinoma pancreatico metastatico e Karnofsky performance status ≥ 70 . Dopo l'intervento può essere necessario eseguire una chemioterapia, che rappresenta anche l'unica arma a disposizione, insieme alla radioterapia, per i tumori che non sono operabili.

Obiettivi

Data la gravità di questa patologia, la ricerca presso il nostro ENTE sta attivamente cercando una soluzione. I filoni più promettenti riguardano l'identificazione di proteine specifiche espresse dal tumore, che potranno diventare bersaglio di terapie mirate. In questo senso vanno sia la recente identificazione di nuove proteina, sia la scoperta di microRNA come "firma genetica" della malattia.

Attività

Si stanno selezionando biopsie umane per poter nei prossimi anni fare questa indagine su pezzi di biopsie umane.

Ma per selezionare un pannel di biomarcatori predittivi sarà necessario proceder prima con un indagine ad ampio spettro dei vari marker. Infatti, sebbene siano stati proposti molti biomarcatori, nessuno è stato adottato nell'uso clinico di routine. **In questo studio vorremmo evidenziare la comprensione della biologia del cancro al pancreas che possa portare a miglioramenti nel rilevamento e nell'implementazione di biomarcatori predittivi** (predire la risposta al trattamento).

Il nostro studio preclinico ci permetterà di dare un ruolo reale ai diversi miR espressi dopo terapia con nP+G e di valutare la variazione di espressione dell'ANK1 nei tessuti tumorali pancreatici che potrebbero essere utilizzati per una diagnosi precoce di PADC e per una predittiva risposta alla terapia e superare la resistenza farmaco-indotta.

Purtroppo a tutt'oggi non abbiamo dati a disposizione sugli studi preclinici avendo seguito l'iter burocratico per l'autorizzazione dei modelli animali, **siamo in attesa dell'autorizzazione ministeriale.**

Nel nostro progetto analizzeremo adenocarcinomi pancreatici in tumori xenotrapiantati per studiare la progressione tumorale dopo somministrazione del farmaco gemcitabine (G) più nab-paclitaxel (nP).

Obiettivo specifico 1 sarà:

Individuare nei tumori xenotrapiantati nuovi target significativi in risposta alla terapia con i farmaci nP+Gem. Particolare attenzione sarà rivolta allo studio dei microRNA, i miRNAs, che sono coinvolti nella differenziazione e nella crescita delle cellule, della mobilità e/o dell'apoptosi (morte programmata delle cellule); ed allo studio delle metalloproteinasi.

Le metalloproteinasi della matrice non sono coinvolte soltanto nella degradazione della matrice, ma giocano anche altri ruoli nella regolazione del comportamento cellulare, e nella modulazione di molte molecole bioattive sulla superficie cellulare; possono agire in concerto con altri enzimi per influenzare il comportamento delle cellule.

Complessivamente sono in grado non solo di degradare tutti i tipi delle proteine della matrice, ma anche di processare un gran numero di molecole bioattive.

Inoltre sono coinvolte: Frammentazione di recettori sulla superficie cellulare-Rilascio di ligandi che inducono l'apoptosi (ad esempio il FAS ligand)- Attivazione o inattivazione di chemochine/citochine.

Una migliore comprensione dei cambiamenti molecolari che mediano le proprietà invasive e metastatiche del cancro pancreatico è necessaria al fine di sviluppare terapie più efficaci per il trattamento di questa malattia mortale.

Gli animali da laboratorio sono stati intensamente utilizzati in tutti i campi della ricerca biomedica.

In campo oncologico, lo sviluppo di modelli che mimano la patologia umana è di importanza fondamentale per caratterizzare *in vivo*, l'efficacia e gli effetti collaterali di nuovi composti, dopo che la loro efficacia sia stata dimostrata *in vitro*. Uno dei modelli più comuni utilizzati in studi di oncologia è il modello xenograft. Nel modello di trapianto eterologo nei topi nudi, diverse linee cellulari neoplastiche di origine umana verranno impiantate sottocute, e l'inibizione della loro crescita a seguito del trattamento può essere direttamente monitorata. I modelli di trapianto eterologo sono stati i modelli maggiormente utilizzati negli ultimi vent'anni nel campo della ricerca oncologica, sono economici, di facile induzione e riproducibilità in diversi laboratori, e permettono una facile e veloce misurazione dei parametri di efficacia in seguito a trattamento.

Nel nostro progetto analizzeremo adenocarcinomi pancreatici in tumori xenotrapiantati per studiare la progressione tumorale dopo somministrazione del farmaco nab-paclitaxel+Gem. Analizzeremo la trascrizione di ANK1 e la sua espressione genica, l'espressione dei miR, del p38alpha e l'espressione dei marker CD133/CD44. Se la loro espressione nel tessuto tumorale varierà, sarà correlata alla somministrazione di nab-paclitaxel+Gem, e potremmo individuare nuovi marker per studiare la farmaco resistenza nei soggetti malati.

Un ruolo chiave e regolatore nello sviluppo, nella differenziazione e nell'apoptosi delle cellule normali, così come nella determinazione verso un fenotipo finale di tipo tumorali e che interviene nei processi di carcinogenesi e metastatici, è quello dei *microRNA* (miR). Diversi studi hanno documentato che selezionati miR influenzano la resistenza ai chemioterapici. Quindi i miR possono rappresentare nuovi biomarkers di diagnosi e prognosi/predittiva e targets terapeutici. In particolare questo studio sarà fondamentale per analizzare l'espressione dei miR nel tessuto pancreatico dopo terapia farmacologica. Ed oltre i miR suggeriti da dati pubblicati e correlati con il tumore al pancreas analizzeremo un pannello più vasto, in quanto mancano dati di letteratura *in vivo* o nell'uomo al riguardo. Nell'ambito dei miR non ci sono dati in letteratura che mostrino un *range* della loro espressione nel tumore al pancreas dopo somministrazione di nP+Gem.

Ad esempio la famiglia dei miR29, è stata ampiamente studiata per il suo ruolo in diverse patologie e la sua aberrante espressione è stata collegata con la tumorigenesi e la progressione del cancro. Il

miR-29a è up-regolato nei tessuti e in linee cellulari tumorali pancreatiche con una correlazione positiva con l'insorgenza delle metastasi, quindi miR-29a si comporta come un oncogene e potrebbe essere utilizzato come biomarkers e come targets per il trattamento farmacologico delle PDAC . Di recente è stato visto che una diminuita espressione di miR-301 nei tessuti tumorali umani di pancreas è correlata con l' inibizione della crescita del tumore, in quanto va ad up-regolare la via del nuclear factor-Kb (NF-KB) nelle PDAC umane ma non si sa se esso diminuisce/aumenta con la combinazione dei due farmaci. Infine in una pubblicazione di quest'anno i risultati di Omura N. dimostrano che il miR486 è localizzato nel codone dell'ANK1, suggerendo una stretta correlazione con la contemporanea espressione di miR-486 ed ANK1 nelle cellule tumorali pancreatiche .

Nel nostro progetto analizzeremo adenocarcinomi pancreatici in tumori xenotrapiantati per studiare non solo la progressione tumorale dopo somministrazione del farmaco nab-paclitaxel+Gem, ma analizzeremo anche la trascrizione di ANK1, l'espressione dei miR , del p38alpha e l'espressione dei marker CD133/CD44 . Se la loro espressione nel tessuto tumorale varierà, sarà correlata alla somministrazione di nab-paclitaxel+Gem, e potremmo individuare nuovi marker per studiare la farmaco resistenza.

UO di Anatomia ed Istologia Patologica

Il Servizio di Anatomia Patologica, diretto dalla Dott.ssa Maria Lucia Caruso, svolge la propria attività di diagnostica istologica e citologica corredata da indagini immunoistochimiche e di biologia molecolare sulle patologie gastrointestinali. Per una più accurata caratterizzazione e valutazione dei fattori biologici prognostici e predittivi, sia delle neoplasie che delle malattie dell'apparato gastroenterico con particolare attenzione alle I.B.D, il Servizio si avvale delle necessarie competenze e delle più moderne apparecchiature.

Le prestazioni comprendono:

- Esami istologici su materiale biotico ed operatorio
- Esami citologici
- Consulenze su preparati citologici e/o istologici
- Analisi mutazionale dei geni K-RAS e B-RAF , N-RAS, MGMT
- Chromogenic in situ hybridization (CISH) - HER-2
- Reazioni immunoistochimiche e colorazioni istochimiche

L' Unità Operativa impiega le tecnologie più aggiornate ed affidabili per efficienza ed efficacia, adotta la migliore organizzazione procedurale interna con il coinvolgimento di tutto il personale, favorisce l'integrazione dell'attività clinica con la ricerca scientifica e il massimo rispetto delle procedure operative. L'attività di ricerca, integrata e trasversale, con collaborazioni nazionali ed internazionali, è prevalentemente svolta nel campo della caratterizzazione molecolare dei tumori solidi, dei tumori rari (NET – GIST) e delle lesioni preneoplastiche del tratto gastroenterico con particolare attenzione ai marcatori di diagnosi molecolare precoce.

Progetto: “Grading e outcome clinico di GEP/NET in relazione al PDL-1 status”.

Responsabile: Dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: Maria Lucia Caruso (Anatomia Patologica), Elisabetta Cavalcanti (Contrattista Biologo), Valentini Anna Maria (Anatomia Patologica), Stasi Elena (UOC Gastroenterologia 2), Dionigi Lorusso (Chirurgia), Ivan Lolli (Oncologia), Cariola Filomena (Genetica Medica), Serino Grazia (Immunopatologia Sperimentale contrattista), Guerra Vito (Centro Trial).

I tumori neuroendocrini (NETs) sono un gruppo eterogeneo di tumori rari, con incidenza annuale di 4-5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti.(1) I tumori neuroendocrini pancreatici (pNETs) rappresentano circa il 25% dei NETs e 1-3% dei tumori pancreatici (2). I NETs prendono origine dalle cellule del sistema neuroendocrino diffuso ma sono generalmente accomunati da alcune somiglianze fenotipiche, tra cui potenziali caratteristiche di secrezione ormonale ed istologiche (synaptophysin e cromogranina A). Tuttavia, i NET non si associano a sintomi evidenti e risultano perciò di difficile diagnosi; crescendo lentamente, possono infatti rimanere silenti per anni ed essere riscontrati quando già metastatici. Sul piano istopatologico, i NET si suddividono in NET ben differenziati e scarsamente differenziati. I NET ben differenziati: hanno una bassa o bassissima attività proliferativa, per cui si associano generalmente a buone prospettive di sopravvivenza a lungo termine. La loro natura meno aggressiva, ma comunque maligna, fa sì che questi tumori possano dare metastasi, anche molto tempo dopo l'identificazione del tumore primitivo; I NET scarsamente differenziati hanno un'alta attività proliferativa ed un più elevato grado di malignità, per cui si associano generalmente ad una maggiore probabilità di evolvere precocemente verso la fase metastatica.

Da un punto di vista clinico, i NET vengono distinti in NET funzionanti, i quali si manifestano con una sindrome da iperproduzione di un determinato peptide (insulinoma, gastrinoma ecc) e NET non-funzionanti (circa il 70% del totale), così definiti in quanto non secernenti peptidi biologicamente attivi. Sul piano anatomico-patologico i GEP NET sono classificati in base all'indice di proliferazione (cioè alla quantità di cellule tumorali in fase di riproduzione) in tre gruppi: $Ki67 \leq 2\%$ e/o indice mitotico < 2 HPF (high power fields) = **G1**, $Ki67 3-20\%$ e/o indice mitotico $2-20$ HPF = **G2** e $Ki67 > 20\%$ e/o indice mitotico > 20 HPF = **G3**. I primi due gruppi, G1 e G2, vengono anche chiamati TUMORI NEUROENDOCRINI (NET), mentre il terzo gruppo, G3, costituisce i CARCINOMI NEUROENDOCRINI (NEC).E' Attesa per il 2017 a pubblicazione di una nuova classificazione che restituisce rango alla differenziazione istologica a fronte del solo indice proliferativo.

Le strategie terapeutiche attualmente disponibili per i NET, considerate sempre all'interno di un approccio integrato e multidisciplinare, possono assicurare al paziente una buona sopravvivenza e qualità di vita. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET, infatti, la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti. L'obiettivo del trattamento è quello di migliorare i sintomi ad essi associati, nonché di controllare la crescita tumorale, al fine di migliorare la sopravvivenza e la qualità di vita dei pazienti. I tumori neuroendocrini sono rari, ma la natura indolente della malattia porta ad una prevalenza molto più alta. Oltre alla lenta evoluzione spontanea di molti NET, infatti, la prognosi dipende anche dalla risposta ai trattamenti, pertanto l'individuazione di markers molecolari utili al monitoraggio delle terapia è fondamentale.

Attualmente l'indirizzo terapeutico è volto sempre di più verso una *targeted therapy mirata e personalizzata*. L'immunoterapia con gli inibitori delle molecole del check-point immune (gli anticorpi anti-PD-1 ed antiPD-L1) sta emergendo come un importante strumento nel trattamento di diversi tumori, con l'ottenimento di un beneficio clinico potenzialmente duraturo nel tempo in una buona parte dei pazienti trattati. In particolare recenti studi hanno evidenziato come il blocco anticorpo-mediato della proteina PD-1 (proteina della morte programmata 1) e del suo ligando (PD-L1) induce la regressione durevole del tumore e la stabilizzazione prolungata della malattia nei pazienti con tumori solidi avanzati(6-7) . Il blocco di questa via con anticorpi anti PD-1 o suoi ligandi ha portato a risposte cliniche notevoli nei pazienti affetti da diversi tipi di cancro, tra cui i

melanomi, carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma a cellule renali, cancro alla vescica, e il linfoma di Hodgkin (8-

9). In letteratura è evidenziato che 9 su 25 pazienti (36%) con tumore e positivi al PDL-1 hanno una risposta obiettiva alla terapia questo trattamento (10).

L'ipotesi più validata è che i pazienti responder hanno una alterazione delle proteine del mismatch-repair (MMR) (11-12). Il Sistema Mismatch Repair è responsabile del mantenimento della stabilità genomica; in seguito alla perdita di funzione del MMR, può accadere che si verifichi una variazione del numero di ripetizioni di un particolare locus nel DNA tumorale rispetto a quello germinale di un individuo. Questo fenomeno prende il nome di instabilità microsatellitare (MSI). L'instabilità dei microsatelliti riveste un ruolo importante nei processi di carcinogenesi, con particolare riferimento agli errori di replicazione, in tumori maligni del colon e benigni con evoluzione verso la malignità (adenomatosi polipoidi del colon o FAP), del sigma e del retto, nei tumori maligni della cute e della mammella (13). Pertanto i tumori instabili sono caratterizzati da un maggior carico mutazionale che si traduce in una sintesi di proteine alterate (mismatch) e di neo-epitopi che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario rendendo quindi queste malattie potenzialmente più sensibili agli inibitori di PD-1 che riattivano e amplificano la risposta immunitaria. I tumori del colon-retto e i tumori gastrici con instabilità dei microsatelliti (MSI) appaiono più responsivi alla immunoterapia rispetto ai tumori con stabilità del microsatellite.(14-15) e

Nei GEP-NET l'instabilità dei microsatelliti (MSI) è stata poco studiata e il ruolo di altri meccanismi epigenetici è ancora poco conosciuto. Anche se GEP-NET sono tumori in genere aggressivi e con prognosi infausta, recenti studi (17) evidenziano che c'è una frazione di pazienti con GEP-NET che mostra un migliore tasso di sopravvivenza atteso. La Rosa et al. hanno evidenziato un'alta instabilità dei microsatelliti (MSI-H) con una perdita di espressione immunoistochimica delle proteine del MLH1 and PMS2 nel 15% dei carcinomi neuroendocrini colon-rettali scarsamente differenziati per i quali è atteso un vantaggio prognostico (18).

Inoltre, le alterazioni molecolari nei NET rimangono non completamente caratterizzate in particolare per quanto riguarda mutazioni in BRAF e KRAS che hanno un ruolo sia nei processi di cancerogenesi che nella comparsa di recidiva nei carcinomi colon rettali (18-19). La maggior parte degli studi suggeriscono che carcinomi neuroendocrini colon rettali scarsamente differenziati sono biologicamente aggressivi ed associati ad una scarsa sopravvivenza. Pertanto nel nostro studio si vuole differenziare i NET in base alla rilevazione di mutazioni in BRAF e KRAS associate ad una mancata espressione delle proteine del MMR ed MSI.

Nei tumori, la combinazione dello studio del profilo di espressione dei miRNA, unitamente al profilo di espressione genica, può aiutare a comprendere la complessità degli eventi molecolari che si verificano nelle cellule neoplastiche (20). A livello di diagnostica molecolare, invece, l'uso delle signatures dei miRNA sembra essere preferibile al tradizionale approccio di studio dell'espressione genica. Il miRNA profiling può aiutare a distinguere tra neoplasie simili e fornire indicazioni riguardo alla tipologia di tumore, alle mutazioni eventualmente ad esso associate e anche alla possibile risposta alla terapia. In particolare l'importanza dei cambiamenti epigenetici in pNET è sottolineata anche da recenti risultati di uno studio cross-specie sul microRNA (miRNA) e profili di RNA messaggero (mRNA) in pNETs. In letteratura è presente un unico lavoro che utilizza miRNA (miR-204-5p, miR-375) per differenziare tumori neuroendocrini dell'intestino tenue (SBNETs) e la localizzazione secondaria degli stessi (21).

Pertanto, non essendoci ancora in letteratura molte evidenze sulla correlazione nei NET tra MSI, espressione PDL-1 e prognosi, in questo studio, sarà analizzata l'incidenza del MSI, espressione

delle proteine del MMR, delle mutazioni KRAS e BRAF e dei miRNA in una ben caratterizzata coorte di GEP-NET al fine di delineare e differenziare le caratteristiche clinico patologiche e molecolari.

Obiettivi specifici dello studio:

Il razionale dello studio si basa sull'ipotesi che tumori instabili sono caratterizzati da un maggior carico mutazionale che si traduce in una sintesi di proteine alterate e di neo-epitopi che possono essere riconosciuti dal sistema immunitario rendendo quindi queste malattie potenzialmente più sensibili agli inibitori di PD-1 che riattivano e amplificano la risposta immunitaria. I tumori del colon-retto e i tumori gastrici con instabilità dei microsatelliti appaiono più responsivi alla immunoterapia rispetto ai tumori con stabilità del microsatellite.

L'**obiettivo** dello studio è di indagare il valore prognostico dell'espressione di PD-L1 in pazienti con NET. Successivamente si andrà a valutare le alterazioni molecolari nei NET in particolare l'instabilità dei microsatelliti (MSI), il tipo di difetto di mismatch repair (MMR) e la sua correlazione con le mutazioni KRAS e BRAF per meglio comprendere il valore di suddetti marcatori molecolari. In ultima analisi tramite un approccio di miRNA profiling, andremo a ricercare la presenza di miRNA differenzialmente espressi tra i NET ben differenziati e scarsamente differenziati. Il miRNA profiling ci può aiutare ad identificare sottogruppi tumorali con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica.

Obiettivo specifico 1:

Valutazione della correlazione tra grado istologico (secondo differenziazione casistica WHO2010 alla luce della nuova WHO2017) ed espressione di PD-L1 nei pazienti con NET ben differenziati e scarsamente differenziati.

Obiettivo specifico 2:

Caratterizzazione dei NET dal punto di vista molecolare: MSI, MMR, BRAF, PDL-1 e miRNA.

Obiettivo specifico 3: Analisi dei profili di espressione miRNA nei NET ben differenziati e scarsamente differenziati.

Stato di avanzamento del progetto

Nel primo anno di progetto è stato raggiunto il primo obiettivo conclusivo con la pubblicazione: [Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading](#). Cavalcanti E, Armentano R, Valentini AM, Chieppa M, Caruso ML. Cell Death Dis. 2017 Aug 24;8(8):e3004.

Nello specifico inizialmente è stata allestita la casistica dei casi NET pervenuti all'IRCCS de Bellis dal gennaio 2006 a dicembre 2016, sono stati arruolati 57 pazienti: 34 M e 23 F e comprendono NET dell'apparato GEP: 17.5% stomaco, 17.5 % fegato, 2 % colecisti, 12 % colon, 17.5 pancreas, 28% piccolo intestino e 2 % ampolla di Vater. Tutti i casi sono stati rivisti e classificati secondo la WHO 2010 e su tutti è stato rivalutato il Ki 67. Di questi pazienti è stato valutato anche l'infiltrato perineurale, la permeazione vascolare, la necrosi e i linfonodi metastatici. (Tab.1)

Successivamente è stata messa a punto la metodica immunoistochimica per la valutazione tissutale del PD-L1. Attualmente il test del PD-L1 è controverso principalmente a causa dell'eterogeneità del tumore, della presenza in commercio di diversi tipi di anticorpi anti PD-L1 e dalla mancanza della definizione di un cut-off. Pertanto siamo andati a saggiare due anticorpi anti PD-L1: clone E1L3N, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA, a una diluizione di 1:600 ed il clone SP142, Roche/ Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA a con diluizione 1:100). Il pattern di

colorazione di entrambi gli anticorpi è stato come previsto: membrane cellulari e citoplasmatico con punti occasionali, corrispondenti al PD-1 / Siti di interazione PD-L1. L'anticorpo E1L3N è stato preferito soprattutto per un piu' definito e preciso segnale di membrana.

Abbiamo adottato uno score di tipo qualitativo (intensità dello staining comparata alla placenta usata come controllo) e quantitativo (numero di cellule positive). Abbiamo considerato positivi i campioni con un cut off $\geq 10\%$ e con score pari a 2 o 3.

Abbiamo valutato l'espressione di membrana PD-L1 sulle cellule tumorali e / o sulle cellule immunitarie infiltrate. Espressione del PD-L1 è assente in tutti i casi WD-NENs (G1), mentre è fortemente espresso in tutti i casi G3. L'espressione di PD-L1 è significativamente associata con il grado istopatologico. (Fig.1 ; tab. 2) . Attualmente il Ki67 è un marker prognostico e fa parte dei criteri di classificazione WHO 2010 , ma nella diagnosi ed indirizzo della terapia non è un ottimo predittore. Nei NEN G3, il Ki67 abbraccia un range molto ampio (20-100%) che può includere una varietà di neoplasie differenti, con risposte potenzialmente diverse alla terapia. Pertanto noi abbiamo evidenziato che il PD-L1 è un discriminante nei NEN G3 ai fini terapeutici.. Espressione del PD-L1 è significativamente correlate con Ki67 index è c'è un significativo trend positive con Ki67 proliferation index (Fig.2). Successivamente abbiamo valutati espressione di PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore. Abbiamo evidenziato una differente espressione del PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore in base al grado , questo a dimostrazione del fatto che i NEN potrebbero acquisire resistenza alla sorveglianza immunitaria, attraverso l'aumento del PD-L1 e inibendo i linfociti infiltranti peritumorali e intratumorali (Fig.3). La sovraespressione di PDL-1 in NEN (G2-G3) indica che il tumore-correlato PD-L1 può essere legato a un maggior potenziale maligno e contribuire alla progressione tumorale fornendo un meccanismo protettivo contro la sorveglianza immunitaria.

Il passo successivo sarà quello di caratterizzare il microenvironment immunitario e l' analisi dei profili di espressione *miRNA* nei NET ben e scarsamente differenziati. Allo stato attuale siamo in attesa da dicembre dell'anticorpo FOXO1 per il prosieguo del progetto

Tabella 1 . Caratteristiche dei pazienti

	Patients characteristics	Nr	%
Gender	Male	34	60
	Female	23	40
Age, years	Median, range	56,5	
Localizzazione	Stomach	10	17,5
	Liver	10	17,5
	Gall Bladder	1	2
	Colon	7	12
	Pancreas	10	17,5
	small intestine	16	28
	ampulla of vater	1	2
	skin	2	3,5
Grade WHO classification	G1	39	68

	G2	9	16
	G3	9	16
Lymph nodes Metastasis	Yes	2	3,5
Perineural infiltration	Yes	47	81
Vascular permeation	Yes	3	5,2
Necrosis	Yes	9	15,5

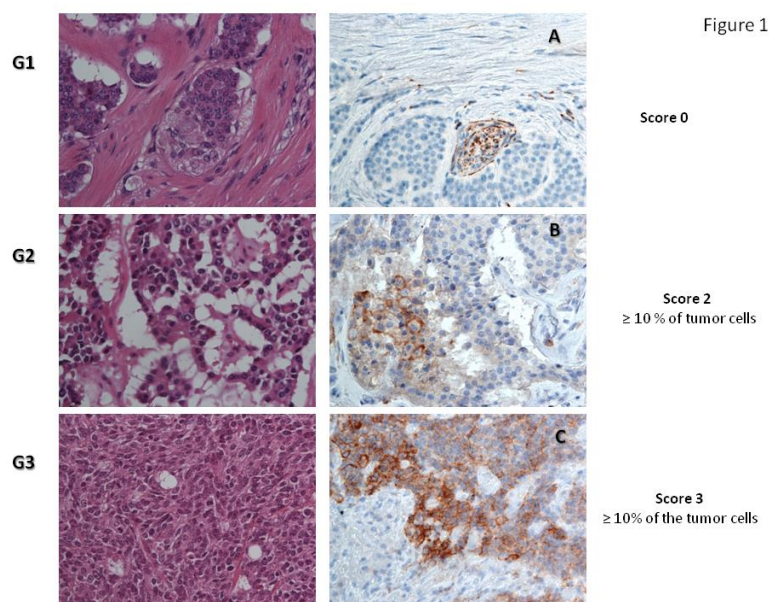


Figura 1. Patterns rappresentativo dell'espressione del PD-L1 e del grading (a) G1, IHC negativa; (b) G2, media espressione ; (c) G3, forte espressione (magnification × 40)

Tabella 2. PD-L1 expression on different grade of NEN and infiltrating immune cells

	PD-L1 expression			P value
	Positive n (%)	Negative n (%)	Total n (%)	
A) Gender				
Male	9 (28)	23 (72)	32	0,345
Female	10 (40)	15 (60)	25	
B) Histological grade (WHO 2010)				
Grade 1	0	39 (100)	39	0,0001
Grade2	7 (78)	2 (22)	9	
Grade3	9 (100)	0	9	
C) Infiltrating immune cells intra /peri tumoral				
Grade 1	10 (25,6)	29 (74,4)	39	0,0001
Grade2	7 (77,8)	2 (22,2)	9	
Grade3	9 (100)	0	9	

Figure 4

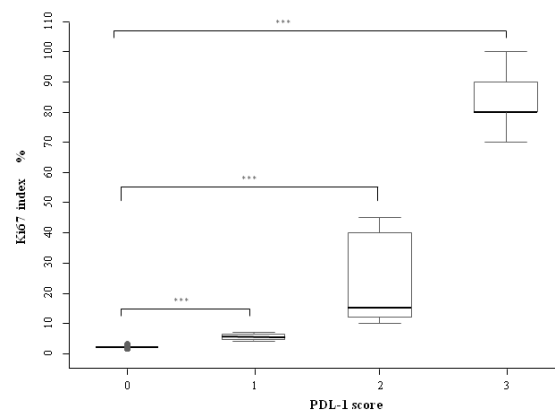


Figure 2 Correlation between the PDL-1 score and Ki67 index in NENs patients ($\rho=0.959$, $p < 0.001$): Box plots of PD-L1 score and Ki67 index (expression %) *= $p < 0.001$**

Figure 3

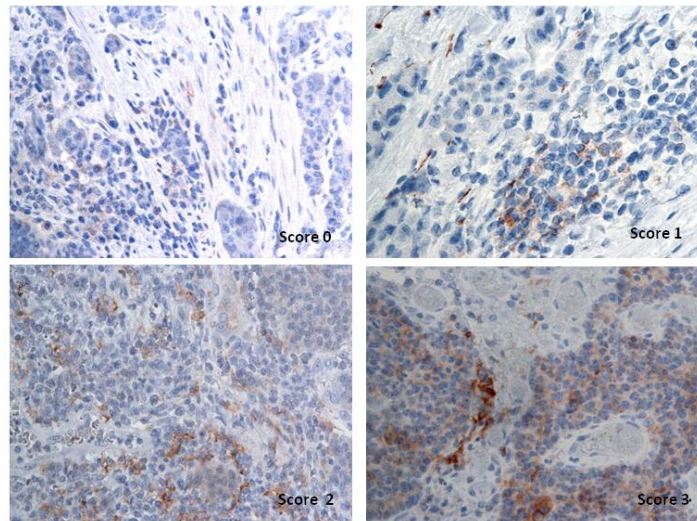


Figure 3. Representative PD-L1 staining intensity in peri and intra-tumoral immune-infiltrating cells: A) no staining (0), B) weakly positive staining (1+), C) moderately positive staining (2+), D) strongly positive staining (3+)

Progetto: *“L’attività di SMYD3 come bersaglio terapeutico nel trattamento delle neoplasie gastroenterologiche con alterazione dei pathways RAS e TGF- β ”.*

Responsabile: *Cristiano Simone, Dirigente Biologo*

Partecipanti: *Francesco Dituri (Contrattista biologo), Giovanna Forte (Borsista), Candida Fasano (Borsista), Vittoria Disciglio (Contrattista biologa)*

Introduzione

La proteina SMYD3 è un’istone di- e tri-metiltransferasi, appartenente alla famiglia delle “SET domain proteins” (Foreman et al., 2011). La funzione biologica più nota di questo enzima è la metilazione della lisina 4 dell’istone H3. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che il substrato preferenziale di SMYD3 l’istone H4 (Van Aller et al., 2012).

Nelle cellule normali, l’attività metiltransferasica di SMYD3 non sembra essere indispensabile per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, al contrario la sua overespressione è sufficiente ad accelerare la crescita cellulare e ad attivare l’espressione di geni coinvolti nelle pathways di trasformazione e migrazione delle cellule tumorali (Cock-Rada et al., 2012; Luo et al., 2014).

Il ruolo oncogenetico di SMYD3 è suggerito dall’overespressione di questa metiltransferasi in diversi tipi di tumore, quali il carcinoma della mammella (Ren et al., 2011), dello stomaco (Wang et al., 2017), del pancreas (Paladino et al., 2016), del polmone (O’Byrne et al., 2011), del colon-retto (CRC) (Sarris et al., 2016) e del carcinoma epatocellulare (HCC) (Fei et al., 2017). Sebbene, in passato tale ruolo veniva spiegato esclusivamente sulla base della metilazione di proteine istoniche e del consecutivo aumento dell’attivazione trascrizionale di geni bersaglio a valle come WNT10B, NKX2.8, CDK2, cMET e TERT (Hamamoto et al., 2004, 2006; Liu et al., 2007; Zou et al., 2009), recenti dati sperimentali hanno spostato il focus di studio sulla correlazione tra cancerogenesi e metilazione di proteine non istoniche. Infatti dati di letteratura riportano che SMYD3 è in grado di metilare direttamente i recettori VEGFR1 (Recettore 1 del fattore di crescita vascolare endoteliale), potenziandone l’attività chinasi in maniera tessuto-specifica, ed ER (recettore degli estrogeni), entrambi coinvolti nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza delle cellule tumorali (Biggar and Li 2014; Kunizaki et al., 2007; Kim et al., 2009).

La centralità di SMYD3 nella regolazione delle pathways proliferative sembra ancora più marcata nel cancro del colon retto (CRC) e nell'epatocarcinoma (HCC). Infatti studi condotti su topi SMYD3 KO, in cui sono stati indotti tumori del colon e del fegato, mostrano una significativa regressione tumorale se paragonati ai rispettivi topi wt, nei quali SMYD3 essendo overespressa potenzia la trascrizione di diversi oncogeni (Sarris et al. 2016).

In letteratura, inoltre, è stato riportato che il silenziamento di SMYD3 limita considerevolmente la proliferazione cellulare nel CRC, nell'HCC, nel fibrosarcoma e nel carcinoma della mammella (Hamamoto et al., 2004, 2006; Cock-rada et al., 2012; Guil et al., 2012).

Nonostante la stretta correlazione esistente tra la deregolazione di SMYD3 e la tumorigenesi, non sono stati ancora completamente chiariti i meccanismi alla base della modulazione cancro-specifica mediata da SMYD3 e la funzione attivatoria di questa metiltransferasi sulla proliferazione tumorale. Queste osservazioni preliminari suggeriscono che SMYD3 sia coinvolta nella deregolazione del ciclo cellulare, ovvero in una delle fasi più critiche della carcinogenesi.

A supporto di tali osservazioni, vi è una vasta letteratura che conferma la stretta correlazione tra l'overespressione di SMYD3 e la cancerogenesi in diversi organi (Ren et al., 2011; Wang et al., 2017; Paladino et al. 2016; O'Byrne et al., 2011; Sarris et al., 2016; Fei et al., 2017). Nel CRC mutazioni dell'oncogene KRAS sono correlate all'overespressione di SMYD3, così come nello sviluppo del cancro polmonare e pancreatico in cui le metilazioni di MAP3K2, mediate da SMYD3 attivano la cascata delle MAP chinasi (Gaedcke et al., 2010; Mazur et al., 2014). L'espressione di SMYD3 correla positivamente ed in maniera significativa, con l'espressione di TGF- β in tessuti di pazienti con tumori gastrici (Liu et al., 2015).

Recentemente, in uno studio collaborativo, abbiamo dimostrato come SMYD3 sia richiesto anche per la propagazione del signaling PI3K-AKT, favorendo la fosfo-attivazione di AKT, mediante la metilazione di un residuo specifico (Yoshioka Y, et al., 2016). Alla luce dei nostri studi preliminari e di dati riportati in letteratura con questo progetto ci siamo proposti di indagare il ruolo cancro-specifico dell'interazione tra SMYD3 e proteine non istoniche come MEK1 e TGF- β rispettivamente deregolate nel cancro del colon retto (MEK1), nell'epatocarcinoma e nel colangiocarcinoma (TGF- β).

Le attività progettuali del presente studio saranno svolte da due unità di ricerca del nostro Istituto:

- 1) l'unità di Genetica Medica (UNITÀ 1) caratterizzerà il ruolo dell'interazione tra SMYD3 e proteine non istoniche, come MEK1, in linee di cancro del colon;
- 2) l'unità di Medicina Personalizzata (UNITÀ 2) studierà l'interazione tra SMYD3 e TGF- β in linee cellulari di epatocarcinoma e colangiocarcinoma.

1) **UNITÀ 1: GENETICA MEDICA (RESPONSABILE: PROF. SIMONE CRISTIANO)**

OBIETTIVO UNITÀ 1

Lo scopo di questa fase progettuale è stato quello di analizzare il ruolo di SMYD3 nella deregolazione del pathway EGF/RAS/RAF/MEK/ERK che rappresenta la via fondamentale di progressione del cancro del colon retto.

ATTIVITÀ UNITÀ 1

Come previsto dal cronoprogramma abbiamo *in primis* preparato costrutti per studi *in vitro* ed *in cellulo* (Fase1A). In seguito abbiamo voluto verificare e caratterizzare l'interazione SMYD3–

MEK1 attraverso esperimenti di co-immunoprecipitazione di proteine overesprese *in cellulo* (Fase1A). Successivamente abbiamo effettuato analisi predittive *in silico* atte ad identificare gli eventuali residui lisinici di MEK1 che rappresentino i potenziali siti target di metilazione mediata da SMYD3 (Fase1B). Infine abbiamo valutato *in vitro* la capacità di SMYD3 di metilare MEK1 (Fase1B).

RISULTATI CONSEGUITI UNITÀ 1

Fase 1A: Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1.

-Clonaggio e mutagenesi di costrutti di SMYD3:

I costrutti ad espressione in cellule di mammifero *p3xFlagCMV14-SMYD3 wt* e *pFlagCMV2-SMYD3 wt* sono stati ottenuti partendo dal plasmide *pMD18-SMYD3* (Sino Biological #HG11217-M) e dai rispettivi empty backbones, disponibili nel nostro laboratorio, tramite amplificazione della CDS di SMYD3 con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione.

A partire dal plasmide *pFlagCMV2-SMYD3 wt*, tramite esperimenti di mutagenesi sito specifica (Q5 Site Directed Mutagenesis kit - New England Biolabs), attraverso l'utilizzo di specifici primers fosforilati, sono stati ottenuti i plasmidi *pFlagCMV2-SMYD3 (Y239F)*, che rappresenta la forma cataliticamente inattiva di SMYD3 e il plasmide *pFlagCMV2-SMYD3 (219-428)*, deleto nella regione N-terminale e mancante del SET-domain.

Sempre partendo dal plasmide *pMD18-SMYD3* e dall'empty backbone *pGEX4T3* ad espressione batterica, tramite amplificazione dell'inserto con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione, abbiamo ottenuto il plasmide *pGEX4T3-SMYD3 wt*, utile per saggi di metilazione e/o co-immunoprecipitazione *in vitro*, previa espressione e purificazione della proteina ricombinante dal cellule batteriche.

-Clonaggio e mutagenesi di costrutti di MEK1:

A partire dal plasmide *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1* (Addgene, #40774) e dall'empty backbone *pGEX4T3*, tramite amplificazione della CDS di MEK1 con primers specifici, restrizione enzimatica e ligazione, è stato ottenuto il costrutto ad espressione batterica *pGEX4T3-MEK1 wt*, utile per i successivi saggi di metilazione e/o co-immunoprecipitazione *in vitro*.

A partire dal plasmide *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1* e su indicazione dell'analisi di predizione di siti metilabili (vd. Paragrafi successivi), tramite esperimenti di mutagenesi sito specifica, sono stati ottenuti due mutanti della proteina MEK1 (K168A e K269A) in cui le lisine citate sono sostituite da residui di alanina non metilabili.

Con lo scopo di caratterizzare meglio le possibili regioni della proteina MEK1 in grado di interagire con SMYD3, sono stati inoltre ottenuti dei costrutti parziali del gene MEK1 (regione N-terminale/localization domain, kinase domain e Prolin-rich domain), sia in vettori ad espressione *mammalian* che in vettori ad espressione batterica.

Tutti i plasmidi ottenuti nel nostro laboratorio tramite cloning per restrizione o mediante esperimenti di mutagenesi sito specifica, sono stati verificati tramite digestione enzimatica e/o sequenziamento con metodo Sanger.

-Verifica dell'interazione di SMYD3-MEK1 tramite esperimenti di overespressione

L'interazione fra le proteine SMYD3 e MEK1, già dimostrata su proteine endogene tramite esperimenti di co-immunoprecipitazione in cellule tumorali del colon HT29, è stata verificata anche mediante esperimenti di overespressione delle due proteine wt, seguita da co-immunoprecipitazione, per fugare il dubbio che la positività all'interazione riscontrata nel saggio su proteine endogene potesse derivare da interazioni aspecifiche degli anticorpi.

In breve, le linee cellulari HCT116, HT29 ed HEK293, sono state transfettate con i costrutti *p3xFlagCMV14-SMYD3 wt* e *pcDNA3.1-Hygro-Myc-MEK1 wt* per ottenere una loro espressione ectopica. L'analisi di co-immunoprecipitazione (CoIP) è stata effettuata utilizzando anticorpi Tag-specifici sia per la fase preparativa che per la fase analitica di immunoblotting.

In particolare, sull'immunoprecipitato ottenuto da IP-Flag (SMYD3), sono stati utilizzati gli anticorpi anti-Myc per rilevare la forma overespressa di MEK1 e anti-FLAG per evidenziare la quantità immunoprecipitata della forma overespressa di SMYD3. I nostri risultati, ottenuti da esperimenti ripetuti almeno tre volte, dimostrano che le proteine overesprese dai due costrutti cotrasfettati interagiscono in tre linee diverse, due di cancro del colon-retto (HT29, HCT116) ed una linea di cellule normali embrionali di rene (HEK293). (Figura 1)

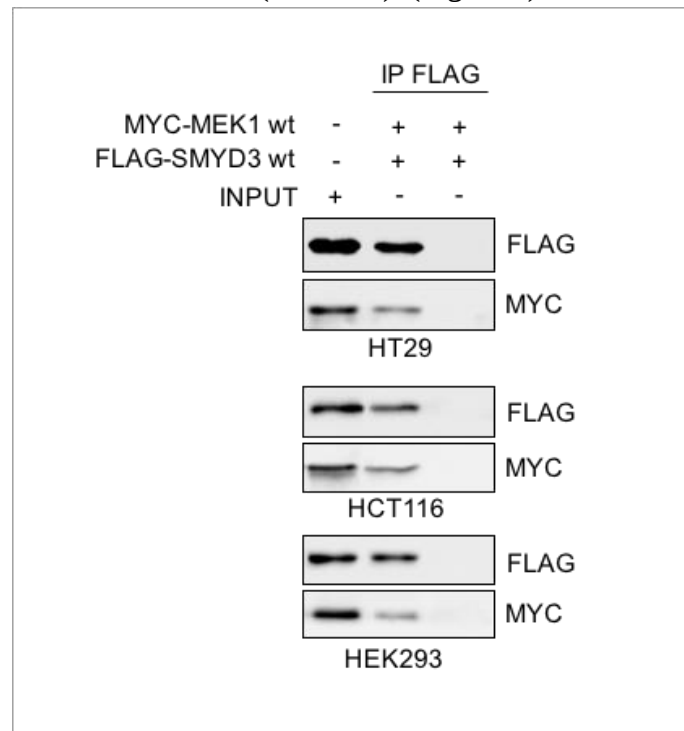


Figura 1: Co-immunoprecipitazione di FLAG-SMYD3 wt e MYC-MEK1 wt in cellule HT29, HCT116 ed HEK293.

Fase1B. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1.

-Predizione *in silico* di siti metilabili

Abbiamo effettuato un'analisi di predizione *in silico* volta ad identificare i residui di lisina sulla sequenza di MEK1 potenzialmente metilabili da parte di SMYD3.

La suddetta analisi *in silico* è stata condotta utilizzando tre diversi *software* in modo da aumentare l'accuratezza predittiva dell'analisi e da selezionare i residui lisinici di MEK1 potenzialmente metilabili suggeriti da almeno due differenti tools bioinformatici.

Per questa analisi sono stati impiegati i seguenti tools bioinformatici: PLMLA tool (bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PLMLA.aspx); PMes (bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PMeS.aspx) e IMethyl-PseAAC (<https://omictools.com/imethyl-pseaac-tool>). Due tools su tre di quelli impiegati suggeriscono due potenziali siti target di metilazione per MEK1, quali la K168 e la K269 (Tabella 1).

Residui AA predetti	PLMLA tool	PMes tool	I Methyl -PseAAC
K3			X
K4			X
K5			X
K48			X
K57	X		
K64			X
K84			X
K88			X
K156			X
K168		X	X
K205	X		
K269	X		X
K289			
K324	X		
K344	X		
K362			X

Tabella 1. Predizione *in silico* delle lisine metilabili in MEK1.

-Valutazione della metilazione di SMYD3 su MEK1.

Al fine di valutare l'abilità di SMYD3 nel metilare MEK1 abbiamo eseguito un saggio di metilazione *in vitro* impiegando come substrati della reazione enzimatica le proteine purificate MEK1 e/o la proteina istonica H4. In breve, la proteina ricombinante His-SMYD3 wt (full-length) enzimaticamente attiva, è stata incubata con la proteina ricombinante GST-MEK1 wt (full-length) in presenza del reattivo marcato radioattivamente, SAM-³H (fornito dal kit di dosaggio della metilazione *in vitro*; Perkin Elmer) per 45 minuti a 30° C in una soluzione composta da 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 % glicerolo, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.02% Triton e 1 mM PMSF (Peserico et al. 2015).

In parallelo sono state analogamente preparate altre due reazioni enzimatiche *in vitro* come controlli della metilazione in esame. In particolare come controllo positivo della reazione di metilazione abbiamo utilizzato la proteina H4 (noto substrato di SMYD3); mentre come controllo negativo abbiamo utilizzato la proteina Glutathione-S-Transferasi (GST).

Terminato il tempo di incubazione, le miscele di reazione sono state analizzate tramite SDS-PAGE, e i segnali di metilazione sono stati rilevati tramite colorazione con coomassie e autoradiografia. I nostri dati mostrano che la forma purificata His-SMYD3 è in grado di metilare il suo noto substrato histone H4 (controllo positivo), ma non è in grado di metilare la forma purificata GST-MEK1 così come la GST da sola (controllo negativo). Questi esperimenti, eseguiti usando le stesse condizioni riportate da noi e da altri in letteratura (Peserico et al 2015, Mazur et al. 2014), indicano che MEK1

non è un substrato diretto di SMYD3 e quindi escludono che l'attività enzimatica di SMYD3 sia diretta verso MEK1 nella regolazione del pathway RAS/RAF/MEK/ERK.

2) UNITÀ 2: MEDICINA PERSONALIZZATA (Responsabile: Dott. Di Turi Francesco)

OBIETTIVO UNITÀ 2

Fase 2. Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β

In primis il team di ricerca del laboratorio di Medicina Personalizzata ha analizzato in questo primo anno di attività gli effetti del trattamento con TGF-beta sull'espressione di SMYD3 in linee cellulari di HCC differenti (early e late TGF- β signature).

ATTIVITÀ UNITÀ 2

Precisamente, sono stati definiti 2 sottogruppi di pazienti HCC in accordo alla prognosi più o meno favorevole. A questi 2 sottogruppi sono state associate 2 “signature” molecolari, designate rispettivamente con “early” e “late” TGFbeta signature. La *late signature* si associa a caratteri di maggiore invasività della neoplasia (e prognosi peggiore) rispetto alla *early signature*. In base a questo criterio sono stati identificati due sottogruppi di linee cellulari di HCC umano che riflettono a livello molecolare le caratteristiche riscontrate nei 2 cluster descritti sopra per i pazienti.

Linee HCC late TGF-beta signature presentano caratteri di invasività accresciuta rispetto e quelle del gruppo early.(Figura 2)

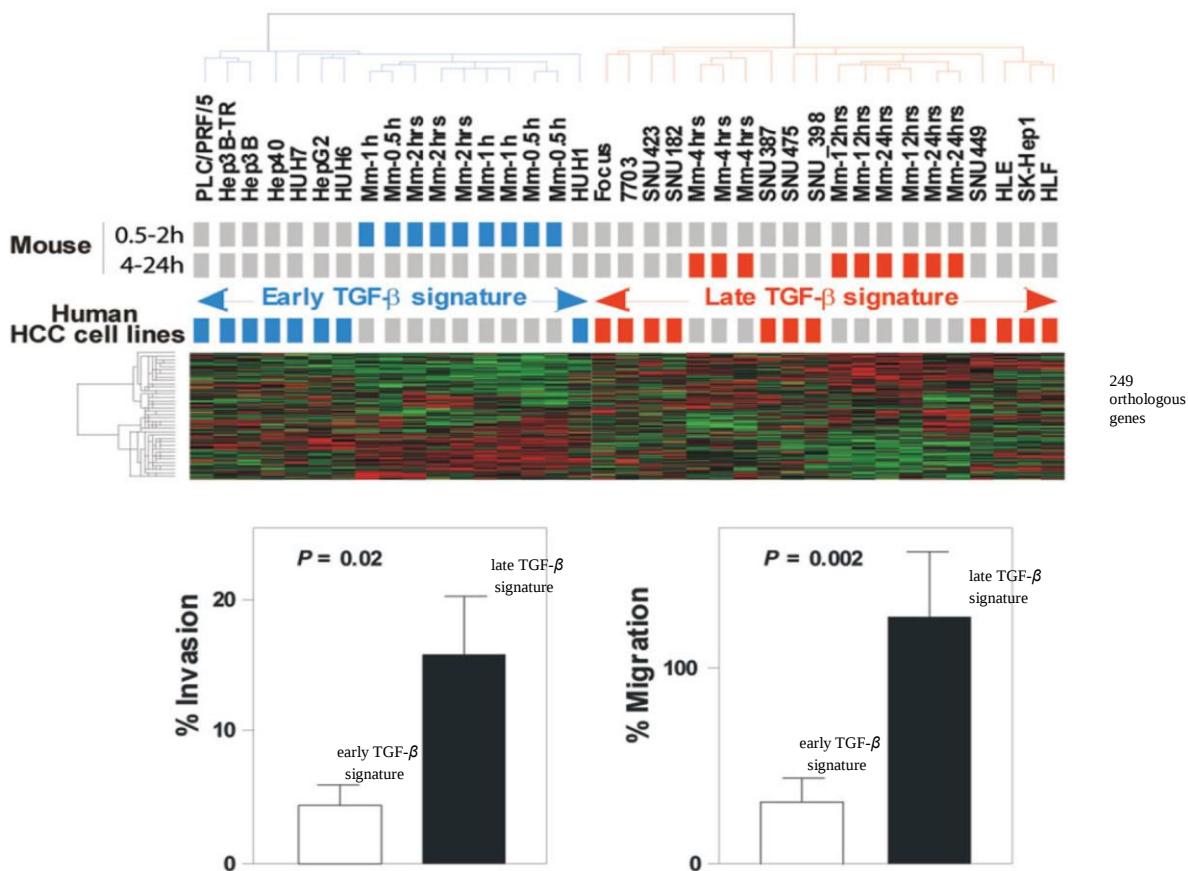


Figura 2. HCC PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2 (early signature) e HLE e HLF (late signature) (Coulouarn C et al. Hepatology 2008)

RISULTATI CONSEGUITI UNITÀ 2

Abbiamo utilizzato linee HCC PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2 (early signature) e HLE e HLF (late signature), in prima istanza per valutare gli effetti del trattamento con TGF-beta sull'espressione di SMYD3, e delineare eventuali differenza nell'effetto della citochina sull'espressione di SMYD3 nei 2 fenotipi. (Figura 3)

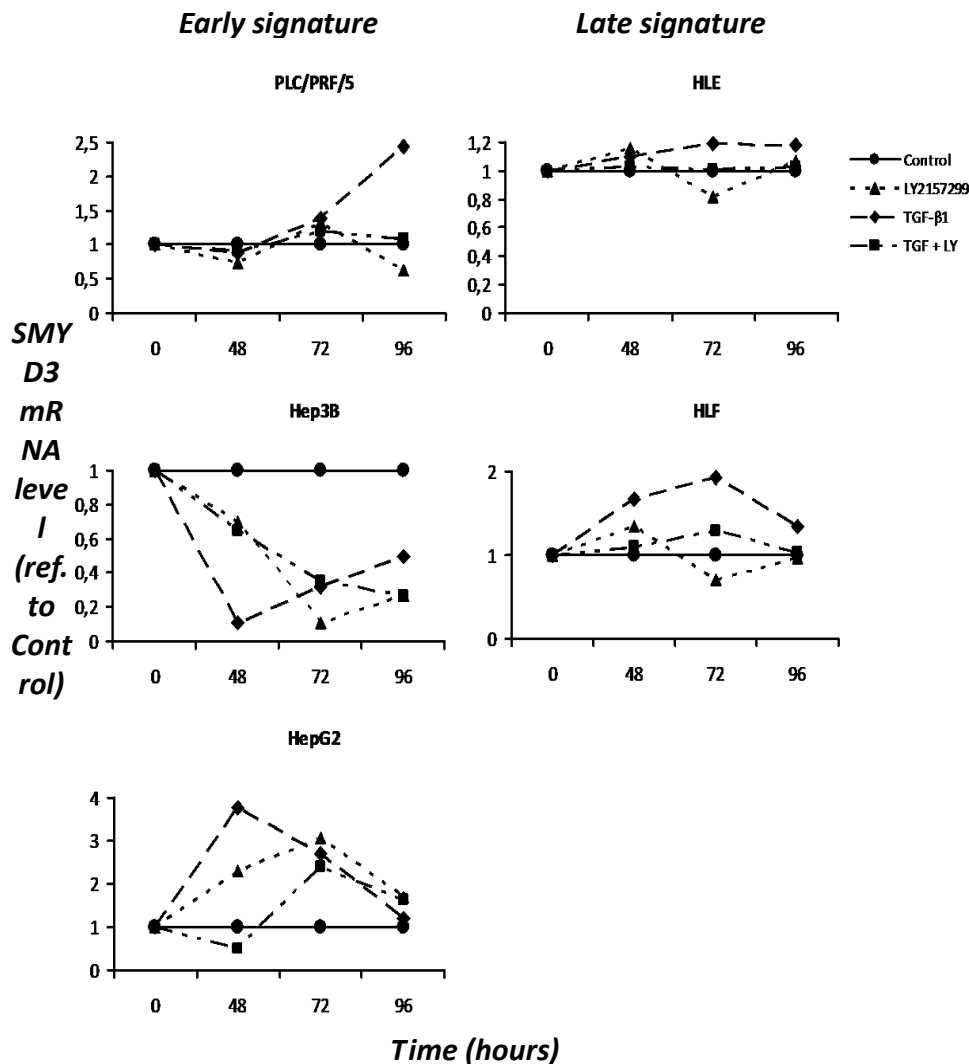


Figura3. Espressione di SMYD3 in cellule HCC early e late TGFb signature.

Nelle linee PLC/PRF/5 (early TGFb signature), e HLE e HLF (late TGFb signature) il trattamento con TGF-β1 induce un aumento di espressione di SMYD3. L'aggiunta dell'inibitore del recettore I del TGFb (TGFβ1R), LY2157299 (galunisertib), inibisce l'espressione di SMYD3 e annulla l'effetto del TGF-β1. Nelle altre linee l'effetto della citochina e dell'inibitore risulta piuttosto controverso. Successivamente è stata testata la proliferazione delle stesse cellule, silenziate o non per SMYD3, in assenza o presenza di TGF-beta, o l'inibitore del TGF-betaR, o entrambi. (Figura 4).

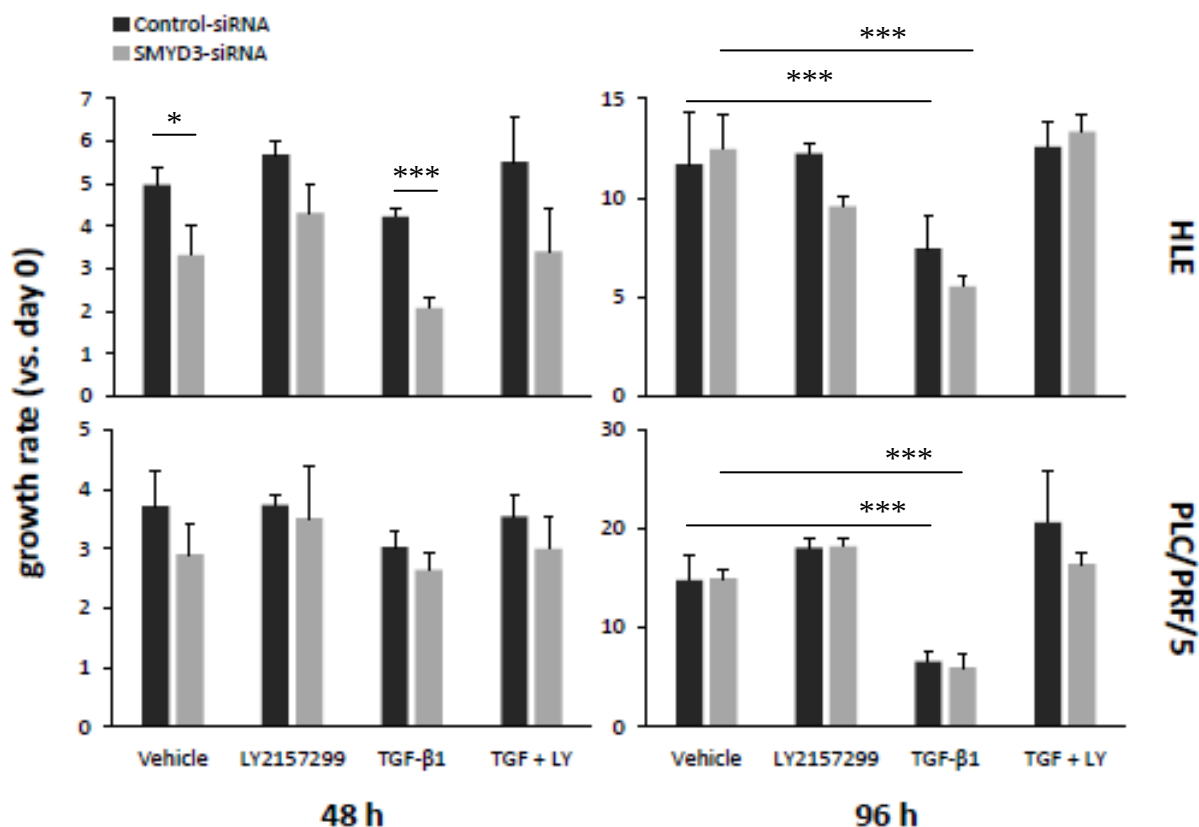


Figura 4: SMYD3 siRNA in cellule PLC/PRF/5 (early TGFb signature), e HLE e HLF (late TGFb signature) trattate con TGF-β1 e LY2157299 (galunisertib).

Il TGF-β1 esercita un effetto complessivamente inibitorio sulla proliferazione di cellule HCC con early o late TGFb signature (PLC/PRF/5 e HLE rispettivamente). Il silenziamento di SMYD3 apparentemente accresce l'effetto inibitorio del TGFb in cellule HLE, mentre sembra non avere lo stesso effetto nelle PLC/PRF/5.

CONGRESSI E SEMINARI

(in grassetto i nomi dei componenti dell'unità di Genetica Medica)

Abstracts

1. Valentina Grossi, Valentina Celestini, Tugan Tezil, **Luciana Russo**, **Candida Fasano**, Paola Sanese, **Giovanna Forte**, Alessia Peserico, Martina Lepore Signorile, Giovanna Longo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, Raffaella Maria Gadaleta, Natasha Scialpi, Mineko Terao, Enrico Garattini, Tiziana Cocco, Gaetano Villani, Antonio Moschetta, **Cristiano Simone**. 2018. Characterization of FoxO3A mitochondrial and nuclear functions in tumor cells unveils diverse roles in response to metabolic stress and cancer therapeutics. 8th World Congress on Targeting Mitochondria | October 2017, Berlino.
2. V. Grossi, **G. Forte**, P. Sanese, A. Peserico, M. Lepore Signorile, T. Tezil, R. Bagnulo, D. Loconte, R. Lovaglio, F. Susca, N. Resta, **C. Simone**. *Nuovo marker predittivo della risposta allo stress ossidativo: l'asse HSF1-FoxO3A regola la longevità mediante l'allele G dello SNP rs2802292*. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.
3. **C. Fasano**, V. Celestini, T. Tezil, **L. Russo**, P. Sanese, **G. Forte**, A. Peserico, M. Lepore Signorile, **V. Disciglio**, D. De Rasmio, A. Signorile, **R. Gadaleta**, N. Scialpi, M. Terao, E. Garattini, T.M. Cocco, G. Villani, A. Moschetta, V. Grossi, **C. Simone**. *L'oncosoppressore FoxO3A protegge*

le cellule tumorali da stress metabolico e da chemioterapia grazie alla sua localizzazione mitocondriale. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.

4. P. Sanese, A. Peserico, V. Celestini, **C. Fasano**, V. Grossi, M. Lepore Signorile, **L. Russo**, **G. Forte**, **V. Disciglio**, G. Caretti, A. Del Rio, **C. Simone**. *Nuove terapie mirate a bersaglio molecolare: vincere la chemioresistenza inibendo la metiltransferasi SMYD3*. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.

5. M. Lepore Signorile, V. Grossi, P. Sanese, V. Celestini, **C. Fasano**, **G. Forte**, **L. Russo**, **V. Disciglio**, **C. Simone**. *L'asse MAPK/c-Myc nel cancro del colon-retto: nuovi meccanismi patogenetici e approcci terapeutici*. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.

6. **V. Disciglio**, **C. Fasano**, **L. Russo**, **G. Forte**, P. Sanese, V. Celestini, A. Peserico, M. Lepore Signorile, V. Grossi, L. Troiani, I. Lolli, **C. Simone**. *Nuova variante del gene KIT associata a tumore stromale gastrointestinale metastatico: descrizione di un caso e revisione della letteratura*. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.

7. **L. Russo**, V. Celestini, T. Tezil, **C. Fasano**, **G. Forte**, P. Sanese, A. Peserico, M. Lepore Signorile, **V. Disciglio**, D. De Rasmio, A. Signorile, R. Gadaleta, N. Scialpi, M. Terao, E. Garattini, T.M. Cocco, G. Villani, A. Moschetta, V. Grossi, **C. Simone**. *Caratterizzazione molecolare e funzionale di una nuova isoforma mitocondriale del fattore di trascrizione FoxO3A*. XX Congresso Nazionale SIGU (15-18 Novembre 2017), Napoli.

Presentazioni Orali

1. **Cristiano Simone**. Valentina Celestini, Tugsan Tezil, **Luciana Russo**, **Candida Fasano**, Paola Sanese, **Giovanna Forte**, Alessia Peserico, Martina Lepore Signorile, Giovanna Longo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, Raffaella Maria Gadaleta, Natasha Scialpi, Mineko Terao, Enrico Garattini, Tiziana Cocco, Gaetano Villani, Antonio Moschetta, Valentina Grossi. 2018. Uncoupling FoxO3A mitochondrial and nuclear functions in cancer cells undergoing metabolic stress and chemotherapy. 8th World Congress on Targeting Mitochondria | October 2017, Berlino.

Articoli in riviste internazionali

1) Valentina Celestini, Tugsan Tezil, **Luciana Russo**, **Candida Fasano**, Paola Sanese, **Giovanna Forte**, Alessia Peserico, Martina Lepore Signorile, Giovanna Longo, Domenico De Rasmio, Anna Signorile, Raffaella Maria Gadaleta, Natasha Scialpi, Mineko Terao, Enrico Garattini, Tiziana Cocco, Gaetano Villani, Antonio Moschetta, Valentina Grossi and **Cristiano Simone**. Uncoupling FoxO3A mitochondrial and nuclear functions in cancer cells undergoing metabolic stress and chemotherapy. 2017. (Submitted to Cell Death and Disease, IF:5.965). Questo lavoro è stato poi accettato nei primi mesi del 2018: *Cell Death Dis.* 2018 Feb 14;9(2):231. doi: 10.1038/s41419-018-0336-0.

BIBLIOGRAFIA

Biggar KK, Li SS. Non-histone protein methylation as a regulator of cellular signalling and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015 Jan;16(1): 5-17.

Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Yousfi N, Perichon M, Chaussepied M, Chluba J, Langsley G, Weitzman JB. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. Cancer Res. 2012 Feb 1;72(3):810-20.

- Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Transforming growth factor-beta gene expression signature in mouse hepatocytes predicts clinical outcome in human cancer. *Hepatology*. 2008 Jun;47(6):2059-67.
- Fei X, Ma Y, Liu X, Meng Z. Overexpression of SMYD3 Is Predictive of Unfavorable Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 2017 Nov;243(3):219-226.
- Foreman KW, Brown M, Park F, Emtage S, Harriss J, Das C, Zhu L, Crew A, Arnold L, Shaaban S, Tucker P. Structural and functional profiling of the human histone methyltransferase SMYD3. *PLoS One*. 2011; 6(7): e22290.
- Gaedcke J, Grade M, Jung K, Camps J, Jo P, Emons G, Gehoff A, Sax U, Schirmer M, Becker H, Beissbarth T, Ried T, Ghadimi BM. Mutated KRAS results in overexpression of DUSP4, a MAPkinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2010 Nov; 49(11): 1024-34.
- Guil S, Soler M, Portela A, Carrère J, Fonalleras E, Gómez A, Villanueva A, Esteller M. Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jun 3; 19(7): 66470.
- Hamamoto R, Furukawa Y, Morita M, Iimura Y, Silva FP, Li M, Yagyu R, Nakamura Y. SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. *Nat Cell Biol*. 2004 Aug; 6(8): 731-40.
- Hamamoto R, Silva FP, Tsuge M, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y, Furukawa Y. Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. *Cancer Sci*. 2006 Feb; 97(2): 113-8.
- Kim H, Heo K, An W. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptormediated transcription. *J Biol Chem*. 2009; 284: 19867–19877.
- Kunizaki M, Hamamoto R, Silva FP, Yamaguchi K, Nagayasu T, Shibuya M, Nakamura Y, Furukawa Y. The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. *Cancer Res*. 2007; 67: 10759–10765.
- Liu C, Fang X, Ge Z, Jalink M, Kyo S, Björkholm M, Gruber A, Sjöberg J, Xu D. The telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is a direct target of the histone methyltransferase SMYD3. *Cancer Res*. 2007; 67: 2626–2631.
- Liu Y, Luo X, Deng J, Pan Y, Zhang L, Liang H. SMYD3 overexpression was a riskfactor in the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma. *Tumour Biol*. 2015 Apr; 36(4): 2685-94
- Luo XG, Zhang CL, Zhao WW, Liu ZP, Liu L, Mu A, Guo S, Wang N, Zhou H, Zhang TC. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2014 Mar 1; 344(1): 129-37
- Mazur PK, Reynoird N, Khatri P, Jansen PW, Wilkinson AW, Liu S, Barbash O, Van Aller GS, Huddleston M, Dhanak D, Tummino PJ, Kruger RG, Garcia BA, Butte AJ, Vermeulen M, Sage J,

- Gozani O. SMYD3 links lysine methylation of MAP3K2 to Ras-driven cancer. *Nature*. 2014 Jun 12; 510(7504): 283-7.
- O'Byrne KJ, Baird AM, Kilmartin L, Leonard J, Sacevich C, Gray SG. Epigenetic regulation of glucose transporters in non-small cell lung cancer. *Cancers (Basel)*. 2011 Mar 25;3(2):1550-65.
- Paladino D, Yue P, Furuya H, Acoba J, Rosser CJ, Turkson J. A novel nuclear Src and p300 signaling axis controls migratory and invasive behavior in pancreatic cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 9;7(6):7253-67.
- Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa AJ, Di Virgilio V, Fittipaldi R, Fabini E, Bertucci C, Varchi G, Moyer MP, Caretti G, Del Rio A, Simone C. A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol*. 2015 Oct;230(10):2447-2460.
- Ren TN, Wang JS, He YM, Xu CL, Wang SZ, Xi T. Effects of SMYD3 over-expression on cell cycle acceleration and cell proliferation in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Med Oncol*. 2011 Dec;28 Suppl 1:S91-8.
- Sarris ME, Moulos P, Haroniti A, Giakountis A, Talianidis I. SMYD3 is a Transcriptional Potentiator of Multiple Cancer-Promoting Genes and Required for Liver and Colon Cancer Development. *Cancer Cell*. 2016 Mar 14;29(3):354-66.
- Van Aller GS, Reynoird N, Barbash O, Huddleston M, Liu S, Zmoos AF, McDevitt P, Sinnamon R, Le B, Mas G, Annan R, Sage J, Garcia BA, Tummino PJ, Gozani O, Kruger RG. Smyd3 regulates cancer cell phenotypes and catalyzes histone H4 lysine 5 methylation. *Epigenetics*. 2012 Apr;7(4):340-3.
- Wang L, Wang QT, Liu YP, Dong QQ, Hu HJ, Miao Z, Li S, Liu Y, Zhou H, ZhangTC, Ma WJ, Luo XG. ATM Signaling Pathway Is Implicated in the SMYD3-mediated Proliferation and Migration of Gastric Cancer Cells. *J Gastric Cancer*. 2017 Dec; 17(4):295-305.
- Yoshioka Y, Suzuki T, Matsuo Y, Nakakido M, Tsurita G, Simone C, Watanabe T, Dohmae N, Nakamura Y, Hamamoto R. SMYD3-mediated lysine methylation in the PH domain is critical for activation of AKT1. *Oncotarget*. 2016 Sep 8. doi: 10.18632/oncotarget.11898.
- Zou JN, Wang SZ, Yang JS, Luo XG, Xie JH, Xi T. Knockdown of SMYD3 by RNA interference down-regulates c-Met expression and inhibits cells migration and invasion induced by HGF. *Cancer Lett*. 2009; 280: 78–85.

LINEA 2

MALATTIE EPATICHE, DELLE VIE BILIARI E PANCREATICHE NON NEOPLASTICHE

Per la linea di ricerca n. 2 “Malattie epatiche, delle vie biliari e pancreatiche non neoplastiche”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2017 sono i seguenti.

Progetto: “Malattia di Gaucher causa di epatopatia cronica” (Termine del progetto: 31/12/2018).

Responsabile del progetto: Dott. Guglielmi Vitantonio.

(le attività dell’UOC sono descritte nella Linea 1)

Introduzione

La malattia di Gaucher è una malattia genetica autosomica recessiva, rara (prevalenza di 1:40.000, ma negli ebrei Ashkenaziti 1:800). È caratterizzata dalla carenza dell’enzima glucocerebrosidasi, per cui il glucocerebroside, che è un glicolipide metabolizzato dal suddetto enzima, si accumula nei macrofagi, con effetti negativi sistemici.

Esistono tre forme della malattia, di cui due neurologiche. Nella prima si verifica la morte nei primi mesi di vita, nella seconda l’exitus si verifica nella prima infanzia. La terza, non neurologica, è la più frequente, con coinvolgimento di fegato, milza, midollo osseo, polmone e tessuto scheletrico. Questa forma può essere presente nell’età adulta e può presentarsi con steatosi epatica, epatomegalia, splenomegalia, epatopatia cronica e cirrosi epatica. Per questo abbiamo testato tutti quei pazienti con epatopatia cronica in cui non è stata trovata alcuna eziologia. In Puglia ci sono 4 milioni di abitanti, quindi dovremmo trovare almeno 100 pazienti con malattia di Gaucher. Inoltre, con l’arrivo sulle nostre coste di migliaia di musulmani, dovremmo trovarne anche di più, ma finora sono stati trovati pochi casi.

Pazienti e metodi

In 12 mesi abbiamo testato 47 pazienti con malattia cronica di fegato sine causa (16 donne e 31 uomini, età media 58 anni, range da 15 a 70). Sei pazienti erano cirrotici (in 2 con emorragia digestiva da rottura varici esofagee).

Essi, dopo aver dato il loro consenso scritto, sono stati sottoposti a prelievo venoso. Il campione ematico viene con una pipetta distribuito su dei dischetti di carta bibula. Il campione ematico, dopo almeno tre ore, viene chiuso in una busta e inviato al laboratorio di Centogene, in Germania. Qui l’enzima viene dosato con un metodo di spettrometria di massa tandem e, in caso di deficit, si procede a test genetico-molecolare di conferma sequenziando il gene secondo il metodo Sanger.

Risultati

La diagnosi di malattia di Gaucher è risultata sospetta, in una paziente cirrotica di 64 anni con emorragia digestiva causata dalla rottura di varici esofagee. Non ha mai risposto a diversi nostri inviti a tornare in ospedale per ripetere il test e per la terapia del caso. Inoltre, la figlia di una paziente messicana affetta da malattia di Gaucher si è rivelata sana.

Conclusioni

La malattia di Gaucher, anche se rara, dovrebbe essere presa in considerazione quando si è di fronte a una malattia del fegato sine causa.

Attività

Abbiamo inviato a tutti i medici di base dei paesi limitrofi una lettera in cui si cercava di sensibilizzarli, invitandoli a mandarci tutti i loro pazienti con tali caratteristiche per un prelievo.

Il 16 dicembre 2017 abbiamo organizzato un congresso su questa tematica, invitando la dott.ssa Quarta del centro di riferimento per la malattia di Gaucher (Ematologia di Brindisi), e numerosi medici del nostro istituto, e i medici di base del territorio.

Dal 2 al 5 maggio p.v. si terrà a New Dehli un congresso internazionale sulle malattie rare, e il sottoscritto è stato invitato a presentare l'esperienza dell'IRCCS con un poster e una relazione orale. La presentazione sarà pubblicata negli atti ufficiali del congresso. Contiamo di elaborare tra pochi mesi un lavoro da inviare a rivista internazionale.

Progetto: “Studio di nuovi biomarcatori non invasivi per la valutazione ed il monitoraggio di soggetti con NAFLD/NASH” (Termine del progetto: 31/12/2019).

Responsabile del progetto: Dott. Mario Correale.

Partecipanti: Dott. Alberto Ruben Osella (Epidemiologia e Biostatistica), dott.ssa Palma Iacovazzi (Patologia Clinica), dott.ssa Catia Bonfiglio (Epidemiologia e Biostatistica), dott. Raffaele Cozzolongo (UOC Gastroenterologia 1), dott. Fabio Fucilli (Diagnostica per immagini), dott. Francesco Dituri (Contrattista).

(le attività del Laboratorio di Patologia Clinica sono descritte nella Linea 1)

Introduzione

Negli ultimi anni si sta verificando un progressivo incremento sia in termini percentuali che in termini assoluti dell'incidenza di steatosi epatica (NAFLD), collegata all'obesità ed alla cosiddetta sindrome metabolica. Se non diagnosticata ed opportunamente trattata col tempo tende ad evolvere verso la condizione infiammatoria di steato-epatite (NASH), che rappresenta un processo evolutivo che può portare alla cirrosi epatica ed in alcuni casi all'epatocarcinoma.

Pertanto, l'identificazione di nuovi parametri biologici, che affiancandosi ai test metabolici classici di sindrome metabolica (curva glicemica da carico, insulina, Homa, ecc) e di gravità della fibrosi (numero piastrine, transaminasi, albumina, ecc) ed alle indagini strumentale attualmente impiegate (ecografia, varie tecniche di elastosonografia, RMN, ecc) possano migliorare la gestione di questi pazienti, soprattutto nel prevenire l'evoluzione verso stadi irreversibili e gravi della malattia.

In particolare, hanno suscitato il nostro interesse 2 nuovi biomarcatori che potrebbero avere una potenziale applicazione in questo campo e che non risultano ancora approfonditamente studiati: l'SCCA IgM e l'Irisina.

Il primo (Squamous Cell Carcinoma Antigen-IgM), identifica l'immuno-complesso formato dall'antigene del carcinoma a cellule squamose e le immunoglobuline di tipo M (IgM). Scoperto nel 2005 come nuovo biomarcatore dell'epatocarcinoma (HCC), è stato proposto anche come marcatore di altre malattie epatiche, incluse l'epatite virale cronica, la cirrosi e nella steato-epatite non alcolica (NASH), sembra che alti livelli sierici di SCCA-IgM si correlino con la presenza di NASH nel tessuto epatico.

L'irisina è un'adipomiochina e rappresenta un nuovo ed importante indicatore di tessuto adiposo bruno, che viene attualmente considerato un fisiologico tessuto anti-obesità. Recentemente identificata come nuova molecola, è secreta dal dominio FNDC5, a livello della fibronectina di tipo III, nel muscolo scheletrico. Questo ormone sembra avere un ruolo importante nel convertire il

tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno e nella regolazione del dispendio energetico. La sua espressione ed il suo ruolo sono stati segnalati anche in altre condizioni come l'infiammazione, la neurogenesi ippocampale, l'invecchiamento ed alterazioni di tipo metabolico.

Obiettivi dello studio

Grazie alla collaborazione con l'U.O. di Epidemiologia del nostro Istituto, vengono arruolati, soggetti con steatosi epatica/ steato-epatite che, dopo attento inquadramento clinico ed esecuzione di accurate indagini di base di tipo laboratoristico e clinico, vengono avviati a vari regimi dietetici controllati e/o ad attività fisica. Su questi soggetti si intendono valutare i nuovi biomarcatori oggetto del presente progetto, sia al tempo 0 (prima di iniziare qualsiasi tipo di intervento), sia in momenti specifici del monitoraggio (coincidenti con i controlli clinici) per valutare gli effetti ottenuti, in rapporto alle variazioni degli altri indicatori clinici, laboratoristici e strumentali routinari ed in confronto ad un congruo gruppo di controllo.

Dopo una preliminare messa a punto e validazione delle metodiche di laboratorio relative ai 2 biomarcatori considerati, si passerà a valutare i livelli circolanti di SCCA IgM ed Irisina in soggetti sottoposti a tre interventi dietetici diversi, in confronto a soggetti apparentemente sani e soggetti non sottoposti a regimi dietetici controllati.

Attività svolta

Dopo la prevista individuazione e messa a punto della metodica di misurazione più idonea per la determinazione di irisina e SCCA-IgM, nel corso di questo primo anno del progetto sono stati effettuati circa 600 dosaggi per irisina e altrettanti per SCCA-IgM nel siero di 200 pazienti affetti da vario grado di NAFLD, arruolati attraverso il trial MEDIDIET, coordinato dal Dr. Osella, e testati ai tempi t0, t1 e t2 (cioè prima di iniziare la dieta e poi a 3 e 6 mesi). I soggetti erano stati sottoposti a tre interventi dietetici diversi: Dieta Mediterranea (DM), Dieta a basso Indice Glicemico (LGID) e Dieta Mediterranea a basso Indice Glicemico (LGIMD). Inoltre, preliminarmente è stato effettuato il dosaggio dei 2 biomarcatori anche su un gruppo di controllo, rappresentato da soggetti apparentemente sani.

Risultati conseguiti

I primi risultati ottenuti nel corso di questo progetto sono riportati nell'articolo "Clinical significance of irislin serum levels in patients with the metabolic syndrome treated with three different diets: a post-hoc analysis from a parallel-arms randomized controlled clinical trial", che è stato sottoposto a Journal of Nutrition.

LINEA 3

MALATTIE NON NEOPLASTICHE DELL'APPARATO DIGERENTE

Per la linea di ricerca n. 3 “Malattie non neoplastiche dell'apparato digerente”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l'anno 2017 sono i seguenti:

Laboratorio di Farmacologia Sperimentale

L'unità di Farmacologia sperimentale è un laboratorio di ricerca di base e preclinica orientato allo studio nell'uomo della funzionalità neuromuscolare e mucosale dell'apparato digerente, con particolare interesse nell'identificazione di nuove molecole naturali e di sintesi per possibili innovative strategie terapeutiche. La peculiarità di questo laboratorio è di indagare in vitro i meccanismi biomolecolari coinvolti nella fisiopatologia delle malattie gastrointestinali.

Il laboratorio di Farmacologia Sperimentale esegue studi “in vitro” su strip, mucosa e colture cellulari primarie di tessuto umano da pezzi operatori di pazienti sottoposti nell'istituto ad interventi chirurgici per patologie neoplastiche e non.

I progetti di ricerca corrente sono i seguenti:

1. Meccanismi molecolari miogenici coinvolti nella malattia diverticolare
2. Ruolo degli estrogeni sulle risposte muscolari e neuro-mediate nel colon umano in vitro. Influenza del sesso e dell'età
3. Idrossitirosolo e infiammazione: alterazioni della motilità e permeabilità nel colon umano. Studi in vitro.

Progetto: “Meccanismi molecolari miogenici coinvolti nella malattia diverticolare” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

Partecipanti: Dott. Lorusso Dionigi (Chirurgia Generale), Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott. Pezzolla Francesco (Chirurgia Generale), Dott.ssa Ignazzi Antonia (Contrattista), Dott.ssa Scirocco Annunziata (Borsista)

Studio effettuato in collaborazione con altri laboratori dell'Istituto e con il Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche –Università Sapienza di Roma.

Introduzione

La Malattia diverticolare (DD) rimane una causa comune di morbidità nelle comunità occidentali ed è destinata ad aumentare come prevalenza con l'invecchiamento della popolazione. La patogenesi della DD, anche se non ancora chiaramente definita, sembra essere multifattoriale e comprende fattori dietetici, età, disordini strutturali della muscolatura colica e disordini motori. L'alterazione potrebbe essere intrinseca alla muscolatura e/o coinvolgere i neurotrasmettitori enterici che controllano la motilità.

Risultati

I risultati ottenuti insieme al Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche -Università Sapienza di Roma mostrano che la funzionalità contrattile del colon umano nella muscolatura liscia

circolare e longitudinale sia su strips che su cellule isolate da exeresi chirurgica di pazienti con diverticolosi (gruppo B) è diversa rispetto al gruppo controllo (pazienti operati solo per cancro colonrettale (gruppo A). In particolare i pazienti del gruppo B mostrano una risposta ridotta alla contrazione indotta dal carbacholo negli strips di muscolatura circolare rispetto a quelli della longitudinale. Al contrario la variazione di risposta massima nelle cellule isolate è presente nella muscolatura longitudinale senza alcuna variazione nella muscolatura circolare.

Lo studio dell'espressione genica dei recettori sulle SMC ha confermato tale diversità. Infatti l'espressione del recettore muscarinico M3 per l'ACh è risultata significativamente ridotta nel gruppo B rispetto al gruppo A. Per quanto riguarda la muscolatura circolare tra il gruppo A e B non sono state riscontrate differenze nella risposta contrattile mentre è stata osservata una diversa attività biologica in risposta all'agente rilasciante, il VIP. Infatti sia negli strips che nelle cellule la risposta massima al VIP è ridotta sia negli strips che nelle cellule della muscolatura circolare nei pazienti con diverticolosi (gruppo B).

Lo stesso andamento si ha con l'analisi molecolare dell'espressione dei recettori delle eNOS con una riduzione significativa nei due gruppi di pazienti B vs A.

Un'altro aspetto che è stato preso in esame, è il possibile "switch infiammatorio" e/o fenotipico pro-fibrotico delle stesse fibrocellule muscolari che ha evidenziato un'aumentata espressione rispetto al controllo dei geni che codificano per molecole infiammatorie, quali il TNF α , e per le componenti del complesso inflammasoma, in entrambi gli strati muscolari. Pertanto la presenza di infiammazione potrebbe rappresentare un primo step che porta progressivamente allo sviluppo di alterazioni della motilità e, in una fase più avanzata della malattia, culmina nello sviluppo delle complicanze, tra cui la fibrosi. Inoltre, in entrambi gli strati muscolari si osserva un'aumentata produzione di collagene associata ad una riduzione dell'espressione dell' α -SMA, proteina contrattile, fenomeno che si manifesta col progredire della patologia sia nella muscolatura circolare che nella longitudinale.

Anche nei pazienti appartenenti al gruppo con malattia diverticolare sintomatica e complicata (diverticolite, gruppo C) le fibrocellule muscolari dello strato circolare mostrano una riduzione significativa del rilascio indotto dal VIP rispetto al gruppo A confermando le alterazioni già riscontrate nel gruppo B. Inoltre sono state evidenziate anche alterazioni significative nella risposta agli agenti contratturanti sia rispetto al gruppo A che al gruppo B. Pertanto questo studio mostra che i gruppi B e C presentano delle alterazioni miogeniche sia nella muscolatura circolare che in quella longitudinale e suggerisce la presenza di un progressivo e graduale peggioramento delle alterazioni motorie nella malattia diverticolare complicata (diverticolite).

I risultati di questo studio sono stati presentati ad alcuni congressi nell'anno 2017 di seguito riportati:

1. Pallotta L, Scirocco A, Ignazzi A, **Maselli MA**, Cicienia A, Carabotti M, De Toma G, Pezzolla F, Corazziari E, Severi C. Inflammatory state and phenotypic switch of human smooth muscle in diverticulosis and complicated diverticular disease. *Neurogastro* 2017 ESNM, Cork, Irlanda 24-26 Agosto 2017
2. Pallotta L, Scirocco A, Ignazzi A, **Maselli MA**, Cicienia A, Carabotti M, De Toma G, Pezzolla F, Corazziari E, Severi C. Muscle alterations in colonic diverticulosis and diverticular disease. *Digestive and Liver Disease* 49S2 (2017) e73–e223

3. **M.A. Maselli**, L. Pallotta, A. Ignazzi, A. Scirocco, R. Donghia, D. Lorusso, F. Pezzolla, C. Severi. Effect of carbachol and VIP in human colonic diverticulosis. 38° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia (SIF), Rimini, 25-28 Ottobre 2017

I risultati ottenuti saranno oggetto di una pubblicazione nell'anno 2018.

Progetto: *“Ruolo degli estrogeni sulle risposte muscolari e neuro-mediate nel colon umano in vitro. Influenza del sesso e dell'età” (Termine del progetto: 31/12/2017)*

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

Partecipanti: Dott. Lorusso Dionigi (Chirurgia Generale), Dott. Pezzolla Francesco (Chirurgia Generale), Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott.ssa Notarnicola Maria (Biochimica Nutrizionale), Dott.ssa Ignazzi Antonia (Contrattista), Dott.ssa D'Onghia Rossella (Borsista), Dott.ssa Scirocco Annunziata (Borsista)

Introduzione

Il progetto si basa su uno studio, precedentemente pubblicato, nel quale abbiamo dimostrato che l'età e il genere influenzano la risposta motoria del colon umano. Ciò sembra essere dovuto al recettore muscarinico e al sistema nitrgico, gender-dipendente e al pattern ormonale, in particolare gli estrogeni. Strip di colon sono stati trattati con concentrazioni crescenti di 17-beta-estradiolo (E2) (attivatore della maggior parte dei recettori ER), PPT (selettivo agonista dei ER α), DPN (agonista selettivo degli ER β).

Risultati

Dai dati ottenuti abbiamo osservato che i tre agonisti hanno risposte differenti tra maschi e femmine. L'E2 nel maschio ha un effetto rilassante del 33.8 $\pm$ 2.9% rispetto alle femmine, nella quale il suo effetto rilassante è del 55.2 $\pm$ 6.3%. Invece l'effetto rilassante dell' DPN è quasi sovrapponibile nei due gruppi rispettivamente 31.6 $\pm$ 3.0 nel maschio e 28.2 $\pm$ 5.3 nella femmina. Infine l'effetto del PPT è maggiormente espresso nella femmina rispetto al maschio dove è quasi assente, 18.7 $\pm$ 3.8 nel maschio e 42.1 $\pm$ 9.5 nella femmina. Questi dati mostrano la presenza di entrambe le isoforme in entrambi i gruppi. L'unica differenza è rappresentata dall'isoforma α , la quale risulta maggiormente espressa nella femmina.

Abbiamo anche valutato gli effetti dei tre agonisti sulla risposta esogena indotta dal betanecolo. Abbiamo osservato che essi riducono in maniera statisticamente significativa la risposta massima del betanecolo alla concentrazione 10⁻³M, mentre non si ha nessuna variazione statisticamente significativa dell'EC₅₀ per gli agonisti E2 e PPT, al contrario del DPN.

Infine abbiamo valutato l'effetto dell' ICI 182,780 (fulvestran, antagonista degli ERs) sul rilassamento dell'E2 in entrambi i gruppi. Questo effetto è risultato ridotto in maniera statisticamente significativa in entrambi i gruppi.

Progetto: *“Idrossitirosolo e infiammazione: alterazioni della motilità e permeabilità nel colon umano. Studi in vitro” (Termine del progetto: 31/12/2018).*

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

Partecipanti: Dott. Pezzolla Francesco (Chirurgia Generale), Dott. Lorusso Dionigi (Chirurgia Generale), Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott.ssa Notarnicola Maria (Biochimica Nutrizionale), Dott. Chieppa Marcello (Immunopatologia Sperimentale)

contrattista), Dott.ssa Ignazzi Antonia (Contrattista), Dott.ssa D'Onghia Rossella (Borsista), Dott.ssa Scirocco Annunziata (Borsista)

Il disegno dello studio prevede nei due gruppi di pazienti, gruppo controllo paz. operati per cancro colon rettale senza ostruzione e paz. con morbo di Crohn di valutare:

- il ruolo dell' idrossitirosolo (HT) nel mediare la risposta esogena a vari agonisti (carbacolo, istamina, KCl) con azione contratturante;
- il ruolo dell'HT nel mediare la risposta endogena nitrgica;
- l'espressione delle NOS.

In questa prima fase del progetto abbiamo valutato nei pazienti con morbo di Crohn gli effetti dell'HT nel mediare la risposta endogena, precisamente il suo effetto sul sistema NANC. Gli effetti dell'HT sono stati valutati in presenza di atropina e guanitidina in associazione ad altre due sostanze, quali NG-nitro-L-arginina metil estere (L-NAME), ed L-N6-(1-Iminoethyl)lysine (L-NIL), rispettivamente inibitore aspecifico e specifico delle NOS/iNOS.

I dati preliminari mostrano che l'HT è in grado di inibire l'effetto contratturante, indotto nel tessuto mediante elettrodi a campo, mentre in presenza dei due inibitori non si osserva nessuna variazione di risposta. Inoltre per quanto riguarda le curve dosi-risposta indotte dal carbacolo, l'HT non ha nessun effetto, in quanto le due curve, prima e dopo l'HT risultano quasi sovrapponibili.

Tali risultati preliminari devono essere validati aumentando la numerosità dei campioni.

Di seguito sono riportati i titoli di due lavori scientifici inviati lo scorso anno alle riviste ed attualmente uno accettato, e l'altro in fase di definizione.

Infatti quest'ultimo lo stiamo modificando in base alle indicazioni dei reviewers per essere anch'esso successivamente pubblicato.

1. YDLD3686
MYOGENIC OXIDATIVE IMBALANCE INTERFERES WITH ANTRAL MOTILITY IN OBESE SUBJECTS (in press)
2. PHAT-D-17-00158R1
GENDER-DIFFERENCES OF IN VITRO COLONIC MOTILITY AFTER CHEMO- AND RADIO-THERAPY IN HUMANS

Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione

Il ***Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione*** è costituito 2 Dirigenti Medici, n. 2 Dirigenti Biologi, n. 2 Tecnici di laboratorio biomedico (TLB), n. 1 biologo contrattista.

Accanto ad una attività diagnostica e assistenziale, il Laboratorio focalizza la propria attività di ricerca su differenti patologie gastrointestinali quali la dispepsia nelle sue varianti funzionali e organiche, le patologie gastriche *Helicobacter pylori*-correlate, i disturbi glutine correlati, le intolleranze alimentari nonché la valutazione di cibi funzionali e le loro attività sul tratto gastrointestinale (GI). Infine, mediante sperimentazioni *in vitro* si valutano l'atteggiamento proliferativo della mucosa gastroenterica e la sua risposta a particolari trattamenti con ceppi batterici probiotici. Nel corso del trascorso anno, l'attività di ricerca si è sviluppata intorno ai seguenti progetti:

Progetto: “Effetto protettivo del *Lactobacillus rhamnosus* GG (L.GG) sulla barriera epiteliale intestinale in seguito a danno indotto dalla gliadina. Ruolo delle poliammine cellulari” (Termine del progetto: 31/12/2016).

Responsabile: Dr. Francesco Russo

Partecipanti: Dott. Riezzo Giuseppe, Dott.ssa Clemente Caterina, Dott. Linsalata Michele, Dott.ssa D’Attoma Benedetta, Dott.ssa Orlando Antonella (Contrattista), Dott.ssa Martulli Maneuela (Borsista)

Introduzione

La celiachia è una patologia infiammatoria cronica dell’intestino tenue, geneticamente determinata e indotta dal glutine contenuto in alcuni cereali quali frumento, segale e orzo. La maggior parte dei componenti tossici del glutine è contenuta nella gliadina, la frazione alcool-solubile. Nell’uomo, le molecole non digerite di gliadina sono resistenti al processo di degradazione da parte delle proteasi gastriche, pancreatiche e delle membrane dell’orletto a spazzola intestinale; di conseguenza, dopo l’ingestione di glutine, la gliadina tende a permanere nel lume intestinale [1].

La celiachia è caratterizzata da un’aumentata permeabilità paracellulare e da un’alterazione dell’integrità della barriera intestinale, che facilitano le interazioni tra i peptidi del glutine e le cellule presentanti l’antigene nella lamina propria [2]. Essendo la gliadina ricca in residui di glutammina, la presenza di numerose proteine accettori di glutammina nella matrice extracellulare potrebbe essere responsabile della formazione di cross-links tra la gliadina e le proteine della matrice. Questo reclutamento della gliadina da parte delle proteine della matrice extracellulare potrebbe favorire una disponibilità a lungo termine delle frazioni tossiche della gliadina nella mucosa [3]. Restano comunque ancora da chiarire le possibili interazioni della gliadina con l’epitelio intestinale e i meccanismi attraverso cui la gliadina stessa riesca ad attraversare la barriera intestinale per raggiungere la sottomucosa [4].

L’integrità della barriera intestinale dipende da un complesso di proteine che appartengono a differenti giunzioni intercellulari quali le giunzioni occludenti (tight junctions) e le giunzioni aderenti (adherens junctions) [5], le quali presentano una organizzazione strutturale comune formata da componenti trans-membrana con funzione di adesione e da proteine adattatrici citosoliche che forniscono un link diretto o indiretto col citoscheletro. Le tight junctions (zonuline, occludina e claudina) sono i complessi giunzionali più apicali, al di sotto dei quali si collocano le adherens junctions (E-caderina, catenine), responsabili di una più stretta adesione cellula-cellula.

Tra le diverse sostanze coinvolte nel controllo della permeabilità intestinale, le poliammine rivestono un ruolo cruciale. Tali composti policationici sono ammine alifatiche a catena corta, ubiquitarie, presenti in tutte le cellule eucariotiche studiate e regolatori della proliferazione cellulare e della differenziazione [6]. Le poliammine sono inoltre coinvolte nell’espressione e nelle funzioni delle proteine di giunzione intercellulare, in particolare le adherens junctions, così come nel mantenimento dell’integrità dell’epitelio intestinale attraverso la regolazione del bilancio tra i processi di rinnovamento cellulare, arresto della crescita e apoptosi [7]. L’effetto protettivo delle poliammine sulla tossicità in vitro dei peptidi gliadinici è stato correlato alla loro azione sulle funzioni dell’orletto a spazzola intestinale o delle membrane intracellulari coinvolte nell’handling della gliadina. Studi preliminari suggeriscono che le ammine potrebbero agire nel metabolismo intestinale dei peptidi gliadinici come substrati della transglutaminasi in quanto donatori di un gruppo amminico [8]. In realtà è ancora poco chiara l’azione diretta della gliadina sui

livelli di poliammine cellulari in vivo ed in vitro. Un recente studio condotto dal nostro gruppo ha rilevato un aumento significativo dei livelli di poliammine sia singole che totali su una linea cellulare di adenocarcinoma del colon (Caco-2) in seguito al trattamento con gliadina [9].

Al momento, la dieta priva di glutine rappresenta l'unica terapia valida per la malattia celiaca. Di conseguenza si cercano strategie alternative che includano per esempio agenti in grado di contrastare il danno indotto dal glutine sulla mucosa intestinale.

È stato dimostrato sia *in vitro* che *in vivo* il ruolo svolto dai probiotici nel preservare la barriera intestinale promuovendone la sua integrità [10,11] anche se i meccanismi d'azione specifici non sono ancora chiari. Diversi ceppi probiotici hanno mostrato promettenti abilità nell'inibizione degli effetti tossici indotti dalla gliadina [12], e a tal proposito un particolare ceppo probiotico quale il *Lactobacillus rhamnosus* GG (L.GG) è risultato valido nella prevenzione e nel trattamento di diverse patologie gastrointestinali [13]. L'L.GG è uno tra gli organismi probiotici più studiati dal punto di vista clinico e possiede buone capacità di adesione alle cellule epiteliali e al muco. In precedenti studi condotti dal nostro gruppo, tale ceppo batterico, testato sia come vitale e inattivato al calore che come omogenato ed estratto citoplasmatico è stato in grado di influenzare in maniera statisticamente significativa la proliferazione cellulare e il metabolismo delle poliammine [14,15] così come contrastare l'alterazione dell'epitelio intestinale indotta dalla gliadina [9]. La presenza delle poliammine cellulari si è dimostrata inoltre un pre-requisito per l'L.GG nell'esplicare la sua funzione riparatrice attraverso la modulazione dell'espressione di differenti proteine delle *tight junctions* [9].

Sulla base di tale premessa, considerato che per i pazienti celiaci, la dieta priva di glutine risulta al momento l'unica terapia valida e, comunque, difficile da seguire, nasce l'esigenza di trovare terapie alternative che includano anche agenti in grado di ridurre l'esposizione al glutine, sia attraverso il binding e la degradazione dello stesso nel lume intestinale, che tramite la prevenzione dell'uptake del glutine a livello mucosale. In questa prospettiva, ceppi probiotici come l'L.GG, considerati sia come microrganismi vitali che inattivati al calore, potrebbero giocare un ruolo attivo nel proteggere la mucosa intestinale dai danni indotti dalla gliadina.

Referenze citate

1. Green PHR, Cellier C. Celiac disease. N Engl J Med 2007; 357 (17): 1731-1743.
2. Mettner J. Gluten and the gut. Minn Med. 2012; 95(12): 14-18.
3. Dieterich W, Esslinger B, Schuppan D. Pathomechanisms in celiac disease. Int Arch Allergy Immunol. 2003; 132(2): 98-108.
4. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N. Intestinal permeability in coeliac disease: insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. Gut. 2012; 61(9): 1355-1364.
5. Liu Y1, Nusrat A, Schnell FJ, Reaves TA, Walsh S, Pochet M, Parkos CA. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. J Cell Sci 2000; 113 (13): 2363-2374.
6. Thomas T, Thomas TJ. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. Cell Mol Life Sci 2001; 58(2): 244-258.
7. Wang JY. Polyamines regulate expression of E-cadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function. Inflammopharmacology 2005; 13(1-3): 91-101.

8. Auricchio S, De Ritis G, De Vincenzi M, Gentile V, Maiuri L, Mancini E, Porta R, Raia V. Amines protect in vitro the celiac small intestine from the damaging activity of gliadin peptides. *Gastroenterology* 1990; 99(6): 1668-1674.
9. Orlando A, Linsalata M, Notarnicola M, Tutino V, Russo F. Lactobacillus GG restoration of the gliadin induced epithelial barrier disruption: the role of cellular polyamines. *BMC Microbiol* 2014; 14: 19.
10. Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 200; 121(3): 580-591.
11. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J PediatrGastroenterolNutr* 2000; 31(4): 453-457.
12. Lindfors K, Blomqvist T, Juuti-Uusitalo K, Stenman S, Venäläinen J, Mäki M, Kaukinen K. Live probiotic Bifidobacterium lactis bacteria inhibit the toxic effects induced by wheat gliadin in epithelial cell culture. *ClinExpImmunol* 2008; 152(3): 552-558.
13. Marteau PR1, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J ClinNutr* 2001; 73(2): 430S-436S.
14. Orlando A, Messa C, Linsalata M, Cavallini A, Russo F. Effects of Lactobacillus rhamnosus GG on proliferation and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric and DLD-1 colonic cancer cell lines. *ImmunopharmacolImmunotoxicol* 2009; 31(1): 108-116.
15. Orlando A, Refolo MG, Messa C, Amati L, Lavermicocca P, Guerra V, Russo F. Antiproliferative and proapoptotic effects of viable or heat-killed Lactobacillus paracasei IMPC2.1 and Lactobacillus rhamnosus GG in HGC-27 gastric and DLD-1 colon cell lines. *Nutr Cancer* 2012; 64(7): 1103-1111.
16. Laparra JM, Olivares M, Gallina O, Sanz Y. Bifidobacterium longum CECT 7347 Modulates Immune Responses in a Gliadin-Induced Enteropathy Animal Model. *PlosOne* 2012; 7(2): e30744.

Obiettivi del progetto

Obiettivo primario: valutare *in vitro* ed *in vivo*, rispettivamente, su una linea cellulare di adenocarcinoma del colon (Caco-2) e su campioni di tessuto intestinale provenienti da ratti Wistar sensibilizzati con somministrazione di gliadina, la capacità del ceppo probiotico L.GG di proteggere l'integrità della barriera epiteliale intestinale in seguito al danno indotto dalla gliadina, attraverso la modulazione dell'espressione non solo delle principali proteine delle tight junctions, ma anche di quelle appartenenti alle adherens junctions.

Obiettivo secondario: valutare il ruolo esplicato dalle poliammine cellulari sull'attività dell'L.GG.

Attività svolta

Il progetto ha previsto una prima fase sperimentale *in vitro*. Su cellule Caco-2, trattate con un digerito gliadinico, il PTG (peptic-tryptic digested gliadin), da solo o in combinazione con l'L.GG, è stata valutata l'espressione genica delle principali proteine delle tight junctions (ZO-1, occludina, claudina-1) e delle adherens junctions (E-caderina, α - e β -catenina). Sulla stessa linea cellulare è stato valutato il ruolo delle poliammine sull'attività protettiva dell'epitelio intestinale dimostrata dall'L.GG, privando le cellule del contenuto in poliammine attraverso il trattamento delle stesse col DFMO (inibitore della sintesi delle poliammine) e analizzando la reversione di tale effetto dopo

l'aggiunta di spermidina. Inoltre, è stato valutato il metabolismo cellulare delle poliammine in seguito a trattamento delle cellule con PTG da solo o in combinazione con L.GG.

La seconda fase sperimentale in vivo, ha previsto l'uso di ratti Wistar neonati, nutriti sin dalla nascita e fino a 10 giorni, con una dieta a base di latte contenente 19g di proteine, 34g di grassi, 75g di carboidrati secondo quanto riportato da Laparra et al nel 2012 [16].

In particolare, il terzo giorno di vita, i cuccioli di ratto sono stati suddivisi in cinque gruppi che differivano nel tipo di trattamento:

Il gruppo 1 non ha ricevuto alcun tipo di trattamento, rappresentando il gruppo controllo.

Al gruppo 2 è stata somministrata per via orale, previa sensibilizzazione con IFN- γ , una singola dose di PTG pari a 50 μ g/die, per un periodo di dieci giorni, seguita da una dose doppia di PTG prima del sacrificio.

Al gruppo 3 è stato somministrato l'L.GG alla concentrazione di 1×10^9 CFU/die, per un periodo di dieci giorni.

Al gruppo 4 è stato somministrato, previa sensibilizzazione con IFN- γ , sia il PTG che l'L.GG in un'unica soluzione, per un periodo di dieci giorni.

Al gruppo 5 è stata somministrata, previa sensibilizzazione con IFN- γ , una singola dose di PTG pari a 50 μ g/die, per un periodo di dieci giorni, seguito dal trattamento con l'L.GG (1×10^9 CFU/die) per ulteriori dieci giorni.

Tutti gli animali sono stati sacrificati mediante overdose di anestetico. Il tratto di piccolo intestino interessato è stato prelevato, lavato in soluzione salina fredda e diviso in aliquote. Ad ogni sacrificio sono stati prelevati campioni di tessuto duodenale che sono stati congelati a -80°C per le successive analisi di tipo molecolare mentre una corrispondente aliquota di tessuto è stata destinata agli studi istologici per la determinazione del danno indotto dalla gliadina.

Risultati conseguiti

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dagli esperimenti *in vitro*, il PTG si è dimostrato in grado di alterare significativamente la permeabilità paracellulare, valutata attraverso la misura della resistenza elettrica trans epiteliale (TER) (Fig. 1) e il rilascio di zonulina (Fig. 2).

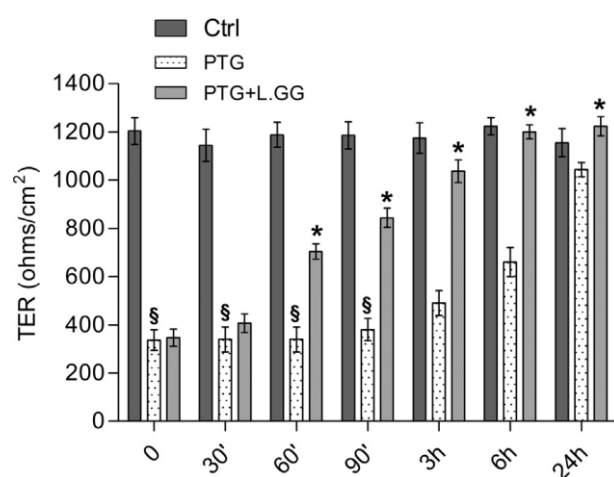


Fig. 1. TER measurements in Caco-2 monolayers exposed for different interval times (ranging from 0 to 24 h) to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10^8 CFU/mL). All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM). Data analyzed by Mann Whitney Test. (\$) $p < 0.05$ PTG treated cells compared to control cells at each time of treatment. (*) $p < 0.05$ PTG + L.GG cells compared to PTG treated cells at each time of treatment.

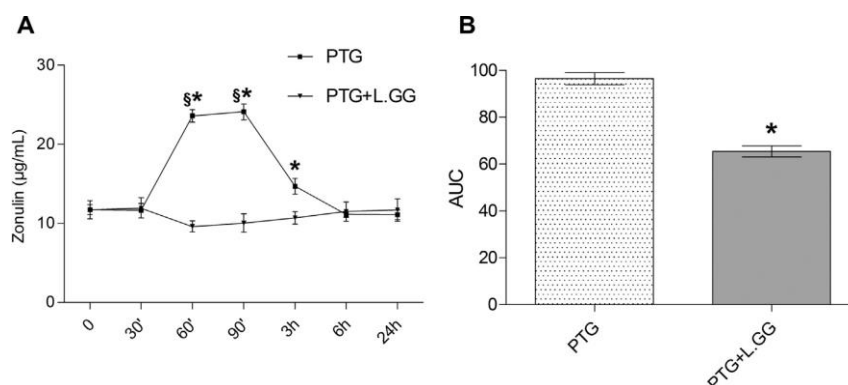


Fig. 2. Zonulin release and area under the curve (AUC) values in Caco-2 monolayers exposed for different interval times (ranging from 0 to 24 h) to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10^8 CFU/mL). Panel A. Zonulin release during the time of observations. All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM). (§) $p < 0.05$ PTG treated cells compared to cells at time zero. Data analyzed by Friedman Test. (*) $p < 0.05$ PTG + L.GG cells compared to PTG treated cells at each time of treatment. Data analyzed by Mann Whitney Test. Panel B. AUC values of zonulin release. All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM). (*) $p < 0.05$ PTG + L. GG cells compared to PTG treated cells. Data analyzed by Mann Whitney Test.

La co-somministrazione del ceppo probiotico L.GG con il PTG è risultata in grado di contrastare l'azione del PTG ripristinando in tal modo la funzione di barriera.

E' stata approfondita quindi, l'analisi del metabolismo delle poliammine cellulari. Le cellule sono state private del loro contenuto in poliammine pre-trattandole per 4 giorni con il DFMO. Tale trattamento ha portato a un netto decremento del contenuto in poliammine sia singole che totali. L'aggiunta della spermidina è stata in grado di revertare tale effetto. Il PTG, dopo 24h, ha determinato un aumento significativo nei livelli delle poliammine singole e totali (Tab. 1). La stessa azione è stata svolta dal probiotico da solo. La co-somministrazione di PTG e L.GG manteneva alte le concentrazioni delle suddette molecole.

Table 1
Polyamine profile in Caco-2 cells after 24 h of exposure to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10^8 CFU/mL). All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM) and were analyzed by Kruskal-Wallis analysis of variance and Dunn's Multiple Comparison Test. Polyamines are in nmol/mg protein.

	Putrescine	Spermidine	Spermine	Total polyamines
Ctrl	0.31 $\pm$ 0.02	8.27 $\pm$ 0.4	8.95 $\pm$ 0.4	17.62 $\pm$ 0.3
PTG	0.56 $\pm$ 0.03 [§]	14.25 $\pm$ 0.2 [§]	16.83 $\pm$ 0.5 [§]	31.8 $\pm$ 0.6 [§]
L.GG	0.36 $\pm$ 0.03	10.54 $\pm$ 0.3	12.03 $\pm$ 0.4	22.92 $\pm$ 0.9
PTG + L.GG	0.33 $\pm$ 0.04	10.53 $\pm$ 0.4	11.55 $\pm$ 0.6	22.61 $\pm$ 0.5

[§] $P < 0.05$ compared to untreated control cells.

E' stata poi valutata l'attività dell'ODC (Fig. 3) nonché il suo livello proteico (Fig. 4).

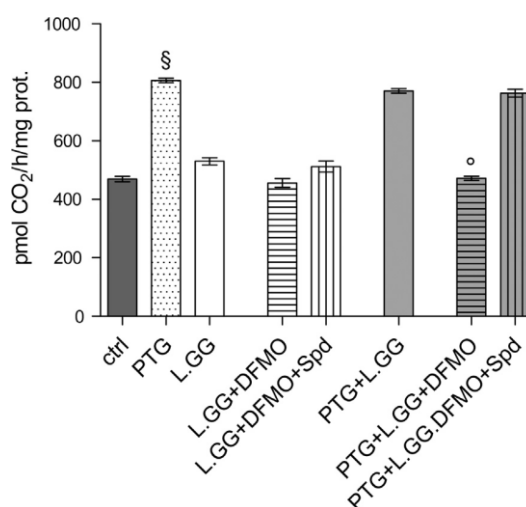


Fig. 3. Ornithine Decarboxylase (ODC) activity in Caco-2 cells exposed for 24 h to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10^8 CFU/mL), in presence of DFMO or DFMO plus spermidine (Spd). All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM). ODC

activity was expressed as pmol CO₂/h/mg of protein. Data were analyzed by Kruskal Wallis analysis of variance and Dunn's Multiple Comparison Test. (§) $p < 0.05$ compared to untreated control cells. (°) $p < 0.05$ compared to PTG + L.GG treated cells.

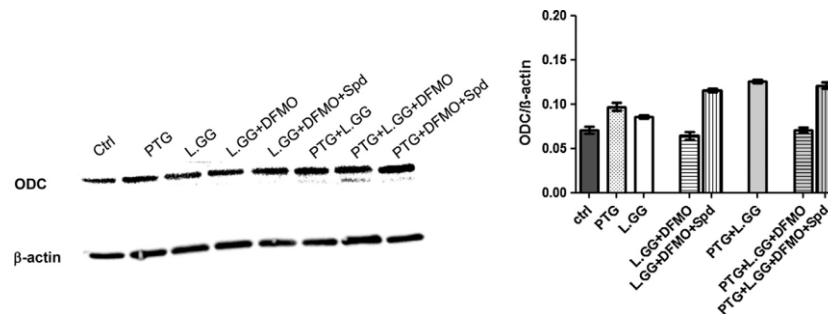


Fig. 4. Western Blot Analysis of ODC in Caco-2 cells exposed for 24 h to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10⁸ CFU/mL), in presence of DFMO or DFMO plus spermidine (Spd). Immunoreactive bands were quantified using Quantity One Programme. The diagram shows quantification of the intensity of bands, calibrated to the intensity of the β-actin band. All data represent the results of three different experiments (mean ± SEM). Data were analyzed by Kruskal Wallis analysis of variance and Dunn's Multiple Comparison Test.

E' stata valutata quindi l'espressione, sia a livello di mRNA(Fig. 5) che di proteina (Fig. 6), di ZO-1, occludina, claudina-1, α e β catenina ed E-caderina in seguito alla somministrazione di PTG da solo o in combinazione con l'L.GG, in presenza o in assenza di poliammine.

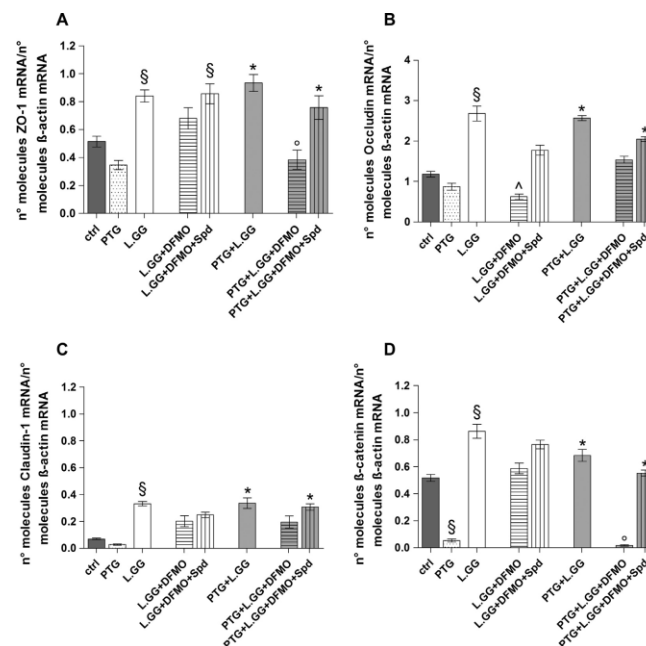


Fig. 5. ZO-1, Occludin, Claudin-1, and b-catenin mRNA levels in Caco-2 cells exposed for 24 h to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10⁸ CFU/mL), in presence of DFMO or DFMO plus spermidine (Spd). All data represent the results of three different experiments (mean ± SEM). Data were expressed as n° molecules of mRNA target gene / n° molecules of mRNA β-actin gene. Data were analyzed by Kruskal Wallis analysis of variance and Dunn's Multiple Comparison Test. (§) $p < 0.05$ compared to untreated control cells. (*) $p < 0.05$ compared to PTG treated cells. (^) $p < 0.05$ compared to L.GG treated cells. (°) $p < 0.05$ compared to PTG + L.GG treated cells.

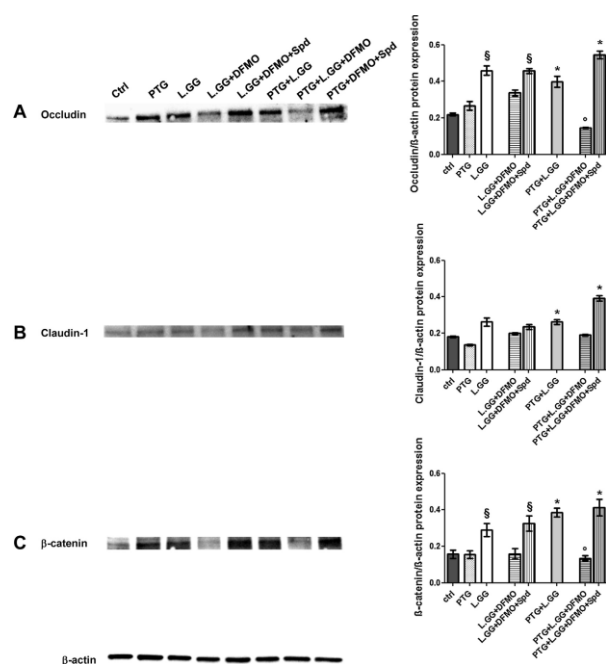


Fig. 6. Western Blot Analysis of Occludin, Claudin-1, and β -catenin in Caco-2 cells exposed for 24 h to PTG (1 mg/mL) alone or in combination with L.GG (10^8 CFU/mL), in presence of DFMO or DFMO plus spermidine (Spd). Immunoreactive bands were quantified using Quantity One Programme. The diagrams show quantification of the intensity of bands, calibrated to the intensity of the β -actin band. All data represent the results of three different experiments (mean $\pm$ SEM). Data were analyzed by Kruskal Wallis analysis of variance and Dunn's Multiple Comparison Test. (§) $p < 0.05$ compared to untreated control cells. (*) $p < 0.05$ compared to PTG treated cells. (°) $p < 0.05$ compared to PTG + L.GG treated cells.

Il PTG è risultato in grado di diminuire, anche se non sempre in maniera significativa, l'espressione di ZO-1, occludina, claudina-1, β -catenina (Fig. 5). L'L.GG da solo ha causato invece un aumento significativo dell'espressione di tale proteine. La co-somministrazione di PTG e L.GG manteneva alto il livello di espressione delle suddette proteine. Di particolare interesse, la presenza delle poliammine si è dimostrata un requisito essenziale nell'azione svolta dall'L.GG.

Per quanto riguarda la sperimentazione animale, come probiotico è stato utilizzato lo stesso ceppo batterico della sperimentazione *in vitro*, l'L.GG, mentre come modello animale di enteropatia indotta dal glutine è stato utilizzato il ratto Wistar.

Dai campioni di tessuto intestinale congelati si è proceduti all'estrazione sia dell'RNA che delle proteine per la valutazione sia dei livelli di mRNA che delle proteine facenti parte delle tight junctions e delle adherensjunctions. Parallelamente è stato valutato il metabolismo delle poliammine. Al momento è in corso l'analisi dei risultati ottenuti per la successiva stesura del lavoro scientifico che, molto probabilmente, vedrà il completamento nel primo semestre del corrente anno.

Progetto: “Studio della funzionalità e dei fattori regolanti la barriera gastro-intestinale nella malattia celiaca mediante impiego di metodiche non invasive: confronto con la Glutensensitivity e l'IBS-d” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dr. Michele Linsalata

Partecipanti: Dott. Russo Francesco, Dott. Riezzo Giuseppe, Dott.ssa Clemente Caterina, Dott.ssa D'Attoma Benedetta, Dott.ssa Orlando Antonella (Contrattista), Dott.ssa Martulli Manuela (Borsista)

Introduzione

Per la corretta prevenzione, diagnosi e cura delle patologie gastrointestinali (GI) è fondamentale comprendere i meccanismi che sottendono all'integrità dell'epitelio GI. Accanto alla più nota

funzione di assorbimento di nutrienti e di liquidi, l'epitelio GI ha anche l'importante funzione di barriera bloccante l'ingresso di sostanze potenzialmente allergizzanti, tossiche o carcinogeniche [1]. L'integrità dell'epitelio intestinale è quindi essenziale per il mantenimento dello stato di salute e la prevenzione di danni tissutali, causa potenziale di numerose patologie.

Recentemente una particolare attenzione è stata rivolta alle alterazioni della permeabilità intestinale (PI) conosciuta con il termine di "leakinggutsyndrome" che è oggi considerata una delle cause all'origine di molte patologie, sia intestinali che extraintestinali [2]. La PI è strettamente correlata alla funzione di barriera mucosale e si riferisce alla proprietà dell'epitelio di lasciare passare molecole di diversa grandezza forma e carica mediante diffusione non mediata attraverso lo spazio transcellulare (endocitosi) e paracellulare (tight junctions, TJ). In alcuni stati di malattia, le TJ sono danneggiate da ulcerazioni o interruzioni fra le cellule, in altre situazioni, quali stati infiammatori a diversa intensità, la funzione delle TJ è gravemente alterata con conseguente incremento del trasporto paracellulare. D'altronde un'atrofia dei villi intestinali o danni a livello cellulare determinano una minore superficie assorbente e quindi un minore assorbimento transcellulare. Alcune patologie sono spiccatamente caratterizzate da alterazioni di uno o entrambi i meccanismi di diffusione, con conseguente incremento del trasporto di nutrienti e antigeni [3].

La malattia celiaca (MC) è una patologia cronica autoimmune indotta da proteine del glutine presenti nel frumento, orzo e segale; si presenta come una condizione infiammatoria del piccolo intestino, frequentemente accompagnata da manifestazioni sistemiche. La risposta innescata dalla condizione infiammatoria nei pazienti celiaci consiste di alterazioni locali a livello delle cripte degli enterociti e alterazioni sistemiche diffuse. Studi in vitro hanno evidenziato come la gliadina determini un riarrangiamento del citoscheletro attraverso il pathway della zonulina e l'alterazione delle TJ. La malattia celiaca è pertanto caratterizzata da modificazioni strutturali e funzionali dell'epitelio intestinale e quindi da un'alterazione della permeabilità intestinale [4].

Oltre alla MC ci sono casi di reazioni al glutine in cui non sono coinvolti meccanismi autoimmunitari. In alcuni soggetti non celiaci e non allergici è stata riportata la presenza di una forma di "intolleranza al glutine" (GlutenSensitivity, GS) che si manifesta sia con sintomi GI aspecifici che extraintestinali [5]. Tale disturbo presenterebbe delle caratteristiche patogenetiche differenti dalla malattia celiaca, non essendo una patologia autoimmune, senza un tipico assetto genetico o stimate sierologiche/istologiche utili per la diagnosi. Attualmente, la diagnosi di GS si basa solo sulla esclusione della malattia celiaca o di altre patologie e sulla risposta alla unica terapia attualmente proponibile ossia la dieta priva di glutine. Pazienti con sensibilità al glutine non sono in grado di tollerare il glutine e sviluppano reazioni avverse quando mangiano il glutine che generalmente non portano a danni a livello intestinale. Mentre i sintomi GI in pazienti GS possono somigliare a quelli associati con malattia celiaca, il quadro clinico è meno severo e non è accompagnato dalla presenza di autoanticorpi contro transglutaminasi [6,7].

Lo spettro di sintomi GI della malattia celiaca (diarrea, gonfiore e dolore addominale) inoltre, spesso si sovrappone a quelli di una variante della sindrome di intestino irritabile (IBS), definita appunto IBS variante diarroica (IBS-d). Anche in questo caso, l'assenza di reali markers specifici rappresenta una notevole difficoltà nella diagnosi e nella gestione di questa malattia. I meccanismi alla base di tale patologia non sono molto chiari, ma un ruolo importante sembra essere svolto oltre che dall'infiammazione e dalle alterazioni immunologiche anche da cambiamenti nella permeabilità intestinale [8].

Recenti evidenze sperimentali, sia in vivo sia in vitro, hanno dimostrato come la funzione di barriera intestinale e la produzione delle proteine delle TJ possono essere influenzate e regolate da

fattori intra ed extracellulari, quali differenti peptidi coinvolti nella regolazione della permeabilità, la flogosi minima, ma anche alterazioni dell'ambiente endoluminale (come ad es. le variazioni del microbiota e/o dei loro metaboliti).

Per quanto riguarda il ruolo dei peptidi intestinali nella regolazione della permeabilità intestinale, quello maggiormente studiato è la zonulina. La zonulina, è un peptide gastrointestinale in grado di modulare la barriera mucosale intervenendo e disarticolando le TJ intercellulari, alterazione propria della fase precoce dell'infiammazione intestinale. Questa proteina è coinvolta anche nell'immunità innata dell'intestino e, quando deregolata in individui geneticamente predisposti, sembra svolgere un ruolo chiave nella patogenesi delle malattie autoimmuni come la celiachia e il diabete. In pazienti con diabete di tipo 1 e nei loro parenti è stato dimostrato che i livelli di zonulina sierica correlano con l'entità della compromissione della barriera mucosale [9].

Dati in letteratura evidenziano il coinvolgimento di altri peptidi GI quali grelina e obestatina nella patogenesi delle suddette malattie. La grelina è coinvolta nel controllo della barriera mucosale ed è considerata un agente protettivo della mucosa intestinale. Inoltre, il gene che codifica per la grelina mostra numerosi polimorfismi di singolo nucleotide che sembrano modulare il rischio di numerose patologie infiammatorie e neoplastiche. La obestatina è un ormone derivante dalla preprogreline e sembra reprimere l'assunzione di cibo. I livelli di grelina così come il rapporto obestatina/grelina sono stati proposti come markers di attività in pazienti con colite ulcerosa. Tuttavia non ci sono dati in letteratura circa il ruolo di tali ormoni nella patogenesi della malattia celiaca e dell'IBS né, tantomeno, ci sono dati di eventuali relazioni tra i livelli circolanti di tali ormoni e le alterazioni della permeabilità intestinale che caratterizzano tali patologie.

Alterazioni nella funzione di barriera intestinale sono considerate un fattore chiave nello sviluppo e progressione dell'infiammazione intestinale e quindi si pensa giochino un ruolo sia nella patogenesi sia nello sviluppo di numerose malattie intestinali caratterizzate da peculiari quadri flogistici.

Nonostante chiare differenze nell'eziologia e nel trattamento, tali patologie hanno un quadro sintomatologico molto simile; valutare, pertanto, la permeabilità GI e tutti i fattori in essa coinvolti può avere ripercussioni sostanziali per migliorare le nostre conoscenze sulla fisiopatologia di tali malattie da trasferire poi nella pratica clinica quotidiana. E' importante essere in grado di caratterizzare in modo più completo la permeabilità lungo l'intero tratto gastrointestinale al fine di ottenere quante più informazioni per porre diagnosi e per meglio identificare strategie mirate d'intervento.

La permeabilità gastrointestinale può essere valutata "*in vivo*", con metodi non invasivi, attraverso la misura dell'escrezione urinaria di "sostanze – test" somministrate al paziente per via orale. Tali metodi utilizzano sostanze incapaci, in condizioni d'integrità, di superare la barriera intestinale. Sono molecole atossiche, idrosolubili e, normalmente, non assorbibili, non metabolizzabili né degradabili dalla flora batterica intestinale e, se assorbite, sono completamente eliminate per via renale (la qual cosa ne permette il dosaggio urinario). Gli zuccheri sono le molecole più utilizzate per i test di permeabilità gastrointestinale e ne rappresentano fedelmente la sua eventuale integrità [10].

Attraverso un'accurata combinazione di zuccheri, la permeabilità dell'epitelio può essere valutata selettivamente per tutto il tratto gastrointestinale. Ad esempio, il saccarosio trova impiego come marcatore di permeabilità a livello gastroduodenale, poiché è metabolizzato una volta superato il duodeno. Il test di permeabilità a due zuccheri (disaccaride/monossacaride) è invece il più largamente usato per valutare la permeabilità del tenue, in quanto i due zuccheri sono poi metabolizzati dalla flora batterica del colon. Il monossacaride di dimensioni minori (il mannitolo)

attraversa la mucosa per via transcellulare mediante i pori idrofilici degli enterociti mentre il dissaccaride (il lattulosio), più grande, può superare la barriera intestinale attraverso le giunzioni intercellulari. Il rapporto di permeazione fra molecole “grandi” e “piccole” consente una migliore discriminazione clinica della patologia, rispetto all’uso di un marker singolo. Inoltre il rapporto d’escrezione Lat/Man elimina le interferenze di fattori pre e postmucosali (svuotamento gastrico, transito intestinale, clearance renale), che condizionano in termini uguali entrambi gli zuccheri utilizzati.

Recentemente un altro zucchero, il sucralosio, usato come dolcificante, è stato introdotto come probe per valutare la permeabilità intestinale. Come il lattulosio, il sucralosio può essere assorbito passivamente attraverso la mucosa intestinale tramite la via paracellulare ed è secreto nelle urine. Poiché il sucralosio, che ha una massa molecolare simile a quella del lattulosio, ha una limitata capacità di passare attraverso la mucosa intestinale normale e non è metabolizzato dai batteri del colon, la sua secrezione urinaria può essere utilizzata per stimare la permeabilità di tale tratto intestinale [11].

L’alterazione della PI spesso precede le manifestazioni cliniche della patologia e tali tests hanno dimostrato una certa utilità nelle procedure di screening, diagnosi e risposta al trattamento come anche nel follow-up. La perdita dell’integrità della barriera intestinale può essere studiata anche valutando il danno epiteliale cellulare o la perdita di funzionalità delle TJ.

Le I-FABP (intestinal-fatty acid bindingproteins) sono proteine citosoliche presenti a livello epiteliale del tenue e del colon. La loro funzione consiste nel trasposto degli acidi grassi dalla membrana apicale degli enterociti al reticolo endoplasmatico, dove avviene la biosintesi dei complessi lipidici. Poiché I-FABP sono piccole proteine citosoliche solubili in acqua, esse possono essere facilmente rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell’integrità di membrana e sono rapidamente eliminate con le urine. Pertanto le I-FABP possono essere dosate sia nel plasma che nelle urine usando un test ELISA. Diversi studi hanno suggerito l’impiego delle FABP come markers non invasivi di danno precoce a livello cellulare dell’epitelio intestinale [12].

Allo stesso modo, la Diaminossidasi (DAO), un enzima citoplasmatico con un’elevata attività nello strato superficiale dei villi intestinali, è considerato un marker di integrità dell’epitelio intestinale. I livelli sierici di tale enzima aumentano in caso di danno e perdita della funzione di barriera intestinale. Tuttavia non ci sono studi che valutano i livelli sierici di questo biomarker in pazienti con celiachia e IBS-d.

In conclusione, gli studi sull’integrità della barriera intestinale sono importanti per capire il ruolo della permeabilità gastrointestinale in alcune condizioni patologiche quali la celiachia, la glutensensitivity e l’IBS. Inoltre, valutare eventuali relazioni esistenti tra alterazioni della permeabilità, l’infiammazione della mucosa intestinale e il ruolo svolto dagli ormoni GI può aggiungere ulteriori informazioni alla conoscenza dei processi fisiopatologici di tali patologie.

Referenze citate

1. Scaldaferri F, Pizzoferrato M, Gerardi V et al. The gut barrier. New acquisitions and therapeutic approaches. *J ClinGastroenterol* 2012;46:S12-S17.
2. Arrieta MC, Bistriz L, Meddings JB. Alterations in intestinal permeability. *Gut* 2006; 55:1512-1520
3. Camilleri M, Madsen K, Spiller R et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *NeurogastroenterolMotil* 2012; 24:503-512.

4. Gujral N, Freeman HJ, Thomson AB. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol* 2012;18:6036–59.
5. Wahnschaffe U, Ullrich R, Riecken EO et al. Celiac disease-like abnormalities in a subgroup of patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2001; 121: 1329-38.
6. Anderson LA, McMillan SA, Watson RG et al. Malignancy and mortality in a population-based cohort of patients with celiac disease or “gluten sensitivity” *World J Gastroenterol* 2007; 13:146-151.
7. Sapone A, Lammers KM, Casolaro V et al. Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine* 2011; 9:23
8. Camilleri M, Lasch K, Zhou W. Irritable bowel syndrome: methods, mechanisms, and pathophysiology. The confluence of increased permeability, inflammation, and pain in irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012;303:G775-G785
9. Sapone A, de Magistris L, Pietzak M, et al. Zonulin upregulation is associated with increased gut permeability in subjects with type 1 diabetes and their relatives. *Diabetes* 2006;55:1443-1449.
10. Van Wijck K, Verlinden TJM, van Eijk HMH et al. Novel multi-sugar assay for site-specific gastrointestinal permeability analysis: a randomized controlled crossover trial. *Clinical Nutrition* 2013; 32(2): 245-51
11. Del Valle- Pinero AY, Van Deventer HE, Fourie NH. Gastrointestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome assessed using a four probe permeability solution. *ClinChimActa* 2013; 418:97-101
12. Grootjans J, Thuijls G, Verdam F et al. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J Gastrointest Surg* 2010; 2(3): 61-69.
13. Rigsbee L, Agans R, Shankar V et al. Quantitative profiling of gut microbiota of children with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2012;107:1740–51.
14. Schmulson M, Lee OY, Chang L et al. Symptom differences in moderate to severe IBS patients based on predominant bowel habit. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2929–35
15. Antonioli DA. Celiac disease: a progress report. *Mod Pathol* 2003;16:342–6.
16. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD et al. Functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480–91.
17. Verdu EF, Armstrong D, Murray JA. Between celiac disease and irritable bowel syndrome: the "no man's land" of gluten sensitivity. *Am J Gastroenterol* 2009;104:1587–94.

Obiettivi

Primario: valutare, attraverso l'utilizzo di tests non invasivi, l'integrità dell'epitelio lungo tutto il tratto gastrointestinale in patologie con simile profilo sintomatologico e differente eziologia quali celiachia, GS e IBS-d.

Secondario: verificare l'associazione tra alterazioni della permeabilità gastrointestinale, peptidi GI coinvolti nella sua regolazione (Zonulina, grelina, obestatina) e markers di danno epiteliale cellulare (I-FABP, DAO) in tali patologie.

Attività Svolta

Pazienti

In questo studio osservazionale caso-controllo sono stati reclutati 20 soggetti controllo, 32 pazienti celiaci all'atto della diagnosi, 16 dei quali sono stati rivalutati dopo un anno di dieta priva di glutine, 37 soggetti con IBS-d, e 10 soggetti sensibili al glutine. Tali pazienti sono stati reclutati nell'ambito della popolazione ambulatoriale afferente all'“Ambulatorio integrato di celiachia e patologie funzionali GI” dell'I.R.C.C.S. “Saverio de Bellis”

Gruppo pazienti con malattia celiaca

Criteri di inclusione: età 18–64 anni al momento dello screening, profilo sintomatologico conforme al pattern IBS-d [13]; sintomi presenti da almeno due settimane, uno score medio minimo di 3.0 sulla scala Likert a 7 punti del questionario Gastrointestinal Symptom Rating Scale-IBS; essere a dieta libera. Il pattern delle feci è stato categorizzato come riportato da Schmulson et al. [14].

Criteri di esclusione sono stati: cause secondarie di atrofia intestinale, disordini metabolici ed endocrini, patologie epatiche, renali o cardiovascolari, stipsi, febbre, precedenti interventi chirurgici addominali, patologie oncologiche, gravidanza, giardiasi, intolleranza al lattosio. In aggiunta, i pazienti non avevano assunto farmaci per il trattamento dell'IBS nelle due settimane precedenti lo studio, antibiotici e/o probiotici, altri farmaci conosciuti come in grado di provocare dolore addominale. Le pazienti femmine sono state valutate durante la fase follicolare del ciclo mestruale.

I pazienti celiaci sono stati diagnosticati sulla base della positività agli anticorpi anti Endomisio (EMA) e anti transglutaminasi (tTG). I casi con positività ai tests sierologici, i pazienti sono stati sottoposti a EGDS e successivo esame istologico su biopsie duodenali per convalidare la diagnosi. I pazienti sono stati considerati celiaci se confermati istologicamente sulla base dei criteri di Marsh–Oberhuber (stadio 3b – 3c) [15]. Dopo la diagnosi, i pazienti celiaci sono stati istruiti a seguire una specifica dieta priva di glutine (GFD) e sono stati rivalutati dopo almeno 12 mesi dall'inizio della stessa.

Gruppo pazienti con colon irritabile variante diarroica (IBS-d)

I pazienti con colon irritabile variante diarroica ma non sensibili al glutine sono stati identificati in accordo alla definizione di IBS-d proposta da Longstreth et al. [16]. Altri criteri sono stati: disponibilità di almeno uno studio per immagini dell'intestino negli ultimi 5 anni (gastroscopia, colonoscopia, sigmoidoscopia, ecografia addominale, clisma opaco); età 18–64 anni al momento dello screening. Criteri di esclusione: patologie neoplastiche in corso, interventi chirurgici addominali maggiori; presenza di patologie organiche concomitanti quali intolleranza al lattosio e al glutine; malattie internistiche o psichiatriche; sintomi di allarme (sanguinamento rettale, perdita di peso, altro); storia familiare di ulcera peptica o IBD; dati di laboratorio alterati o alterata funzione tiroidea. Ai soggetti arruolati è stato chiesto al tempo “0” di rispondere oltre al GSRS, a dei questionari riguardanti la qualità di vita e la somatizzazione (SF36 e SCL90) e la compilazione di alcune scale VAS 100 mm (cut off 40) riguardanti la severità della sintomatologia di ingresso (borborigmi, dolore, diarrea, flatulenza).

Gruppo pazienti con sensibilità al glutine

Poiché la diarrea da sensibilità al glutine (GS) è un'entità clinica riscontrabile nei pazienti IBS, il gruppo dei pazienti GS è stato distinto da quello con IBS-d dopo essere stati sottoposti ad uno

specifico iter diagnostico con i criteri di inclusione/esclusione mutuati dal trial clinico multicentrico denominato “*Glutox*”, del quale il presente protocollo di studio risulta ancillare.

Sono stati considerati e sottoposti ad esami di ingresso per definire la loro condizione, pazienti con disturbi funzionali GI, IBS (definita secondo i criteri di Roma III) . Oltre ai criteri di esclusione menzionati per il gruppo IBS, sono stati considerati motivo di esclusione dallo studio patologie reazioni allergiche maggiori e/o allergie multiple; pazienti con positività delle transglutaminasi, RAST o assenza di IgA.

I soggetti la cui storia clinica è suggestiva di sensibilità al glutine sono stati istruiti riguardo una dieta priva di glutine che hanno seguito per 3 settimane. Alla fine di tale periodo i pazienti hanno compilato di nuovo i questionari SF36 e scale VAS; coloro che presentavano miglioramento con la dieta priva di glutine sono stati considerati pazienti GS. Ulteriori parametri rafforzativi per probabile diagnosi di GS sono stati la positività per anticorpi antigliadina e predisposizione alla celiaca (positività per aplotipi HLA-DQ2 o HLA-DQ8) [17].

Soggetti sani

Il gruppo controllo non ha sofferto di patologie metaboliche, endocrine o immunitarie, sindrome dispeptica o altre patologie GI. Non hanno assunto farmaci per terapie croniche. Informazioni sullo stato di salute e sulle abitudini dietetiche sono state ottenute durante una visita medica. Come criterio di inclusione gli anticorpi EMA e tTG sono risultati essere negativi. Inoltre i parametri metabolici (glicemia, HbA1c, profilo lipidico, peso corporeo, e pressione arteriosa) sono stati nei range di normalità.

Score sintomatologico e valutazioni multidimensionali

Per la valutazione dei sintomi GI è stato usato un questionario GSRS (Gastrointestinal Symptoms Rating Scale) a 7 punti (scala di Likert) per lo score della sintomatologia dispeptica. Il questionario è specifico per la sintomatologia delle malattie funzionali. Inoltre, sono stati somministrati questionari riguardanti rispettivamente la qualità di vita e la somatizzazione (SF36 e SCL90).

Dosaggi Biochimici

La determinazione dei diversi zuccheri (mannitolo, lattulosio e saccarosio) nelle urine è stata effettuata con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) e successiva rivelazione amperometrica pulsata (ICS 5000, Dionex, Sunnyvale, CA USA). Gli zuccheri sono stati separati su una colonna cromatografica a scambio ionico ed eluiti utilizzando una fase mobile di NaOH 50 mM con flusso di 1ml/min. I risultati sono stati espressi come percentuale della quantità degli zuccheri escreti nelle urine rispetto a quella somministrata.

I livelli sierici di zonulina, dell' I-FABP, della DAO nonché dei peptidi grelina e obestatina sono stati effettuati utilizzando metodiche ELISA disponibili in commercio.

Risultati Conseguiti

I risultati di questo studio hanno evidenziato alterazioni funzionali e strutturali che caratterizzano l'epitelio gastrointestinale in corso di malattia celiaca. I pazienti celiaci presentano sia un notevole incremento dei livelli urinari di lattulosio, indice di alterata permeabilità paracellulare (Fig.1 panel A), sia un decremento dei livelli urinari di mannitolo, indice di alterata permeabilità transcellulare (Fig.1 panel B); il conseguente rapporto Lat/Man, che rappresenta un attendibile marker di permeabilità di tutto l'intestino tenue, risulta essere significativamente più alto in tali pazienti

rispetto a quello ritrovato negli altri gruppi considerati (Fig.1 panel C). Tali risultati evidenziano un danno epiteliale e un'alterata permeabilità intestinale, inoltre è evidente come la dieta priva di glutine, seppur dopo solo un anno di somministrazione, sia in grado di ripristinare una funzionalità quasi normale della barriera intestinale.

Pazienti con sensibilità al glutine e pazienti IBS-d presentano, invece, valori di Lat, Man e conseguente rapporto Lat/Man, simili a quelli ritrovati nei soggetti controllo. Anche i livelli urinari di saccarosio (indice di alterata permeabilità gastroduodenale) risultano essere più alti nei pazienti celiaci rispetto a quelli ritrovati nei soggetti normali, nei pazienti sensibili al glutine e negli IBS-d (Fig. 1 panel D).

La MC pertanto, nonostante possa presentare un profilo sintomatologico sovrapponibile a quello di altri quadri nosologici, è caratterizzata da una evidente alterazione della permeabilità lungo tutto il tratto gastrointestinale e lo studio di tali modificazioni può fornire utili informazioni per una corretta diagnosi e per il management di tale patologia.

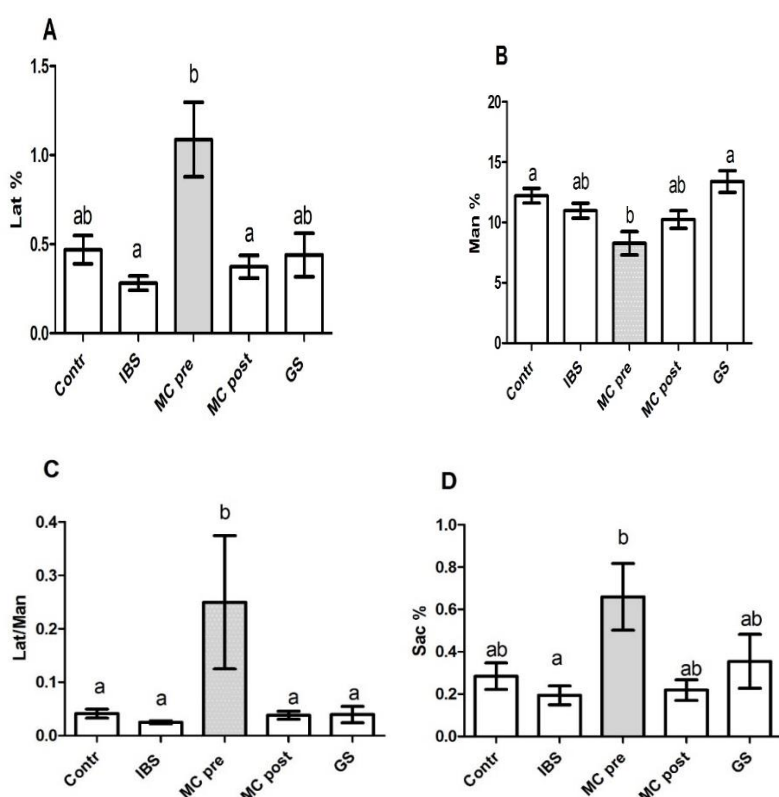


Fig.1 Permeabilità gastrointestinale in pazienti celiaci (MC). La permeabilità gastrointestinale è stata indagata valutando la % di escrezione urinaria, rispetto alla dose assunta, di Lattulosio (A), Mannitolo (B), il rapporto Lat/Man (C) e di saccarosio (D). Valori espressi come $M \pm SE$. Analisi della varianza con Dunn's post test. A lettere differenti corrispondono differenze significative ($p < 0.05$).

Inoltre, continuando la disamina dei risultati ottenuti da questo studio, i livelli di grelina e obestatina (peptidi che svolgono una importante azione nella patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali e che sembrano influenzare anche la permeabilità intestinale) sono risultati essere più alti nei pazienti celiaci rispetto ai livelli ritrovati nei soggetti normali e nei pazienti con IBS. La dieta priva di glutine induce una diminuzione soprattutto nei livelli di obestatina. Le figure sottostanti riportano le differenze nei livelli di obestatina e grelina e del rapporto obestatina/grelina

tra soggetti sani e pazienti con IBS o celiachia (Fig. 2) nonché nei pazienti celiaci prima e dopo un anno di dieta priva di glutine (Fig. 3).

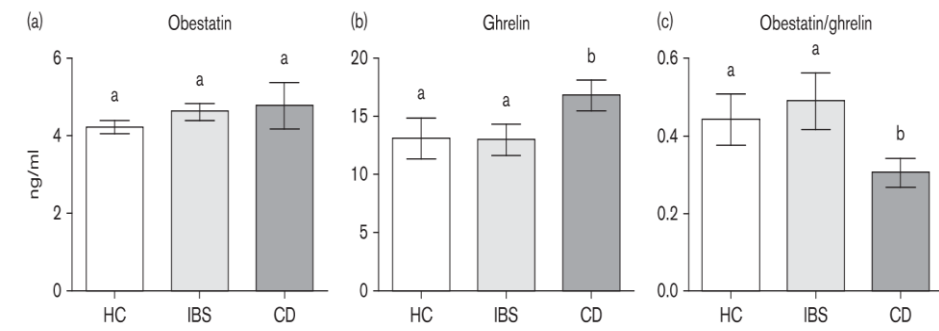


Fig. 2. The levels of obestatin (a), ghrelin (b) and the obestatin/ghrelin ratio (c) in healthy individuals (HC), patients with the diarrhea variant of irritable bowel syndrome (IBS-d), and celiac disease (CD) patients. Data are reported as mean $\pm$ SEM and analyzed using the Kruskal-Wallis test and Dunn's test. Columns not sharing a common superscript differ significantly ($P < 0.05$). HC, healthy control; IBS, irritable bowel syndrome.

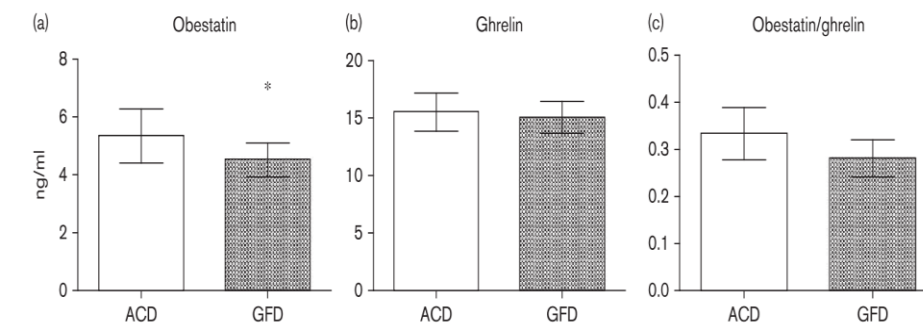


Fig. 3. The levels of obestatin (a), ghrelin (b) and the obestatin/ghrelin ratio (c) in patients with active celiac disease (ACD) and after 1 year of a gluten-free diet (GFD). Data are reported as mean $\pm$ SEM and analyzed using the Wilcoxon rank sum test for differences (* $P < 0.05$).

L'integrità della barriera intestinale può essere studiata valutando anche il danno epiteliale cellulare mediante quantificazione sierica di proteine quali le I-FABP (intestinal-fatty acid binding proteins) e la DAO (diamine oxidase). Queste proteine presenti a livello dell'epitelio intestinale, sono quindi rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana. Nel 2017 è stato terminato uno studio caso controllo volto a valutare e comparare, in pazienti Celiaci, IBS-d e in soggetti normali, l'associazione tra il profilo dei sintomi, i livelli urinari di saccarosio, lattulosio e mannitolo e i livelli sierici di I-FABP, DAO e zonulina. I dati hanno evidenziato un incremento significativo della permeabilità gastrointestinale e dei livelli sierici delle I-FABP, DAO e zonulina in pazienti celiaci rispetto e ai pz con IBS-d ai soggetti sani. Inoltre, i pazienti IBS-d con alterata permeabilità gastrointestinale hanno mostrato una funzione di barriera simile a quella dei pazienti con CD, suggerendo quindi l'esistenza di due distinti gruppi di pazienti IBS-d con caratteristiche patofisiologiche differenti. La tabella sottostante riporta i livelli urinari e sierici dei markers di funzione di barriera intestinale nei pazienti IBS-d con alterata permeabilità intestinale rispetto a quelli con permeabilità intestinale normale.

Tabella I. Markers urinari e circolanti di funzione di barriera intestinale in pazienti D-IBS(+) and D-IBS(-).

Parametri	D-IBS(+)	D-IBS(-)	p
% Ma	11.95±0.67	10.59±0.73	0.193
% La	0.67±0.07	0.19±0.02	< 0.0001
La/Ma	0.06±0.01	0.02±0.00	< 0.0001
% Su	0.42±0.08	0.11±0.02	0.0007
Zonulina (ng/ml)	78.50±8.31	68.52±5.80	0.452
I-FABP (ng/ml)	2.10±0.27	1.16±0.08	0.0008
DAO (ng/ml)	22.60±1.61	15.04±1.39	0.0003

Parametri urinari di permeabilità gastrointestinale in pazienti con variante diarroica di IBS (D-IBS) espressi come percentuale di lattulosio ingerito (%La), e mannitolo (%Ma) recuperato nelle urine; rapporto lattulosio/mannitolo (La/Ma) e saccarosio urinario (%Su). I-FABP = Intestinal fatty acid binding protein; DAO = diammino ossidasi. Dati espressi come Media±SEMe analizzati con Mann Whitney test.

Progetto: *“Valutazione dei livelli tissutali di anticorpi anti tTG in biopsie intestinali di pazienti con sintomi suggestivi di celiachia: focus su intolleranza al glutine e celiachia potenziale” (Termine del progetto: 31/12/2017)*

Responsabile: Dr. Giuseppe Riezzo

Partecipanti: Dott. Russo Franeco, Dott.ssa Clemente Caterina, Dott.ssa D’Attoma Benedetta, Dott.ssa Orlando Antonella (Contrattista), Dott.ssa Martulli Manuela (Borsista)

Introduzione

Il concetto di celiachia potenziale proviene dalla Consensus Conference di OSLO 2011 dove furono definite le differenti reazioni al glutine che includevano: le reazioni autoimmuni, ossia tutte le forme di celiachia; l’allergia al frumento; la *nonceliacglutensensitivity* (sensibilità al glutine non celiaca). La celiachia, definita come una reazione autoimmune al glutine, a sua volta suddivisa in “celiachia sintomatica” (suddivisa a sua volta in classica e non classica), “celiachia silente o asintomatica” e “celiachia potenziale”, caratterizzata da incremento dei livelli di marker sierologici per celiachia ma senza atrofia dei villi. Anticorpi anti-tTG su biopsie di mucosa intestinale sono stati individuati in pazienti con celiachia potenziale caratterizzati da sintomi correlati al glutine, positività per marcatori per celiachia e assenza di danno intestinale evidente. E’ peculiare il fatto che sia i sintomi sia gli anticorpi anti-tTG a livello mucosale scompaiano dopo dieta priva di glutine (GFD). La problematica relativa ai pazienti con “*nonceliacglutensensitivity*” o “*wheatsensitivity*” si è sviluppata notevolmente negli ultimi anni in considerazione di una evidente difficoltà nell’individuazione di marcatori per tale patologia, pertanto sarebbe interessante verificare la eventuale presenza di autoanticorpi nelle biopsie di questi pazienti che di solito sono inquadrati come sensibili al glutine sulla base della storia clinica e della risposta alla sottrazione e reintroduzione del glutine. Trattandosi di studio esplorativo, il calcolo della potenza dello studio, non è applicabile. Dopo una serie di difficoltà iniziali la collaborazione con i colleghi dell’endoscopia digestiva ha raggiunto la sua piena funzionalità grazie al supporto di un assistente sanitario borsista che ha svolto in maniera efficace la funzione di tramite tra i vari operatori coinvolti. Tale figura professionale, infatti, dopo adeguato training è stata in grado di supportare il

medico nella selezione del paziente, la compilazione del consenso informato, la somministrazione dei questionari sintomatologici la raccolta dei campioni biologici nonché il continuo aggiornamento del database pazienti.

Obiettivi del Progetto

Obiettivo primario: valutazione della presenza/assenza di anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) nella mucosa duodenale dei pazienti che, sulla scorta dell'esame endoscopico e istologico, saranno individuati come affetti da "celiachia potenziale" (definiti come pz. con positività ai marcatori della celiachia, ma senza danno istologico intestinale) e dei pazienti DQ2-DQ8 positivi con sintomatologia suggestiva di celiachia, ma con sierologia negativa.

Obiettivo secondario: follow-up dei pazienti con anticorpi anti-tTG nella mucosa duodenale per dimostrarne l'utilità come marcatore della fase iniziale di "intolleranza al glutine".

Attività svolta

A tutt'oggi sono entrati nello studio 78 soggetti sottoposti ad esofagogastroduodenoscopia (EGDS) per disturbi GI presso il Servizio di Endoscopia Digestiva del nostro Istituto. L'EGDS eseguita in questi pazienti ha permesso di escludere la presenza di celiachia conclamata. Nei casi dubbi è stata eseguito l'esame istologico di conferma. E' stata formulata diagnosi di celiachia potenziale in 11 pazienti, attualmente in follow-up presso l'ambulatorio di Celiachia e Patologie funzionali e sottoposti a regime con dieta priva di glutine, in quanto sintomatici. Questi pazienti saranno sottoposti a rivalutazione endoscopica/istologica per la conferma della diagnosi ad 1 anno dalla precedente formulazione diagnostica. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita medica con somministrazione di un questionario sintomatologico validato, il GSRS (Gastrointestinal Symptom Rating Scale). Durante l'indagine endoscopica, sono stati ottenuti campioni ematici e biopsie duodenali, necessarie per la valutazione istologica di routine, e per la coltivazione *in vitro* propedeutica al dosaggio degli anti-tTG nel terreno di coltura. In una fase successiva, il prelievo ematico consentirà il dosaggio dei marcatori della celiachia, seguito eventualmente da ulteriori indagini genetiche, nonché test laboratoristici atti alla valutazione metabolica, del profilo lipidomico e di diversi peptidi gastrointestinali.

Per completare il progetto prevediamo di estendere il reclutamento e arrivare quindi a 100 pazienti e completare i dosaggi ematochimici e tissutali nonché la valutazione dei risultati ottenuti. Pertanto riteniamo utile la proroga della scadenza del progetto a dicembre 2018 attestandone l'attualità della ricerca e la disponibilità economica del budget assegnato al predetto progetto in ordine alla quale ultima se ne attesta la sussistenza.

Progetto: *“Modulazione morfologica e funzionale della Colite Ulcerosa mediante l'utilizzo di sottopopolazioni cellulari TNF α -KO nel modello murino Winnie” (Termine del progetto: 31/12/2018)*

Responsabile: Dott.ssa Maria L. Caruso

Partecipanti: Dott. Macello Chieppa (Contrattista), Dott.ssa Elisabetta Cavalcanti (Contrattista)
(Le attività di ricerca dell'UOC sono descritte nella linea 1)

Introduzione

Il fine equilibrio tra tolleranza ed infiammazione presente a livello della mucosa intestinale risulta alterato nelle malattie infiammatorie intestinali (IBD), quali la malattia di Crohn (MC) e la colite

ulcerosa (CU) [5-7]. Nonostante il coinvolgimento fondamentale del sistema immunitario, la causa scatenante spesso non risiede in popolazioni cellulari di origine non ematopoietica [8-10]. E' stato spesso dimostrato che un difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali possa scatenare una cascata di eventi che termina con l'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario [16]. L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50µm [21]. Il muco è un elemento di separazione fondamentale tra le cellule epiteliali e il microbiota e rappresenta una barriera impenetrabile ai batteri commensali nella sua parte più vicina all'epitelio "*lower mucus*". Il maggiore componente dello strato interno del muco è Muc2. Lo studio del Dr. Eri dell'Università della Tasmania in Australia [22, 23] ha dimostrato come una mutazione missenso nel gene di Muc2 causi l'assenza dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale. L'aumento della permeabilità intestinale sembra essere uno dei fenomeni maggiormente legati all'attivazione del sistema immunitario intestinale in senso infiammatorio. Il ruolo del TNFα in questo fenomeno è ritenuto fondamentale, anche se ignoriamo ancora quali siano le cellule coinvolte nella produzione della prima onda di TNFα, quelle cioè ad attivare la cascata infiammatoria. Sebbene le DCs residenti nell'intestino siano rese incapaci di produrre infiammazione [15-17] dall'ambiente intestinale, una prolungata esposizione ad antigeni provenienti dal lumen intestinale può cambiare questo stato di attivazione [18,19]. Con questo studio proponiamo di studiare la cascata di eventi che porta all'infiammazione cronica dell'intestino. La collaborazione con il Dr. Eri ci ha permesso di ottenere i topi *Winnie* che verranno utilizzati come modello di infiammazione causata dalla mancanza di muco e dalla conseguente esposizione cronica ai batteri del lumen intestinale. Studieremo la risposta immunitaria nell'intestino dei topi *Winnie*, inoltre incroceremo i topi *Winnie* con topi KO correntemente in commercio. Utilizzeremo tecniche di chimerismo e di adoptive transfer per analizzare la produzione di TNFα da parte delle singole popolazioni cellulari. La nostra ipotesi è che l'assenza dello strato di muco favorisca la produzione di TNFα da parte delle cellule dell'intestino. Questa citochina determina il riarrangiamento delle giunzioni serrate tra le cellule epiteliali ed il conseguente aumento della permeabilità intestinale. Questo fenomeno causa l'aumento del numero di antigeni traslocati nella lamina propria e la conseguente attivazione in senso infiammatorio delle DCs. L'effetto finale di questa cascata di eventi è quello di favorire l'insorgenza di risposte adattative Th1/Th2/Th17. La possibilità di studiare un modello unico al mondo e di poterlo incrociare con linee murine KO nel gene del TNFα o del TNFαR ci permetterà di capire l'esatta sequenza di eventi che determina l'infiammazione intestinale cronica e poter quindi disegnare strategie di intervento più efficaci per i pazienti affetti da IBD.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo dello studio proposto è di determinare l'esatta sequenza di eventi che determina IBD andando a valutare il ruolo del TNFα nel processo di infiammazione cronica intestinale. Utilizzando modelli murini valuteremo morfologicamente lo score infiammatorio intestinale insieme a numerosi parametri immunologici.

Nel dettaglio :

- valuteremo e caratterizzeremo la colite ulcerosa dal punto di vista morfologico funzionale nei modelli murini creati: *Winnie*, *Winnie*- TNFα-KO, *Winnie*- TNFα-RKO, *Winnie*- RAG, *Winnie*- RAG-TNFα-KO, *Winnie*- RAG-TNFα-RKO

- valutazione del fenotipo dei vari attori cellulari e dei meccanismi molecolari dei mediatori responsabili dell'inflammatione cronica nelle IBD, che permetterà nuove opportunità di comprensione della patogenesi e di miglioramento delle attuali strategie terapeutiche
- valuteremo il ruolo del TNF α nello sviluppo di neoplasie del colon retto in soggetti geneticamente predisposti (*Apc^{Min}*) in presenza di inflammatione (*Winnie*).

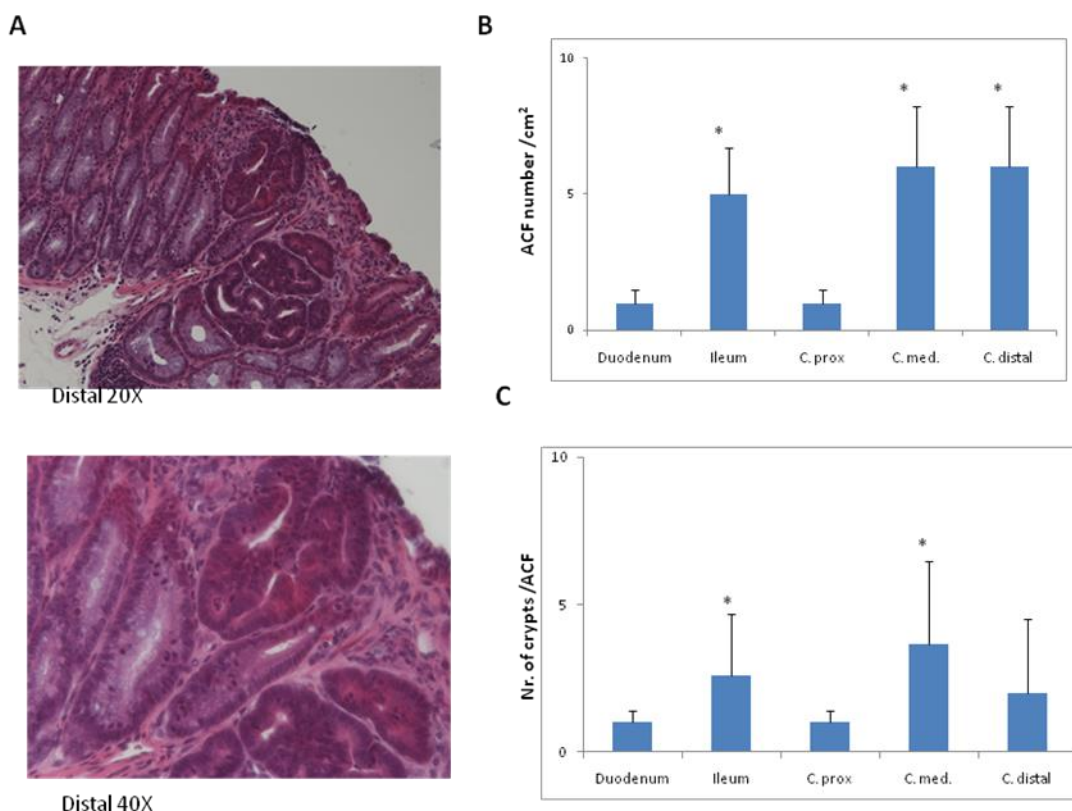
Analizzeremo l'eventuale aumento di patologie neoplastiche associate alla presenza o mancanza di T

Stato avanzamento del progetto

Nel secondo anno si è proceduto alla valutazione Istologica dei topi Winnie, Winnie-APCmin alle 5 settimane. Numerosi studi dimostrano che la cancerogenesi del colon segue un percorso di sviluppo caratterizzato da accumulazioni progressive di alterazioni genetiche e epigenetiche. Successivamente la particolare deregolamentazione del percorso molecolare porta a cambiamenti istopatologici che sono clinicamente evidenti come foci criptici aberranti (ACF). ACF sono considerate lesioni prenoplastiche in quanto condividono molte caratteristiche morfologiche e biochimiche con i tumori, tra cui un aumento nella proliferazione cellulare, maggiore espressione di antigeni associati ai tumori e displasia. Dal momento che Bird nel 1987 (1) ha descritto per la prima volta i fenomeni ACF come cluster di grosse cripte allargate meglio visualizzate con la colorazione di blu di metilene (MB) e possono essere facilmente rilevate con un microscopio a basso ingrandimento e sono i primi precursori del CRC. Successivamente ci sono stati numerosi studi incentrati su queste lesioni microscopicamente visibili che si verificano nei roditori esposti a carcinogeni. Poco dopo la descrizione negli animali, gli ACF sono stati identificati anche nella mucosa del colon umano, utilizzando la colorazione blu metilenico e il magnificatore (2-3). Le lesioni ACF sono costituite da "cluster" di cripte che sono anormalmente più leggere, colorate più intensamente e leggermente rilevate sulla superficie, costituite da cripte tra 1 e 110 (media 5 a 35). Lesioni con più di 110 cripte sono macroscopicamente riconoscibili e quindi definite come polipi. La densità di ACF è il numero di ACF per centimetro quadrato di superficie della mucosa, maggiore nelle malattie ad alto rischio di malignità come la poliposi adenomatosa familiare (FAP) e CRC, mentre è più bassa nei pazienti con malattie benigne del colon come la diverticolosi (5). Il meccanismo con cui aumenta la dimensione di un ACF sembra essere un processo di divisione di cripta, che inizia alla base della cripta e procede verso l'alto fino a quando vengono generate due cripte. Quindi il numero di cripte per ACF, chiamato anche "crypt multiplicity", è un parametro importante per valutare la progressione di ACF. È stato dimostrato che la crypt multiplicity è significativamente più bassa dal colon prossimale verso il colon distale, è opposta a quella della densità ACF ed è significativamente più grande quando associata con carcinoma o adenoma rispetto alle malattie non neoplastiche (6) ACF sono stati classificati come iperplastici (non displastici, spesso inclusi ACF iperplastici serrati) o displastici, basati principalmente sulle caratteristiche morfologiche (7). È stato inoltre dimostrato che solo gli ACF displastici evolvono in adenomi e adenocarcinomi (8) Negli ACF displastico possiamo avere displasia di alto o basso grado.

Nel presente studio abbiamo effettuato la caratterizzazione degli ACF come precursori putativi per il cancro, in un modello a breve termine (5 settimane) di carcinogenesi del colon. In particolare in sei APCminWinnie gli ACF sono stati osservati in tutti i tratti intestinali. Le cripte aberranti osservate in questi

modelli hanno distorte aperture luminescenti come fessure e un epitelio notevolmente addensato. Il numero di ACF è stato determinato e sono stati valutati i pattern di distribuzione lungo i tratti intestinali e la numerosità criptica. Agli ACF è stato assegnato uno score in base al numero, alla molteplicità di cripta ed al pattern di distribuzione lungo il piccolo intestino e colon. Nessun ACF displastico e non displastico è stato rilevato nei topi controllo (APC, Winnie e Wt topi). Il numero e la distribuzione (densità) di ACF nel piccolo intestino (duodeno e ileo) e colon sono illustrati in figura 1B-C. La maggior parte degli ACF è stata osservata nell'ileo ($p < 0,05$), nel colon mediale e distale ($p < 0,05$); questo a dimostrazione che gli ACF non sono lesioni casuali del modello APCminWinnie. L'ACF displastico è costituito da una o due cripte nel duodeno e colon prossimale, mentre nell'ileo e nel colon mediale e distale gli ACF presentano tre o più cripte ramificate. Il numero di cripte per ACF è aumentato significativamente nell'ileo ($p < 0,05$) e colon medio ($p < 0,05$) (Figura 1). In particolare nel colon mediale gli ACF presentavano cinque o più cripte ramificate rispetto al ileo e al colon distale dove ACF aveva due o più cripte (Fig.1A). Questa diversa progressione della morfologia ACF consistente in più cripte può corrispondere alla fase di avanzamento della cancerogenesi del colon. Di questi sei topi con ACF displastico, 5 mostravano displasia di basso grado e anche uno solo aveva displasia di grado elevato.



“Effetti metabolici delle terapie biologiche anti-TNF alfa in pazienti con IBD” (Termine del progetto: 31/12/2018).

Responsabile Dr. M. Correale;

Partecipanti M. Mastronardi (Gastroenterologia II), E. Stasi (Gastroenterologia II), M. Chieppa (Immunopatologia Sperimentale), P.A. Iacovazzi (Patologia Clinica), E. Lanzilotta (Patologia Clinica), P.L. Pesole (Patologia Clinica Borsista), T. Pinto (Patologia Clinica)

(Le attività del Laboratorio di Patologia Clinica sono descritte nella linea 1)

Introduzione

Le IBD (Inflammatory Bowel Disease) sono patologie multifattoriali croniche, che causano infiammazione di tutto o parte del tratto digestivo. Il Morbo di Crohn (CM) e la colite ulcerosa (UC) rappresentano le due principali IBD.

Nella maggior parte dei casi,

- il morbo di Crohn si manifesta inizialmente con diarrea e dolori addominali, localizzati specialmente nella parte inferiore destra dell'addome (fossa iliaca destra), che corrisponde al tratto dell'intestino in cui più frequentemente è localizzata la malattia. In questa sede è frequente la percezione di masse "a salsicciotto", irregolari e dolenti.
- La colite ulcerosa, invece, si manifesta quasi sempre con diarrea e presenza di sangue e muco nelle feci, ai quali spesso si associa una sensazione di incompleta evacuazione.

È comune per i pazienti affetti dalle IBD alternare periodi di remissione, in cui non sono presenti i sintomi a periodi di riacutizzazione, caratterizzati da stati di malessere generale come dimagrimento, stanchezza, inappetenza, febbre. Nel tempo, il morbo di Crohn può manifestare complicazioni, come restringimenti del lume del tratto intestinale interessato dall'infiammazione e, nei casi più estremi, occlusione intestinale; formazione di fistole o ascessi. Nel caso, invece, della colite ulcerosa possono derivare complicanze come dilatazione del colon e neoplasie.

Le IBD costituiscono un peso per i pazienti e per la società perché nel corso della vita portano ad un'aumentata morbidità e disabilità, tra cui una riduzione di quella che si definisce Health-related quality of life (HRQOL).

La patogenesi di entrambe queste patologie non è attualmente chiara, ma si pensa che si tratti di una combinazione di fattori genetici (mutazione del gene NOD2/CARD15), ambientali (fumo di sigaretta) ed un'alterata risposta immunitaria. L'ipotesi prevalente è quella di una risposta immunitaria inappropriata, che causa un danno alla mucosa intestinale e, di conseguenza, una cascata infiammatoria.

Poiché i sintomi delle IBD sono aspecifici, è necessario un corretto approccio diagnostico alla diarrea e/o al dolore addominale cronico da parte del gastroenterologo per operare una diagnosi differenziale con le IBS e definire in maniera corretta la strategia terapeutica. È ormai accertato che aggredire la malattia nella fase 'early' permette una maggiore probabilità di guarigione mucosale e remissione profonda.

Attualmente, tra gli esami strumentali che aiutano la corretta diagnosi delle IBD un ruolo rilevante hanno la colonscopia, con eventuali prelievi di biopsie intestinali e successivo esame istologico, l'ecografia e la tac. I test di laboratorio rilevano frequentemente alterazioni dell'emocromo, quali la presenza di anemia ipocromica sideropenica da perdita, aumentato consumo e ridotto assorbimento di ferro, o megaloblastica da ridotto assorbimento di vitamina B12 e acido folico e trombocitosi. Inoltre, si ritrovano ipoalbuminemia ed alterazioni degli elettroliti, secondarie alla diarrea cronica. La ricerca del sangue occulto e la determinazione della calprotectina nelle feci rappresentano un importante test di screening. L'aumento dei marcatori aspecifici di infiammazione di fase acuta, quali la proteina C reattiva (PCR) e la velocità di eritrosedimentazione (VES) sono un utile supporto nell'inquadramento clinico alla prima diagnosi e nei controlli di pazienti con diagnosi nota. Infatti, la PCR e la VES correlano con l'attività clinica delle IBD.

Per il trattamento delle IBD, i pazienti vengono sottoposti a terapie biologiche che prevedono l'infusione di farmaci inibitori del TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alfa), una citochina pro-

infiammatoria. Uno di questi è Infliximab (IFX), un anticorpo monoclonale chimerico che, legandosi al TNF- α , ne impedisce l'interazione con i suoi recettori e, quindi, la sua attività pro-infiammatoria.

Obiettivi

L'obiettivo del progetto è valutare l'effetto del blocco del TNF- α da parte dei farmaci biologici anti TNF- α sui livelli degli indicatori dell'insulino-resistenza, del metabolismo lipidico e dell'infiammazione. Inoltre, si intende verificare se una variazione dei suddetti indicatori possa essere significativamente associata con la perdita di efficacia della terapia ed individuare i pazienti "non-responder" fin dalla prima infusione.

Attività svolta

La presenza nel nostro Istituto di un Ambulatorio dedicato al trattamento delle IBD con farmaci biologici anti-TNF- α rappresenta una notevole opportunità di studio e di ricerca clinica per queste patologie.

Il progetto, si sta svolgendo, infatti, in collaborazione tra la U.O.C. di Patologia Clinica e la U.O.C. di Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva, con il contributo scientifico Laboratorio di Immunopatologia sperimentale.

Per prima cosa, è stato predisposto un consenso informato, approvato dal Comitato Etico, sottoscritto da tutti i pazienti affetti da IBD arruolati nello studio e afferenti all'Ambulatorio delle IBD.

Come da protocollo di questa ricerca, i pazienti affetti da IBD selezionati afferiscono presso la U.O.C. di Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva, affinché siano sottoposti ad un prelievo venoso, effettuato da un'infermiera professionale, a digiuno, prima della infusione della terapia biologica.

I campioni biologici sono raccolti e subito processati. Dello stesso campione, inoltre, sono raccolte e conservate più aliquote a -80° C presso i nostri laboratori, secondo adeguati standard di conservazione. Allo stato attuale, sono stati arruolati 21 pazienti, ciascuno dei quali è stato valutato presso l'Ambulatorio delle IBD in media 4 volte, pertanto si sono raccolti e processati complessivamente circa 80 campioni di siero.

n° pazienti	IBD	sex	età media
21	6 UC*	6 maschi	37,5
	15 CD**	9 maschi 6 femmine	38,6

*UC: colite ulcerosa

** CD: morbo di Crohn

Nello specifico, si sono dosati su siero i seguenti parametri metabolici: glucosio, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi, insulina, ferro, ferritina, vitamina D, mediante sistemi analitici di chimica clinica automatizzati (UniCel DxH and DxI 660i Integrated System, Beckman Coulter). Mediante i valori di glicemia ed insulinemia è stato effettuato il calcolo dell'HOMA test.

Inoltre, si è verificato lo stato infiammatorio dei pazienti mediante determinazione su siero della proteina C reattiva (attraverso gli stessi sistemi analitici di chimica clinica automatizzati) e di diverse citochine, quali TNF α , IL-1 β e IL-9, mediante dosaggi ELISA.

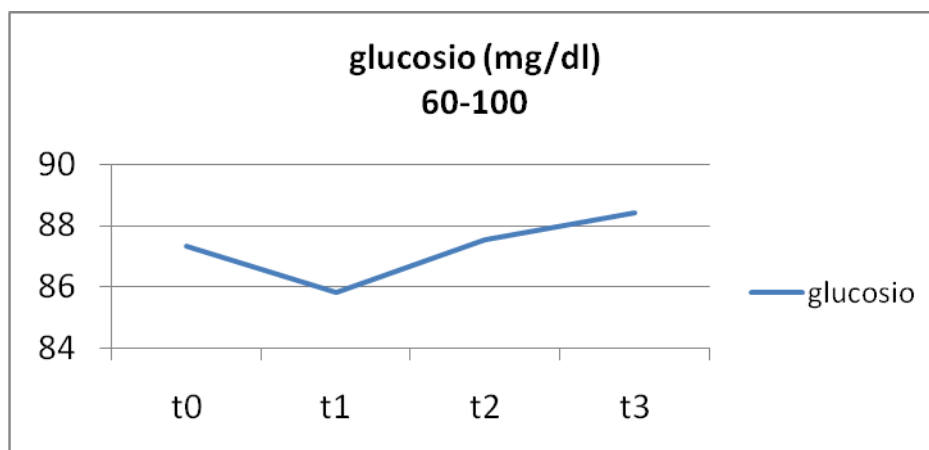
Poi, è stata determinata la concentrazione sierica della glicoproteina 90K/Mac-2BP, marcatore della risposta immunitaria innata, mediante dosaggi ELISA.

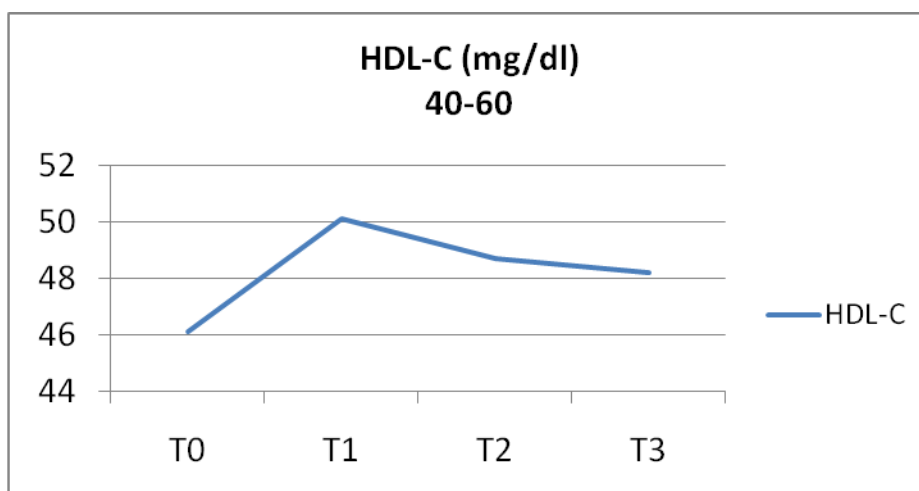
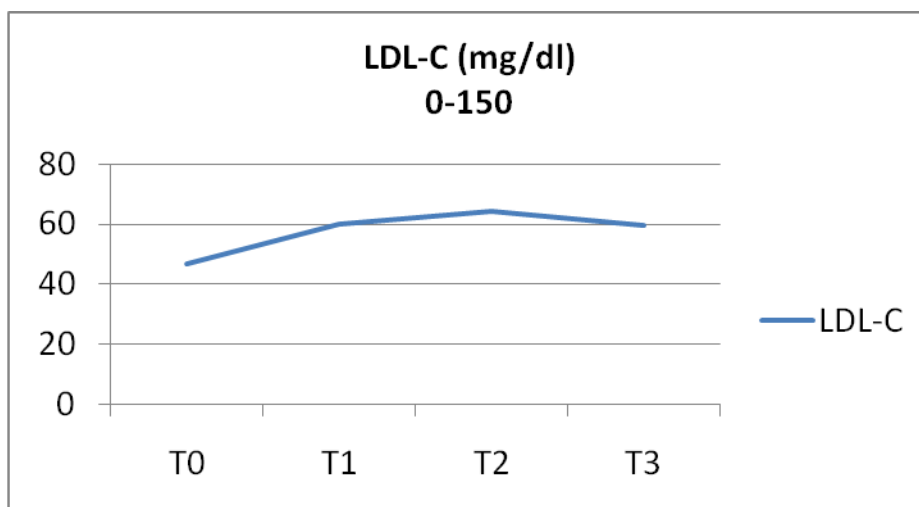
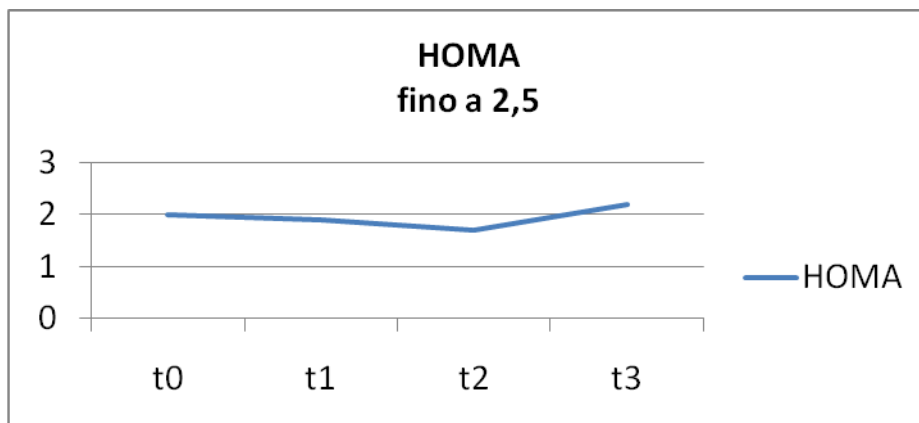
Risultati

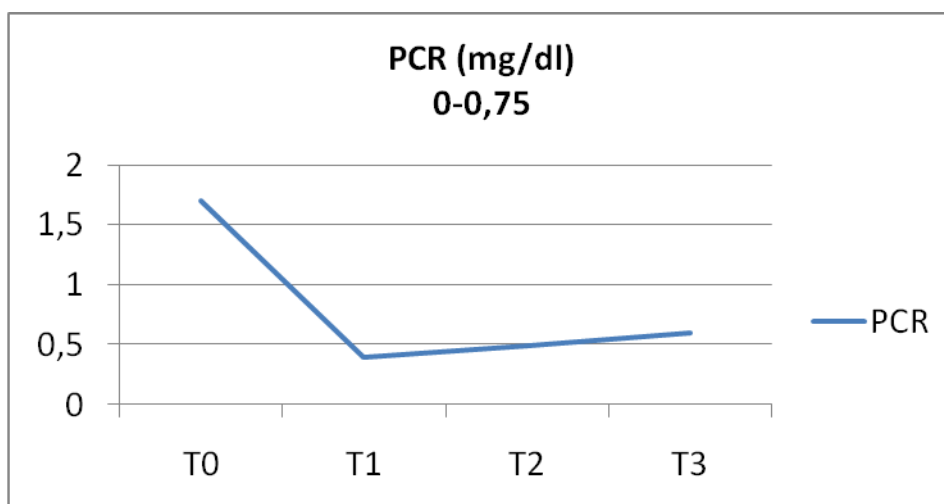
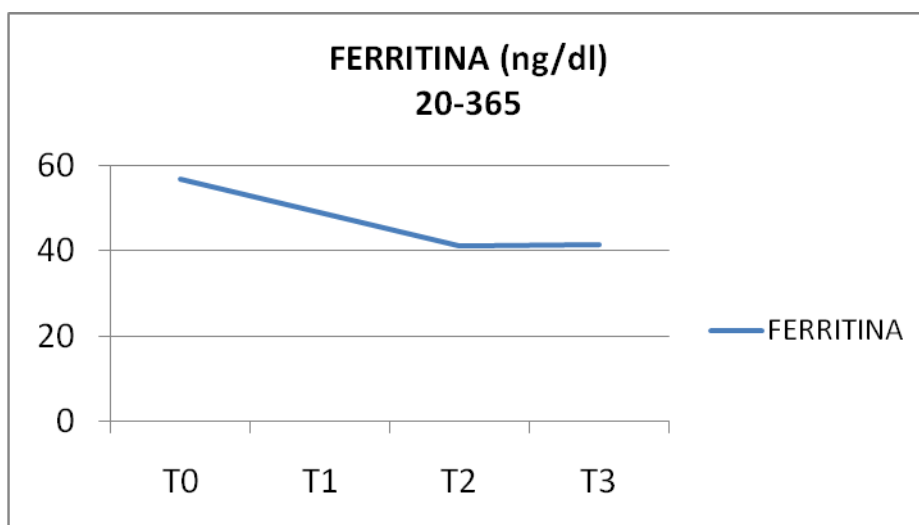
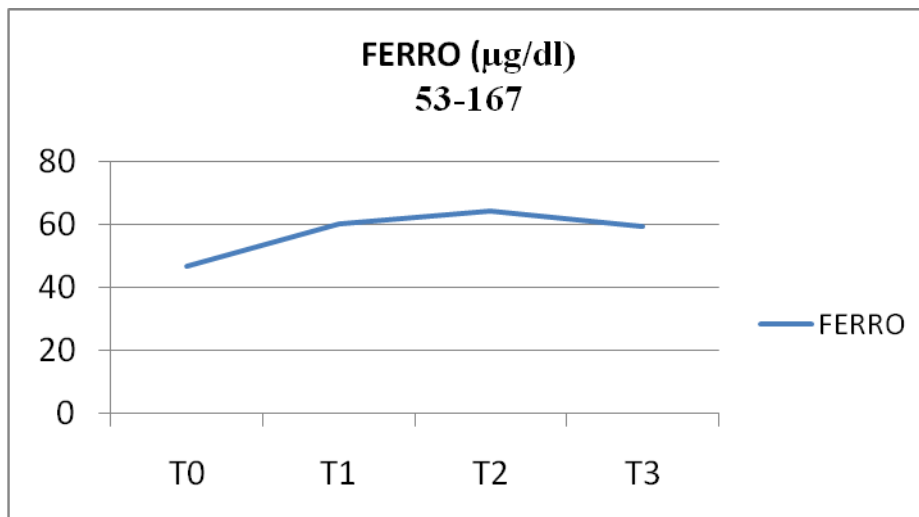
Si è proceduto ad una prima analisi dei dati ottenuti, analizzando le variazioni dei parametri nel corso delle infusioni.

PARAMETRI	T0 (BASALE) Media $\pm$ SD	T1 (PRE- INFUSIONE 2) Media $\pm$ SD	T1 (PRE- INFUSIONE 3) Media $\pm$ SD	T1 (PRE- INFUSIONE 4) Media $\pm$ SD
Glucosio (mg/dl)	87,3 $\pm$ 12,8	85,8 $\pm$ 15,1	87,5 $\pm$ 14,3	88,4 $\pm$ 15,4
HOMA	2 $\pm$ 1,3	1,9 $\pm$ 1,6	1,7 $\pm$ 1,5	2,2 $\pm$ 2,3
LDL-C (mg/dl)	46,8 $\pm$ 24,1	60,2 $\pm$ 35,1	64,4 $\pm$ 40,1	59,5 $\pm$ 30,5
HDL-C (mg/dl)	46,1 $\pm$ 12,3	50,1 $\pm$ 12,8	48,7 $\pm$ 13,9	48,2 $\pm$ 12,7
Ferro (μ g/dl)	46,8 $\pm$ 24,1	60,2 $\pm$ 35,1	64,4 $\pm$ 40,1	59,5 $\pm$ 30,5
Ferritina (ng/ml)	56,8 $\pm$ 54,2	49,1 $\pm$ 61,4	41,2 $\pm$ 60,2	41,4 $\pm$ 56,2
PCR (mg/dl)	1,7 $\pm$ 3,5	0,4 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,9	0,6 $\pm$ 1,0

Quello che è emerso preliminarmente è che, per quanto riguarda il metabolismo lipidico, il colesterolo HDL (HDL-C) aumenta nel corso della terapia rispetto al valore basale, mentre il colesterolo LDL (LDL-C) aumenta lievemente. Circa l'insulino-resistenza, la terapia non ha mostrato variazioni significative. In netto aumento sono i livelli di ferro, mentre i parametri infiammatori come la ferritina e la PCR diminuiscono. Quest'ultima, in particolare, ritorna nel range di normalità.







È stato determinato in 14 pazienti anche il panel di citochine su riportato: in 10 pazienti è risultato positivo il $\text{TNF}\alpha$, mentre solo in 4 pazienti l' $\text{IL-1}\beta$ ed in 5 l' IL-9 .

In 3 casi la positività al $\text{TNF}\alpha$ coincideva con quella dell' $\text{IL-1}\beta$, in 4 casi la positività al $\text{TNF}\alpha$ coincideva con quella dell' IL-9 ed in 2 casi la positività ad IL-9 coincideva con quella dell' $\text{IL-1}\beta$. In 2 casi, infine, erano presenti tutte e tre le citochine.

Per quanto riguarda i risultati del dosaggio della 90K, confrontando il valore della prima infusione con la media delle infusioni successive, si è visto una diminuzione di questa proteina. Si attende di incrementare la numerosità del campione per poter sottoporre i dati ad elaborazioni statistiche.

Progetto: “Contributo del laboratorio al monitoraggio delle terapie biologiche anti-TNF alfa in pazienti con malattie croniche infiammatorie intestinali (IBD)” (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile Dr. M. Correale (Patologia Clinica);

Partecipanti M. Mastronardi (Gastroenterologia II), E. Stasi (Gastroenterologia II), M. Chieppa (Immunopatologia Sperimentale), P.A. Iacovazzi (Patologia Clinica), AM Mastrosimini (Patologia Clinica), G.D. Redavid (Patologia Clinica Borsista), C. M. Leone (Patologia Clinica), P. L. Pesole (Patologia Clinica), T. Pinto (Patologia Clinica)

Introduzione

Negli ultimi decenni la terapia farmacologica è stata rivoluzionata dall'introduzione dei farmaci cosiddetti “biologici”, ovvero molecole di medio-alto peso molecolare di natura proteica, glicoproteica, polisaccaridica (ormoni ed enzimi, emoderivati, immunoglobuline, anticorpi monoclonali), prodotti mediante le tecniche del DNA ricombinante.

Gli anticorpi monoclonali che hanno come target il TNF- α sono molto efficaci nel trattamento delle malattie infiammatorie croniche intestinali (*Inflammatory Bowel Diseases*, IBD), morbo di Crohn e colite ulcerosa.

Sebbene, nella maggior parte dei pazienti trattati il decorso clinico sia decisamente favorevole, in alcuni casi la terapia risulta inefficace oppure genera una serie di reazioni avverse inappropriate. Altro aspetto rilevante è che il trattamento con farmaci anti-TNF α è gravato da costi rilevanti ed effetti collaterali, per cui è necessario ottimizzare tali terapie. In particolare, occorre tempestivamente rilevare la perdita di efficacia della terapia, intesa come ripresa di attività della malattia in un soggetto inizialmente rispondente. Le due strategie possibili in caso di perdita di risposta possono essere o l'aumento dell'esposizione al farmaco (aumentando la dose della singola infusione o diminuendo l'intervallo fra le infusioni), oppure cambiare terapia. Tuttavia, è possibile che sia vantaggioso, sia in termini di successo terapeutico che in termini economici, integrare la clinica con 2 test di laboratorio: la misura dei livelli ematici del farmaco anti-TNF α e di anticorpi (Ab) anti-farmaco, in quanto la perdita di risposta pare essere associata a bassi livelli sierici di farmaco anti-TNF α e/o alla presenza di Ab anti-farmaco. In base a dati recenti della letteratura e alle nostre esperienze preliminari, la determinazione di questi due parametri può risultare importante nella gestione clinica del paziente, per identificare quelli *non-responder*, siano essi primari o secondari.

Altro elemento importante nel trattamento delle IBD è che negli ultimi anni alcuni farmaci biologici, come infliximab, hanno perso la copertura brevettuale, permettendo così lo sviluppo e la commercializzazione di farmaci “biosimilari”, i quali hanno il grande vantaggio di avere un costo significativamente più basso.

Gli anticorpi monoclonali sono complesse molecole di natura proteica ad elevato peso molecolare e, sebbene, i biosimilari abbiano la stessa sequenza amminoacidica, essi non sono la copia esatta degli anticorpi originali poiché il prodotto finale dipende dal processo di produzione utilizzato (per es. dalla linee cellulari, dalle condizioni di crescita, dai processi di purificazione, ecc). Ciò si traduce in

differenze nella glicosilazione, fosforilazione e altre modificazioni post-traduzionali, che possono alla fine influenzare l'efficacia e l'immunogenicità del farmaco.

Obiettivi dello studio

L'obiettivo iniziale del progetto è quello di integrare in modo ottimale le valutazioni cliniche con indagini di laboratorio mirate al dosaggio dei farmaci anti-TNF e di eventuali anticorpi anti-IFX nel monitoraggio dei pazienti con IBD in trattamento e, quindi, studiare in questi pazienti il modo migliore di seguire l'andamento della malattia e la predittività alla risposta alla terapia con indagini di laboratorio, anche ricercando biomarker innovativi. Inoltre, ci si propone di realizzare un database che raccolga per ciascun paziente tutti i dati disponibili, sia clinici che laboratoristici, per garantirne un miglior monitoraggio e un aumento della *compliance* e della fidelizzazione.

Attività svolta

Nel corso di quest'anno sono stati raccolti tutti i dati riguardanti la terapia biologica con infliximab (farmaco anti-TNF α) in possesso dell'ambulatorio delle IBD in 2 database, uno per la colite ulcerosa e uno per il morbo di Crohn. In questi database sono stati inseriti i dati demografici, i dati clinici riguardanti la specifica patologia e le comorbidità, le terapie farmacologiche, gli score clinici ed endoscopici e i parametri di laboratorio, quali VES e PCR, calprotectina fecale, livelli sierici di farmaco e anticorpi anti-farmaco a determinati intervalli di tempo. E' stata, inoltre, validata la determinazione della calprotectina sierica: al contrario di quella fecale in letteratura c'è poco a riguardo, solo 2 studi da cui emerge una buona correlazione con PCR e *score* clinici ma non con quelli endoscopici.

Finora, il database per la colite ulcerosa raccoglie 114 pazienti ed è praticamente completato; in quello per il Crohn, ad oggi, sono stati inseriti 69 soggetti, ma è ancora in fase di completamento.

Risultati conseguiti

Da una analisi preliminare dei dati raccolti è emerso che i livelli basali di infliximab al termine dell'induzione erano differenti tra i pazienti sottoposti al prodotto "*brand*" (Remicade) e quelli ai quali era infuso il biosimilare (Remsima): in particolare abbiamo stimato una riduzione di circa il 25% in quelli sottoposti al biosimilare.

Per quanto riguarda uno dei *marker* oggetto del progetto di ricerca, ovvero la calprotectina, vista la numerosa letteratura riguardante quella fecale e il suo ruolo già riconosciuto nel *management* delle IBD e, visto che uno degli obiettivi del progetto era l'individuazione di nuovi biomarcatori, si è iniziata la valutazione della calprotectina sierica, con l'obiettivo di verificare la correlazione della calprotectina sierica con PCR, calprotectina fecale, *score* clinici ed endoscopici, livelli sierici di farmaco ed anticorpi anti-farmaco, poichè essa, da sola o in associazione ad uno di questi parametri, potrebbe risultare un buon marcatore da utilizzare nel monitoraggio delle IBD in corso di terapia. Da un'analisi preliminare su 38 campioni è emersa una buona correlazione con la calprotectina fecale ($\rho=0.4828$ e $p\text{-value}=0.002$) e una ancora migliore con il *Mayo Score* parziale (utilizzato come *score* clinico: $\rho=0.6235$ e $p\text{-value}<0.0001$). Inoltre, sembrerebbe che la calprotectina sierica correli meglio di quella fecale con lo score clinico e permetta di meglio discriminare i pazienti in remissione da quelli sintomatici. Rimangono altri 30 campioni già disponibili da analizzare, più altri che verranno raccolti, in modo tale da rendere i risultati più robusti prima di procedere alla loro pubblicazione.

Progetto: “Indicatori circolanti delle gastriti croniche” (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile: Dott.ssa Iacovazzi Palma Aurelia

Partecipanti: Dott.ssa Panarese Alba (Gastroenterologia 2), Dott.ssa Leone (Borsista)

Introduzione

Le malattie neoplastiche epiteliali dello stomaco rappresentano un onere diagnostico importante. In particolare, le gastriti croniche atrofiche da *Helicobacter Pylori* costituiscono uno dei principali fattori di rischio per tali neoplasie. Di conseguenza la diagnosi precoce di questa patologia è molto utile per individuare i soggetti più a rischio di sviluppo di tumori gastrici. Naturalmente il “gold standard” per la diagnosi è l’esofagogastroduodenoscopia (EGDS) che non presenta un’elevata invasività, ma ha spesso lunghi tempi di attesa. Tuttavia, è possibile eseguire alcuni test di laboratorio per screenare un sottogruppo di soggetti potenzialmente a rischio da sottoporre ad un follow-up più stringente. Tra le molecole studiate una delle più promettenti è rappresentata dalla grelina. Si tratta di un peptide, che stimola l’assunzione di cibo, secreto dalle cellule X/A-like, particolarmente abbondanti nella regione del corpo dello stomaco.

Obiettivi

Obiettivo del nostro studio è stato valutare l’utilità del dosaggio della grelina nel siero per individuare i soggetti con severa atrofia gastrica e/o con metaplasia così da indirizzarli ad un monitoraggio più ravvicinato.

Materiali e metodi

In questo studio abbiamo arruolato 55 pazienti consecutivi (25 maschi e 30 femmine, 65.5 ± 10.3 anni) che hanno effettuato un EGDS presso il Servizio di Endoscopia digestiva del nostro Istituto. Dopo consenso informato, è stato eseguito un prelievo di sangue in provette Vacutainer per siero con gel separatore. Le aliquote di siero sono state quindi subito conservate a -80°C fino al dosaggio. La grelina è stata dosata con metodica immunometrica (ELISA) (Immunological Sciences, Roma, Italy). A tutti i pazienti è stata eseguita anche l’esame istologico delle biopsie gastriche, come da routine. Sono state selezionate le gastriti croniche atrofiche (CAG) e le gastriti atrofiche con metaplasia. Nello studio sono stati considerati anche i pazienti trattati con inibitori di pompa protonica (PPI). I dati sono stati espressi come media $\pm$ SD. La differenza tra i gruppi è stata analizzata utilizzando il t-Student test, $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

Risultati

I pazienti sono stati così raggruppati sulla scorta dei dati endoscopici ed istologici: 18 CAG Autoimmuni (8 maschi e 10 femmine), 30 CAG (14 maschi e 16 femmine) con metaplasia intestinale and 7 CAG trattate con PPI. I valori medi di Grelina sierica sono riportati nella Tabella 1.

Gruppi di gastriti	Grelina totale (pg/ml) media $\pm$ SD
Autoimmune CAG	175,5 $\pm$ 208,2
metaplastica CAG	86,2 $\pm$ 76,8
CAG trattate con PPI	448,5 $\pm$ 576,5

I campioni dei soggetti trattati con PPI hanno mostrato i valori medi più alti. Inoltre la presenza di metaplasia è legata ai valori più bassi. L'analisi statistica ha confermato una differenza significativa tra i valori di grelina misurati nei soggetti con metaplasia e di quelli con CAG autoimmune rispetto ai pazienti in trattamento farmacologico con PPI ($p=0.0544$ and $p=0.0014$, t-Student test, rispettivamente).

Conclusioni

Malgrado la scarsa numerosità del campione oggetto di studio, i nostri risultati suggeriscono che la grelina potrebbe essere un promettente marker sierologico utile per la valutazione precoce delle gastriti atrofiche autoimmuni, in modo particolarmente efficace quando associate a metaplasia.

Pubblicazioni

ABSTRACT presentato al Congresso Nazionale di Endoscopia digestiva, Roma 2018.

Progetto: “Dosaggio della vitamina D nelle stipsi croniche da rallentato transito” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa Alba Panarese

Partecipanti: Dott. Alberto R. Osella (Epidemiologia e Biostatistica), Dott.ssa Iacovazzi Palma Aurelia (Patologia Clinica), Dott. Riezzo Giuseppe (Fisiopatologia della Nutrizione)

(Le attività dell'UOC sono descritte nella Linea 1)

Introduzione

La stipsi cronica idiopatica ha notevole impatto clinico e sociale. Nel contesto delle stipsi assume rilevanza la stipsi da rallentato transito che, epidemiologicamente, interessa maggiormente il sesso femminile.

I disturbi di motilità intestinale possono coinvolgere anche il piccolo intestino.

Essi impattano fortemente la qualità di vita del paziente e sono condizioni variegata e, talora, nella forma refrattaria, per loro stessa definizione, problematiche nella gestione terapeutica. Pur essendo rilevante, continuano ad avere una definizione vaga che si basa soprattutto sul giudizio di inefficacia espresso dal paziente verso le terapie

Nella scelta della terapia medica è importante inquadrare il problema conoscendo i vari aspetti clinici di queste condizioni.

Il dosaggio della vitamina D nella popolazione italiana, soprattutto negli anziani e al termine dei mesi invernali, risulta di per sé critico. Purtroppo, il problema non è esclusivo appannaggio degli anziani, dal momento che i risultati di un vasto studio italiano, teso a determinare i livelli di normalità dei marker di turnover osseo, hanno documentato che nei soggetti giovani e sani la carenza di vitamina D coinvolge il 30 e il 65% dei soggetti a seconda che si utilizzino come cut-off livelli sierici di 25(OH) vit D inferiori a 20 o 30 ng/ml, rispettivamente. Anche nei soggetti giovani lo stato vitaminico D peggiora nei mesi invernali, in particolar modo nelle donne. Gli effetti più noti della vitamina D, nella sua forma ormonale attiva, calcitriolo, sono certamente quelli relativi all'assorbimento di calcio a livello intestinale, dove essa gioca un ruolo essenziale. Uno stato carenziale di vitamina D, protratto nel tempo, specie se associato ad una dieta povera di calcio (come in genere è quella italiana, specie nei soggetti anziani), può condurre a deficit di assorbimento calcico con conseguenti difetti di mineralizzazione e disfunzione di diversi organi. In

presenza di un normale apporto di calcio con la dieta, il rischio di rachitismo aumenta quando i livelli sierici di 25(OH)D risultano inferiori a 10 ng/ml (25 nmol/l). Tuttavia, quando l'apporto di calcio è inadeguato, per evitare il rischio di osteomalacia, potrebbero essere necessari livelli di calcifediolo superiori a 30 ng/ml (75 nmol/l). Importante è, anche, il legame tra vitamina D e muscolo. In condizioni di ipovitaminosi D sono stati descritti quadri di miopatia prossimale (difficoltà ad alzarsi dalla sedia, impotenza funzionale nel portare le braccia sopra la testa, ecc.), di riduzione della forza muscolare, di disturbi dell'equilibrio con conseguente rischio di caduta e di frattura.

Recettori per la vitamina D sono presenti in vari tipi cellulari e, nel nostro caso, quello che interessa è l'importanza della vitamina D per la funzione della muscolatura liscia viscerale.

I dati relativi al dosaggio plasmatico della vitamina D nei soggetti con stipsi cronica idiopatica restano sconosciuti. In particolare, sono sconosciuti quelli della stipsi da rallentato transito. I risultati attesi dal nostro studio sono la maggiore riduzione del valore plasmatico della vitamina D rispetto alla popolazione generale. Le implicazioni pratiche di questo sono notevoli perché ci riportano al meccanismo patogenetico di queste stesse condizioni ed alla gestione clinica dei pazienti.

La riduzione del dosaggio della vitamina D, nella popolazione italiana, è, di per sé, un problema già noto e importante per le implicazioni che il deficit di questo nutriente determina.

Le deduzioni fatte sulla popolazione generale verrebbero ad essere ancora più significative per la nostra popolazione di pazienti. Le considerazioni che lo studio proposto consentirebbe farebbero aggiungere ai dati in letteratura alcuni commenti. P.es. che la maggiore incidenza di deficit di vitamina D nella popolazione femminile coincida con la maggiore incidenza di stipsi cronica idiopatica nello stesso sesso.

Da un punto di vista patogenetico, potremmo supporre una correlazione tra deficit plasmatico della vitamina D e attività della muscolatura liscia intestinale.

Allo stato attuale è stato effettuato l'ordine di acquisto dalla ditta DiaSorin del Kit Liaison VITAMINA D per il dosaggio della vitamina D. Il Kit consentirà il dosaggio di vitamina D in 100 campioni. Il costo sarà di 915 euro comprensivi di IVA (DG 78 del 9.02.2017).

Obiettivi

Obiettivi di questo studio sono:

Primari:

- Stimare il dosaggio della vitamina D nei soggetti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito
- Individuare delle categorie ulteriori di pazienti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito in relazione al dosaggio di vitamina D
- Proporre, sulla base del precedente obiettivo, terapie mirate, finalizzate alla risoluzione del deficit e dei disturbi che esso comporta

Secondari:

- Acquisire la pratica del dosaggio di vitamina D nei soggetti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito
- A. Acquisire la pratica del dosaggio di vitamina D, anche nei soggetti con altri disturbi funzionali gastrointestinali

Lo studio verrà condotto su soggetti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito che siano pervenuti alla nostra osservazione ambulatoriale e clinica, purchè non presentino condizioni, già note o in essere, di riduzione del dosaggio di vitamina D.

Gli outcomes includono:

- **livelli plasmatici di vitamina D nei soggetti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito: riduzione.**
- **Comorbidità correlate al deficit di vitamina D nei pazienti con disturbi di motilità intestinale da rallentato transito: presenza**

Attività svolta

Lo studio ha incluso soggetti “caso”, suddivisi in tre gruppi di pazienti (stipsi da rallentato transito, disturbi da rallentato transito del piccolo intestino e rallentato transito del piccolo e del grosso intestino), e un gruppo controllo.

L'arruolamento prevedeva che i soggetti del gruppo patologico avessero un disturbo di motilità intestinale documentato da indagini di motilità gastrointestinale (breath test al lattulosio alterato come da rallentato transito e/o transito colico rallentato con descrizione della sede di accumulo dei marcatori radiopachi).

Abbiamo approntato un modulo (prestampato) descrittivo delle caratteristiche di ciascun soggetto arruolato nello studio, sia del gruppo dei soggetti patologici, sia del gruppo controllo. Abbiamo escluso soggetti con patologie causa di disturbi intestinali o di difettoso assorbimento di vitamina D. Le caratteristiche dei soggetti sono state raggruppate negli ambiti clinico-anamnestici, diagnostico-strumentali e laboratoristici.

I soggetti arruolati hanno effettuato il dosaggio di vitamina D e completato i seguenti questionari: IBS-QOL, SF-12, HADS.

Il protocollo è stato registrato in ClinicalTrials.gov PRS.

Risultati conseguiti

Lo studio ha arruolato 86 soggetti “caso” e 86 “controlli” sani.

I casi arruolati hanno manifestato, nel corso del tempo (anni o mesi), una stazionarietà del disturbo o, più spesso, un decorso ingravescente.

I soggetti con disturbi di motilità intestinale sono così suddivisi: 28 STC (slow transit constipation), 32 DSBM (delayed small bowel motility), 26 STC+DSBM.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a dosaggio della vitamina D (ditta DiaSorin - Kit Liaison VITAMINA D per il dosaggio della vitamina D).

I casi, raggruppati come detto sopra, sono stati definiti anche per le loro caratteristiche cliniche (sintomi) (tab.1) e con dosaggio di PTH e test psicometrici (IBS-QOL, SF-12, HADS).

L'età media dei casi è stata di 49.9 anni (84.9% femmine) e con dosaggio medio di vitamina D di 16.6 ng/mL. Il gruppo controllo, di 86 soggetti, ha età media di 50.1 anni e dosaggio medio di vitamina D di 28,1 ng/mL. I soggetti con DIMDS hanno livelli significativamente bassi di vitamina D, soprattutto nel gruppo di casi con rallentata motilità del piccolo intestino e del colon (tab 2).

Table 1. Symptoms profile of cases and controls

	Constipation	Abdominal pain	swelling
DSBM	26/32	23/32	26/32
STC	26/28	25/28	27/28
DSBM+STC	26/26	25/26	26/26

Tab 2 - Characteristics of cases and controls and laboratory results.

parameter	Cases group (N=86)	Control group (N=86)
Age, median±SD	49,9±	50.1±
Gender, n (%)		
-female	73 (84.9%)	73 (84.9%)
-male	13 (15.1%)	13 (15.1%)
Education, n (%)		
-primary	5 (5.8%)	5 (5.9%)
-intermediate	33 (38.4%)	14 (16.3%)
-high	38 (44.2%)	37 (43.1%)
-graduate	10 (11.6%)	28 (32.7%)
Body mass index, median±SD	22.5	28.2
Vitamin D (ng/ml), median±SD	16.6	28.1
PTH (ng/ml), median	52.3	

Pubblicazioni

La stesura del paper relativo lo studio sopracitato è in via di completamento e prossimo alla sottomissione scientifica.

U.O.S. Microbiologia e Virologia

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia è fornito di tecnologie all'avanguardia che offrono, nei settori di assistenza e ricerca, la completezza delle indagini, rafforzando principalmente la diagnostica che si avvale di tecniche di biologia molecolare e di spettrometria di massa a disposizione di un vasto bacino di utenza.

Inoltre, a partire da marzo 2016 è stato introdotto un nuovo sistema di informatizzazione delle attività di laboratorio (LIS). Questo ha comportato una significativa riformulazione delle prestazioni dell'unità operativa adeguando le richieste di prestazioni dei reparti e dei pazienti esterni agli standard del nuovo tariffario nazionale e regionale costruendo pacchetti di prestazioni effettuabili su vari materiali patologici oggetto di indagini.

“Epidemiologia e farmacovigilanza delle infezioni da *Helicobacter pylori*” (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Dott.ssa Palmitessa Valeria (borsista)

Introduzione

Helicobacter pylori (Hp) è un agente patogeno umano che rappresenta la causa più frequente delle malattie del tratto digestivo superiore. Questa infezione viene acquisita in genere durante l'infanzia e si stima che, oltre la metà della popolazione mondiale sia colonizzata da questo patogeno a circolazione interumana, sebbene molti degli individui colonizzati si presentano all'osservazione asintomatici. E' stato dimostrato inoltre che l'infezione della mucosa gastrica da parte di questo batterio microaerofilo sia associata a disturbi gastroenterici che vanno dal reflusso gastro-esofageo all'ulcera peptica e alla gastrite, l'infezione cronica per di più, è stata dimostrata essere un fattore di rischio nello sviluppo del cancro gastrico e del linfoma MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) (1, 2, 3). La prevalenza globale di questa infezione è circa del 50% ma esistono grandi differenze tra nazioni e regioni; il tasso più alto si riscontra in Paesi sottosviluppati soprattutto in Asia, Africa e Sud America (in Iran la prevalenza è del 64.2%, in America Latina del 79.4%), e ciò dipende dalle condizioni igienico-sanitarie della popolazione. Una bassa prevalenza è, invece presente in Nord America, Australia (rispettivamente del 21% e del 15.5%), ed Europa occidentale sebbene siano presenti tutt'ora aree ad elevata prevalenza come Spagna, Portogallo (Repubblica Ceca 23.5%, Slovacchia 30%, Portogallo del 66.2%) (4, 5, 6). Sebbene siano numerosi gli studi che riportano dati circa la prevalenza di questa infezione nella popolazione mondiale e per lo più concentrati sulla popolazione dell'Asia orientale dove questa infezione e la sua eradicazione rappresentano una emergenza sanitaria legata a costi in termini di vite umane ed economici, sono pochi in realtà gli studi volti a fotografare l'incidenza nella popolazione Europea e nello specifico in quella Italiana. La descrizione accurata dell'epidemiologia di questa infezione a livello nazionale inoltre mostra un certo grado di variabilità dei dati raccolti sino ad oggi circa questa infezione che ha un'incidenza di almeno il 30% con picchi anche oltre il 50% in alcune zone. Sono solo due inoltre gli studi che descrivono dettagliatamente la prevalenza della colonizzazione da Hp in Italia: un studio del 2002 condotto in un paese della Calabria che ha mostrato una prevalenza del 71.6% ed un altro studio di popolazione del 2007 condotto nel Nord Italia che ha mostrato una prevalenza dell'infezione del 56.7% (7, 8). In questo contesto si inserisce lo studio condotto presso questo IRCCS iniziato ad Aprile 2017 e volto a fornire ulteriori informazioni circa la prevalenza dell'infezione da Hp e le caratteristiche di antibiotico-resistenza associate a questo patogeno.

Obiettivi del progetto

Gli obiettivi della ricerca sono quelli di mettere a punto:

1. tecniche di isolamento di ceppi di *H. pylori* da pazienti con diverse patologie gastriche a carattere infettivo;
2. saggi di sensibilità agli antibiotici, mediante metodo ϵ -test, dei ceppi di *H. pylori* al fine di valutare la dimensione del fenomeno della antibiotico-resistenza nel bacino di utenza del suddetto IRCCS per questo specifico patogeno.
3. Caratterizzare dal punto di vista molecolare le resistenze agli antibiotici, nonché la diffusione di ceppi di *H. pylori* esprimenti i geni dell'isola di patogenicità (cag A e vac A), i

quali sono associati a patologie gastriche più gravi come ulcera peptica e carcinoma gastrico.

I tre obiettivi cardine dello studio vengono perseguiti parallelamente grazie alla contemporanea applicazione di procedure culturali di isolamento, di analisi fenotipiche delle antibiotico-resistenze e della analisi delle caratteristiche genotipiche relative a antibiotico-resistenza e virulenza.

Attività svolta

Attualmente sono stati arruolati previo consenso informato 106 pazienti afferenti all'U.O.C. di Endoscopia Digestiva (48 uomini e 58 donne) seguendo i criteri di inclusione ed esclusione riportati nel Protocollo di Ricerca (approvato dal Comitato Etico con delibera Prot. N. 231 del 13/11/2017 nella seduta del 24 Ottobre 2017) di genere sia maschile che femminile, età compresa tra i 18 e i 64 anni, con indicazione di esofagogastroduodenoscopia (EGDS) con sintomatologia variabile. E' stata esclusa dallo screening la popolazione fragile costituita da individui al di sotto dei 18 anni e al di sopra dei 65 anni di età e donne in gravidanza o allattamento.

Tre biopsie di ciascun paziente, provenienti rispettivamente da *angelus*, corpo ed antro, per un totale di 318 campioni biotici, sono state processate mediante tecniche culturali specifiche (18) al fine di effettuare l'isolamento di *Helicobacter pylori*. Il protocollo di isolamento prevede che sia condotto inoltre un esame microscopico previa colorazione di Gram in doppio di ogni campione biotico al fine di valutare la presenza di bacilli Gram negativi con caratteristica morfologia spirale. Questa indagine è necessaria al fine di coadiuvare ed indirizzare correttamente l'esame culturale dal momento che indica celermente la presenza di bacilli "HP-like" nel campione biotico. Al fine dell'isolamento si è proceduto omogenizzando ogni campione biologico ed inseminando due distinte piastre contenenti terreni selettivi differenti, uno a base di sangue e l'altro contenente oltre che fonti di aminoacidi, proteine, carboidrati e vitamine anche una miscela di antibiotici e antimicotici utili ad inibire lo sviluppo di possibili contaminanti (batteri provenienti dalla cavità orale o funghi di origine anche ambientale) e a favorire selettivamente la crescita del patogeno in esame, noto per essere caratterizzato da lenta e stentata crescita e nutrizionalmente esigente. I terreni così seminati sono stati incubati a 37°C in condizioni di microaerofilia fino a 25 giorni. Il controllo di crescita è stato condotto ogni 72 ore al fine di valutare la formazione di colonie piccole traslucide non emolitiche. Le colonie sospette sono state sottoposte a prove biochimiche al fine di valutare rispettivamente l'attività enzimatica dell'ossidasi, dell'ureasi e della catalasi tipicamente positive per questo patogeno. La positività di queste prove biochimiche infatti, viene considerata prova identificativa di *Helicobacter pylori*. L'esame microscopico previa colorazione di Gram, confermava la presenza di bacilli spirali Gram negativi costituenti le colonie isolate.

Per ogni ceppo si è proceduto all'analisi delle caratteristiche fenotipiche di antibiotico-resistenza relative a sei differenti classi di antibiotici quali claritromicina, amoxicillina, metronidazolo, rifampicina, levofloxacina e tetraciclina. E' stata misurata la minima concentrazione inibente (MIC) rispettivamente per ognuno dei sei antibiotici indicati mediante l'utilizzo di strisce reattive con gradiente di concentrazione (ϵ -TEST) secondo le linee guida indicate nel documento ufficiale dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). I dati ottenuti circa le MIC sono stati confrontati con i breakpoint specifici per l'Hp riportati dall'EUCAST al fine di indicare il fenotipo isolato come resistente, sensibile o intermedio (15).

Con l'utilizzo di questo protocollo di isolamento è stato possibile isolare 34 ceppi costituenti attualmente una ceppoteca istituita presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'U.O.C di Patologia Clinica di questo Istituto. Il reclutamento dei pazienti è tutt'ora in corso e si stima che

proseguirà fino al raggiungimento della raccolta di 200 ceppi di *Helicobacter pylori* al fine di garantire significatività statistica ai dati raccolti.

Risultati conseguiti

Secondo l'analisi di questi primi dati, la prevalenza misurata nel bacino di utenza dell'Istituto dell'infezione da Hp è risultata superiore al 30% con una distribuzione leggermente superiore nel genere maschile rispetto che in quello femminile (rispettivamente del 35.4% e del 29.3%). Recenti studi riportano che circa un terzo della popolazione Europea risulta colonizzata da questo patogeno umano. I primi dati raccolti indicano che la prevalenza riscontrata nella popolazione costituita da pazienti afferenti al l'U.O.C. di Endoscopia digestiva dell'IRCCS "S. De Bellis" è sovrapponibile con quelle indicate in letteratura più recentemente da studi condotti a livello Europeo anche per quanto riguarda la distribuzione in funzione del genere dal momento che è riportata anche in questi studi una prevalenza leggermente maggiore negli uomini rispetto che nelle donne, sebbene le due classi abbiano quasi sempre una frequenza di positività quasi sovrapponibile. Nonostante gli sforzi comunitari volti alla descrizione della epidemiologia di questa infezione siano elevati, i dati relativi alle aree geografiche nazionali intracomunitarie sono notevolmente differenti e mettono in luce una diffusione geografica a macchia di leopardo della popolazione colonizzata da questo patogeno (9).

Analizzando la prevalenza dei casi di positività all'Hp in funzione delle classi di età in cui la popolazione è stata suddivisa si osserva come si passa da una frequenza del 36.6% nei pazienti che vanno dai 65 ai 56 anni di età ad una frequenza del 38.7% per la classe di età compresa tra i 55 ed i 46, al 17.6% tra i 45 ed i 36 anni, al 23,0% tra i 35 ed i 26 fino al 25% nei pazienti che vanno dai 25 ai 18 anni di età (Grafico 1). Questo dato preliminare mostra come la frequenza con la quale si riscontra l'infezione da Hp nella popolazione sia minore se si abbassa l'età dei pazienti analizzati quindi anche nel bacino di utenza dell'Istituto, la maggiore prevalenza si osserva nei pazienti più anziani rispetto a quelli più giovani. Si stima infatti che il miglioramento delle condizioni di vita riduca la probabilità di colonizzazione e l'utilizzo di test non invasivi permetta l'eradicazione precoce di questo patogeno. La prevalenza del batterio, nei Paesi Industrializzati, è caratterizzata infatti da un incremento proporzionato alla fascia d'età: ciò rispecchierebbe il fatto che i soggetti di età avanzata hanno una maggior probabilità di aver vissuto nell'infanzia in condizioni igienico-sanitarie più sfavorevoli rispetto alle generazioni successive ("effetto coorte") (10, 11). Secondo i Centers for Disease Control (Cdc) statunitensi, quasi due terzi della popolazione mondiale è infetta da *H. pylori* tuttavia l'incidenza è passata dal 41.7% del 2001 al 23.5% del 2011 nei paesi con bassa prevalenza. Tendenzialmente, persone con un basso livello culturale e con un'età superiore ai 55 anni sono maggiormente associate al rischio di infezione da Hp. Secondo quanto pubblicato nel rapporto "A Public Health Approach to Innovation" (2005) del Priority Medicines for Europe and the World Project, sotto l'egida dell'Oms, la prevalenza dell'infezione da *H. pylori* nei Paesi industrializzati riguarda il 20% circa degli individui al di sotto dei 40 anni e il 50% di quelli al di sopra dei 60 anni ed è rara fra i bambini, inoltre un basso stato socioeconomico è un fattore di rischio per l'infezione tuttavia la prevalenza può aumentare in corrispondenza di aree caratterizzate da un forte flusso immigratorio. Per quanto riguarda invece i Paesi in via di sviluppo l'infezione riguarda la maggior parte della popolazione adulta, circa l'80% e circa il 10% dei bambini di età compresa tra i 2 e gli 8 anni sono infettati.

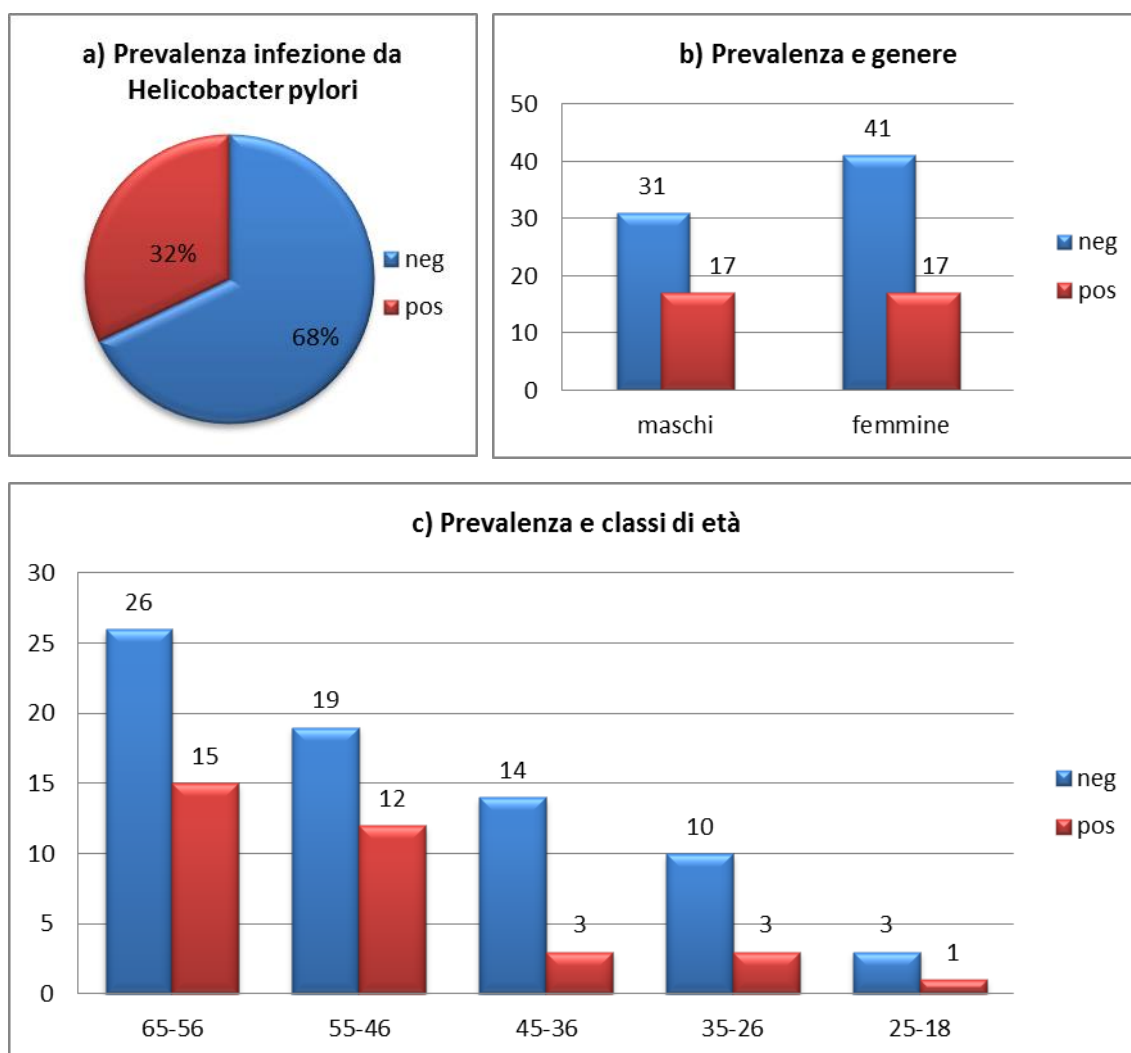


Grafico 1: a) Percentuale di pazienti negativi versus pazienti positivi alla ricerca colturale di *H. pylori*. b) Suddivisione in funzione del genere e prevalenza della positività nelle sottoclassi. c) Suddivisione in classi d'età. Blu negativi, rosso positivi.

Sebbene la prevalenza dell'infezione da *H. pylori* sia in calo, il tasso di fallimento dell'eradicazione è drammaticamente aumentato in molti paesi a causa della resistenza agli antibiotici tanto che la terapia nella pratica clinica sta diventando progressivamente più difficile. E' il quadro che emerge da una revisione dei dati presenti in letteratura (12). Dal momento che l'Hp è stato riconosciuto come agente patogeno umano con un ruolo cardine nello sviluppo di alcune malattie tra cui ulcera peptica e neoplasie gastriche è evidente che la terapia eradicante risulta mandatoria ogni qualvolta questa infezione viene individuata al fine di ridurre le probabilità di cancerogenesi associata a questa infezione e circoscrivere la popolazione colonizzata riducendo la diffusione di questa infezione. Dal 1996 le Linee guida internazionali hanno stabilito che la terapia standard di prima linea è rappresentata da 7-10 giorni di trattamento con un inibitore di pompa protonica (PPI) più claritromicina e amoxicillina (13). L'efficacia di questo trattamento è fortemente influenzata dalla resistenza al macrolide e negli ultimi anni si è assistito ad un declino del tasso di eradicazione al di sotto della soglia di accettabilità dell'80%. Così come riportato dalle recenti linee-guida di Maastricht IV la soglia del 20% di resistenza alla claritromicina dovrebbe essere adoperata per suddividere le Regioni ad alta da quelle a bassa resistenza indicando la prima linea come terapia

solo in queste ultime regioni (13). Anche la triplice terapia a base di claritromicina e metronidazolo e PPI non dovrebbe essere utilizzata nelle aree geografiche come l'Italia dove la resistenza alla claritromicina supera il 20% (13). L'uso di un chinolonico in prima linea sembrava essere una soluzione efficace nell'eradicazione nelle aree con elevata resistenza ai macrolidi, tuttavia la crescente prevalenza di ceppi Hp resistenti ai chinolonici ha ridotto l'efficacia di eradicazione di questa terapia ed attualmente è raccomandata in popolazioni che mostrano un tasso di resistenza alla claritromicina superiore al 20% ma con prevalenza inferiore al 15% dei ceppi di Hp resistenti alla levofloxacina o simili. La terapia sequenziale (PPI e amoxicillina seguita da triplice terapia) sembra abbia migliorato i tassi di eradicazione fino al 90% nelle suddette popolazioni come pure la terapia concomitante a base di amoxicillina, claritromicina e metronidazolo e PPI. La quadruplica terapia a base di Sali di bismuto e tetraciclina, metronidazolo e PPI raccomandata nelle aree geografiche ad alta frequenza di resistenza alla claritromicina e al metronidazolo ha ulteriormente migliorato i tassi di eradicazione in queste aree geografiche sebbene la disponibilità dei Sali di bismuto in alcune di queste aree ne rappresenti un limite. Le linee guida internazionali indicano infine la necessità di testare la sensibilità del batterio agli antibiotici nei casi in cui si verificano ripetuti fallimenti nell'eradicazione (13).

Da quanto riportato appare chiara la necessità di fornire un quadro epidemiologico ben definito dei tassi di resistenza agli antibiotici usati nelle terapie di eradicazione non solo di prima e seconda linea ma anche nei confronti di quegli antibiotici considerati di salvataggio dal momento che l'uso stesso di queste molecole salvavita ne riduce progressivamente l'efficacia terapeutica su vasta scala di popolazione. In questo contesto si inserisce il focus dello studio di farmacovigilanza relativo all'infezione da *Helicobacter pylori* il cui obiettivo è proprio quello di fornire dati statisticamente significativi circa le prevalenze dei ceppi Hp resistenti a specifici antibiotici. L'isolamento dei ceppi vitali di Hp da pazienti sintomatici e non, permette in questo studio di analizzare la frequenza dei fenomeni di resistenza ai farmaci che costituiscono la prima, seconda e terza linea di eradicazione, oltre che della frequenza di resistenza agli antibiotici non standard indicati come alternativa nei casi di infezione sostenuta da ceppi Hp multiresistenti come la rifampicina. L'isolamento colturale risulta quindi essenziale al fine di saggiare l'antibiotico resistenza dei ceppi riscontrati. Sono stati testati quindi i seguenti antibiotici: claritromicina, amoxicillina, metronidazolo, levofloxacina, tetraciclina e rifampicina.

Le caratteristiche fenotipiche di antibiotico-resistenza sono state determinate seguendo le linee guida indicate nel documento ufficiale dell' European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Per ogni ceppo isolato è stata misurata la minima concentrazione inibente (MIC) rispettivamente per ognuno dei sei antibiotici indicati mediante l'utilizzo di strisce reattive (ϵ -TEST) su gradiente di concentrazione. I dati ottenuti circa le MIC sono stati confrontati con i breakpoint specifici per l'Hp riportati dall'EUCAST al fine di indicare il fenotipo isolato come resistente, sensibile o intermedio (15). Per ognuno dei 34 ceppi raccolti sono state definite le MIC relative ai sei farmaci scelti ed i dati preliminari raccolti sono riportati nel grafico 2.

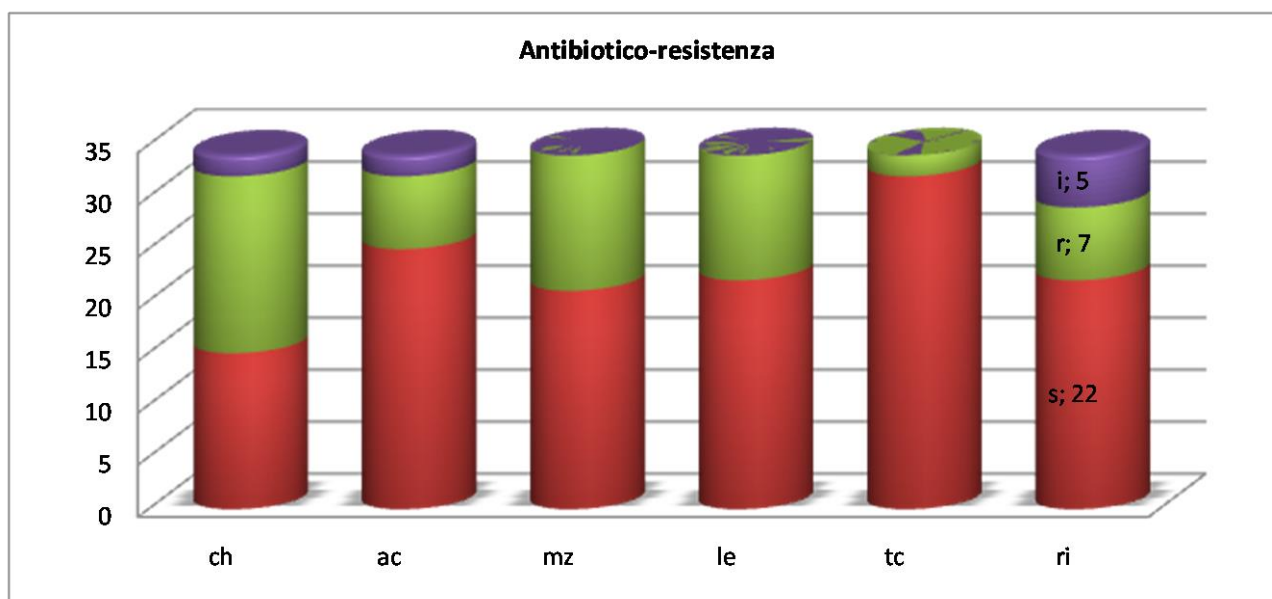


Grafico 2: Frequenza della antibiotico-resistenza. 34 ceppi isolati sono stati esaminati mediante ϵ -test per determinare la MIC relativa ai sei antibiotici testati (ch, claritromicina; ac, amoxicillina; mz, metronidazolo; le, levofloxacina; tc, tetraciclina; ri, rifampicina). Ogni ceppo è stato classificato come resistente, sensibile o intermedio (r, verde; s, rosso; i, viola) in funzione delle MIC.

Da questi dati emerge che la metà dei ceppi isolati risulta resistente alla claritromicina (50%) ed anche la prevalenza dei ceppi resistenti al metronidazolo e alla levofloxacina è risultata alta (rispettivamente del 38.2% e del 35.3%) sebbene non quanto quella trovata per la claritromicina. Mentre la frequenza del fenotipo resistente rispettivamente all'amoxicillina, alla tetraciclina e alla rifampicina risulta ancora relativamente bassa (rispettivamente del 20.6%, 5.9 % e del 20.6%). E' interessante notare che mentre la claritromicina è uno dei farmaci utilizzati nella terapia di prima linea e la prevalenza dei fenomeni di resistenza a questo macrolide è un dato acquisito sebbene sottostimato (viene riportato per il fenotipo claritromicina resistente una prevalenza del 20% circa), il metronidazolo costituisce una delle componenti delle medicazioni di ultima generazione utilizzata nell'eradicazione dell'infezione da Hp (14). Questi dati preliminari mettono in luce infatti che il tasso di resistenza a questo nitroimidazolo ricalca la situazione fotografata più recentemente negli Stati Uniti dove è stata riportata una elevata incidenza dei fenomeni resistenza a questo farmaco da parte dell'Hp imputabili in parte all'uso estensivo del metronidazolo per la cura di infezioni del tratto uro-genitale (16). Inoltre in base alle linee guida internazionali più recenti anche la levofloxacina in triplice terapia risulta sconsigliata nel territorio testato dal momento che il tasso di fenotipi Hp levofloxacina-resistenti in questa popolazione risulta superiore di gran lunga al 15% indicato come breakpoint per la scelta di questo antibiotico.

L'ampia base dei criteri di inclusione scelti in questo progetto di ricerca ha permesso l'isolamento di Hp principalmente da pazienti che non avessero avuto precedenti esposizioni terapeutiche ad uno specifico farmaco pertanto indicati come "naive" per le terapie eradicanti, i quali non essendo mai stati sottoposti a trattamenti di eradicazione forniscono una fotografia dell'epidemiologia delle farmaco-resistenze primarie presenti nella nostra popolazione. Nel Grafico 3 è riassunta la suddivisione della popolazione saggiata per la ricerca colturale di *H. pylori* in classi (positività/negatività) e sottoclassi in funzione dell'eventuale trattamento eradicante precedentemente effettuato (pazienti naive/pazienti già trattati). La suddivisione dei ceppi isolati da

pazienti naive, in resistenti, sensibili, intermedi rispettivamente ad ognuno dei sei farmaci antibiotici testati è invece schematizzata nel Grafico 4.

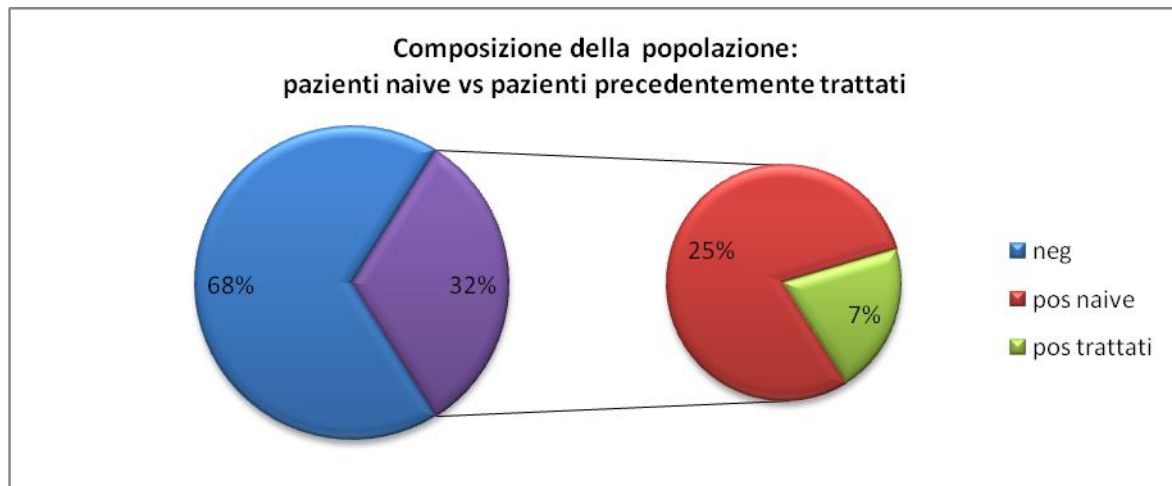


Grafico 3: Composizione della popolazione: su 106 pazienti analizzati 34 (viola) sono risultati positivi per la ricerca dell'*Helicobacter pylori*. 27 di questi non erano mai stati precedentemente trattati con terapie eradicanti specifiche (rosso) mentre 7 pazienti positivi provenivano da precedenti tentativi eradicanti tuttavia risultati fallimentari (verde).

Dal momento che i trattamenti con terapie eradicanti fallimentari esercitano una pressione selettiva che seleziona ceppi resistenti ad un determinato antibiotico, negli studi di farmaco-resistenza è importante andare a valutare la prevalenza dei fenotipi che mostrano una resistenza primaria. Allo scopo in questo studio sono stati raccolti anche dati circa le eventuali terapie effettuate precedentemente dai pazienti arruolati e si è valutata la resistenza anche in funzione di questa sotto-classificazione della popolazione. I dati sono riassunti nel Grafico 5.

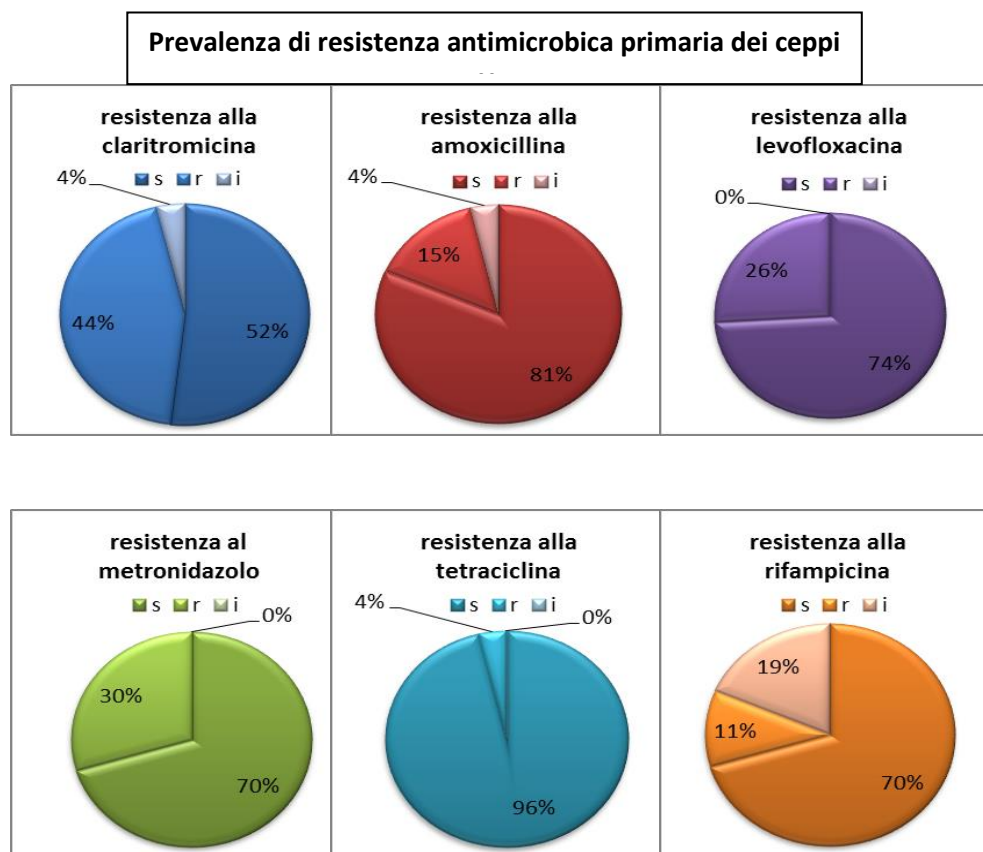


Grafico 4: Percentuali del numero di ceppi resistenti/sensibili/intermedi rispettivamente a claritromicina, amoxicillina, levofloxacina, metronidazolo, tetraciclina e rifampicina riscontrate tramite metodo ϵ -test nei ceppi isolati da pazienti naive. (r= resistente, s= sensibile, i= intermedio).

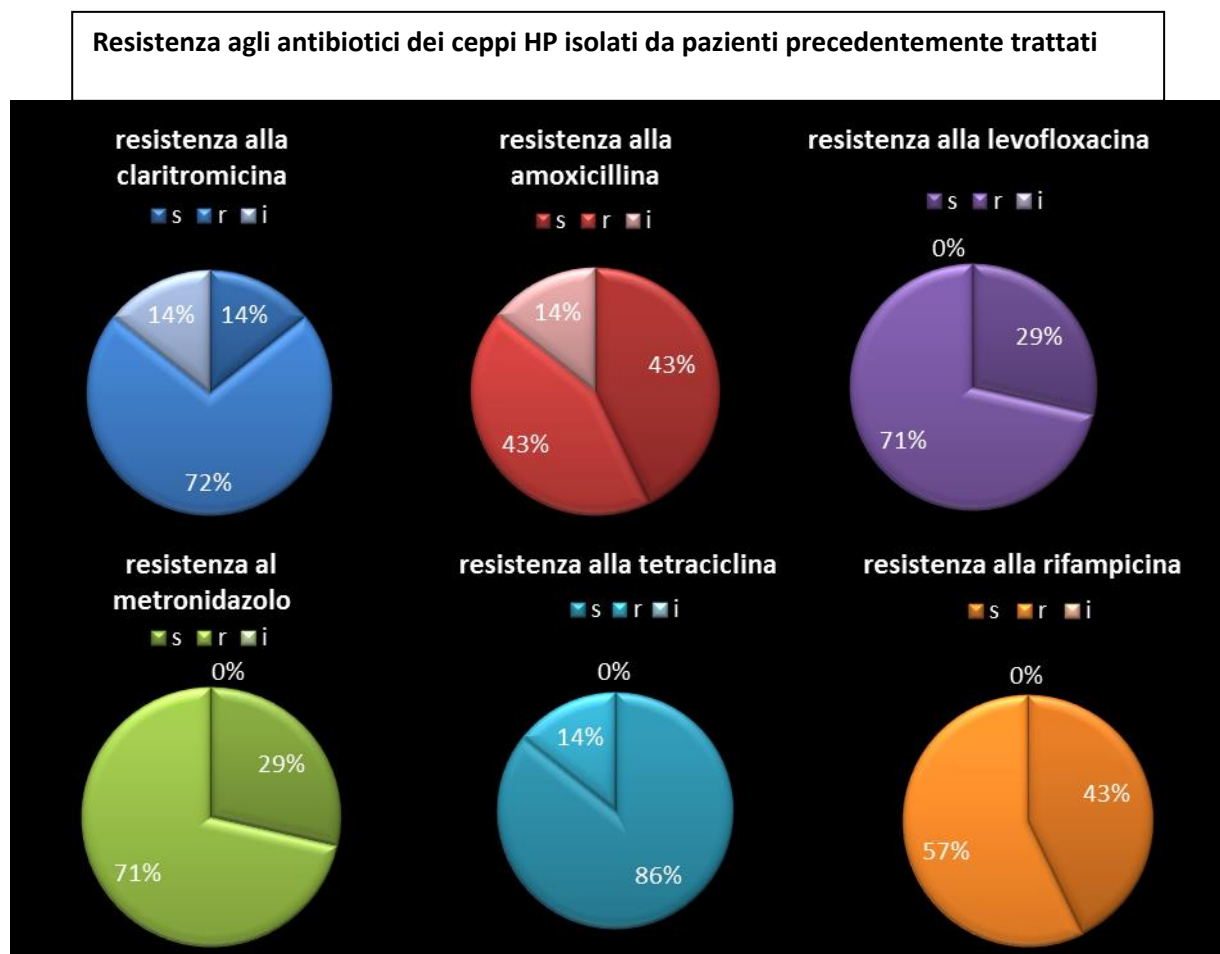


Grafico 5: Percentuali del numero di ceppi resistenti/sensibili/intermedi rispettivamente a claritromicina, amoxicillina, levofloxacina, metronidazolo, tetraciclinae rifampicina riscontrate tramite metodo ϵ -test nei ceppi isolati da pazienti precedentemente sottoposti a terapia eradicante fallimentare. (r= resistente, s= sensibile, i= intermedio).

Dati interessanti sebbene preliminari, sono emersi proprio dall'analisi delle antibiotico-resistenze nei ceppi provenienti da pazienti naive a confronto con quelle rilevate nei ceppi provenienti da pazienti precedentemente trattati con terapie empiriche ad esito fallimentare (Grafico 4 e 5).

Sebbene la frequenza del fenotipo claritromicina-resistente sia notevolmente più alta nei pazienti con alle spalle una terapia fallimentare (72%), anche la frequenza con cui è stato riscontrato questo fenotipo in pazienti naive è molto alta (42%), mentre una distribuzione delle resistenze per il metronidazolo, amoxicillina e levofloxacina è maggiore nei ceppi non sottoposti a stress selettivo da precedenti terapie eradicanti. Come si può osservare dal terzo grafico riportato nella popolazione screenata la frequenza con cui si presentano ceppi Hp tetraciclina resistenti, siano essi pazienti naive o pazienti precedentemente trattati, risulta estremamente bassa.

Nell'ottica di fornire dati circa le resistenze primarie relative ai ceppi di *Helicobacter pylori* isolati nel territorio Italiano, il gruppo di ricerca che attualmente conduce questo studio è stato inserito nel Quarto Studio Europeo Multicentrico sulla sensibilità agli antibiotici (2018) i cui ricercatori proponenti sono Francis Megraud (Laboratoire de Bactériologie-Enfants Hôpital Pellegrin 33076

Bordeaux Cedex, France) e Youri Glupczynski (Pharmacologie cellulaire et moléculaire et Centre de pharmacie clinique, Louvain Drug Research Institute, Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium). Lo studio includerà 50 o più pazienti che non hanno mai fatto terapie di eradicazione dell'Hp. Verrà testata la resistenza primaria dell'Hp mediante ε -test alla claritromicina, al metronidazolo, alla levofloxacin e all'amoxicillina e mediante disk diffusion alla tetraciclina e alla rifampicina. I ceppi raccolti saranno conservati alla temperatura di -80°C e successivamente inviati al laboratorio di riferimento (Laboratoire de Bactériologie-Enfants Hôpital Pellegrin 33076 Bordeaux Cedex, France). Questo studio multicentrico viene effettuato ogni 10 anni per monitorare l'evoluzione della resistenza primaria in questo batterio ai farmaci eradicanti.

Lo stoccaggio dei ceppi ha permesso di renderli disponibili inoltre per la successiva fase che ha già preso avvio nella quale si effettueranno indagini di tipo molecolare costituenti la seconda parte del progetto di ricerca ad aventi come scopo la caratterizzazione genotipica dei fenotipi farmaco-resistenti.

La claritromicina è un antibiotico che appartiene alla classe dei macrolidi, i quali agiscono legando la subunità 50S del ribosoma batterico impedendo la sintesi proteica. La resistenza a questo farmaco è dovuta soprattutto a mutazioni puntiformi nella regione peptidil-trasferasica del rRNA 23S. Nel genoma dell'*H. pylori*, il gene del rRNA 23S è presente in duplice copia, ben 8 mutazioni nella regione peptidil-trasferasica (A2115G, G2141A, A2142G, A2142C, A2142T, A2143G, A2143C e T2182C) sono state associate alla resistenza alla claritromicina. Si è comunque osservato che la maggior parte dei casi di resistenza primaria alla claritromicina è dovuta a tre mutazioni (A2142C, A2142G e A2143G) (17).

Al fine di perseguire la caratterizzazione genotipica dei ceppi resistenti si sta procedendo allo screening dei ceppi isolati con indagini di tipo molecolare che prevedono per i ceppi Hp la ricerca delle mutazioni puntiformi indicate come le principali responsabili del fenotipo resistente ai macrolidi. L'identificazione delle 3 mutazioni di punto nel 23SrRNAS dell'*H. pylori* (A2142C, A2142G and A2143G) viene eseguita con la real-time PCR utilizzando il protocollo di Oleastro et al (18). In base ai dati raccolti sarà possibile anche studiare una correlazione tra le MIC misurate e la presenza di una o più mutazioni responsabili di resistenza alla claritromicina. Lo stesso screening sarà condotto per valutare la frequenza delle mutazioni conosciute responsabili della resistenza ai fluorochinoloni che intervengono a livello del gene che codifica per la girasi (gyr) e che possono essere di diverso tipo. Dal momento che in letteratura sono riportati alcuni dati circa l'associazione tra mutazioni nel genoma dell'*Helicobacter pylori* e l'acquisizione di un profilo di resistenza verso altri antibiotici e dal momento che ancora poco si conosce circa i patterns genici che denotano resistenza al metronidazolo alla tetraciclina e alla rifampicina. Dal momento che è stato possibile isolare diversi ceppi che mostrano resistenza a questi farmaci, si condurrà anche la genotipizzazione di questi ceppi che permetterà di delineare l'associazione tra genotipo mutato e fenotipo farmaco-resistente.

Pubblicazioni

In questo periodo, è stato inoltre possibile sottomettere un *case report* completo di *review* dei pochissimi casi riportati in letteratura di infezioni gastro-esofagee sostenute da *Actinomyces spp.* che mette in luce le tappe necessarie e fondamentali mediante i quali è stato possibile effettuare diagnosi di actinomicosi esofagea dal titolo "A case report of esophageal actinomycosis in an immunocompetent patient and review of the literature" in collaborazione con il Dottor Cuppone Renato (U. o.: C. di Endoscopia Digestiva) ed il Dottor Pirrelli Michele (U. O. C. di Anatomia

Patologica) e le Professoressa Monno Rosa e Fumarola Luciana (Dipartimento Sc. Mediche di Base, Neuroscienze ed Organi di Senso, Università degli studi di Bari “Aldo Moro”). Il prodotto scientifico (tracciato con il numero JIC-D-18-00057) è stato sottomesso presso la dalla rivista *Journal of Infection and Chemotherapy* edito dalla Springer (ISSN: 1341-321X I.F. 2016: 1.826) ed è in fase di review da parte degli editori.

Bibliografia

- 1 Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol.* 2003 May;98(5):975-86.
- 2 Abadi AT, Kusters JG. Management of *Helicobacter pylori* infections. *BMC Gastroenterol.* 2016 Aug 12;16(1):94.
- 3 Amieva M, Peek RM Jr. Pathobiology of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer. *Gastroenterology.* 2016 Jan;150(1):64-78.
- 4 Ang TL, Fock KM. Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J.* 2014 Dec;55(12):621-8.
- 5 Asaka M, Kato M, Sakamoto N. J Roadmap to eliminate gastric cancer with *Helicobacter pylori* eradication and consecutive surveillance in Japan. *Gastroenterol.* 2014 Jan;49(1):1-8.
- 6 Araújo MB, Borini P, Guimarães RC. Etiopathogenesis of peptic ulcer: back to the past? *ArqGastroenterol.* 2014 Apr-Jun;51(2):155-61
- 7 Luzzi F, Suraci E, Larussa T, Leone I, Imeneo M. High exposure, spontaneous clearance, and low incidence of active *Helicobacter pylori* infection: the Sorbo San Basile study. *Helicobacter* 2014; 19:296-305
- 8 Zagari RM, Bianchi Porro G, Fiocca R, Gasbarrini G, Roda E, Bazzoli F. Comparison of 1 and 2 weeks of omeprazole, amoxicillin and clarithromycin treatment for *Helicobacter pylori* eradication: the HYPER study. *Gut* 2007; 56(4):475-9
- 9 Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection..*Helicobacter.* 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5.
- 10 Kyriazanos LD, Ilias L, Gizaris V, Hountis P, Georgaklis V, Dafnopoulou A, Datsakis K. Seroepidemiology of *Helicobacter pylori* infection in hellenic navy recruits. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(6):501-4.
- 11 Kyriazanos LD, Ilias L, Lazaris G, Hountis P, Deros I, Dafnopoulou A, Datsakis K. A cohort study on *Helicobacter pylori* serology before and after induction in the Hellenic Navy. *Mil Med.* 2001 May;166(5):411-5.
- 12 Cui R, Zhou L. *Helicobacter pylori* infection: an overview in 2013, focus on therapy. *ChinMed J (Engl).* 2014 Feb;127(3):568-73)
- 13 P Malfertheiner, F Megraud, CAO'Morain, J P Gisbert, E J Kuipers, A T Axon, F Bazzoli, A Gasbarrini, J Atherton, D Y Graham, R Hunt, P Moayyedi, T Rokkas, M Rugge, M Selgrad, S Suerbaum, K Sugano, E M El-Omar, on behalf of the European *Helicobacter* and Microbiota Study Group and Consensus paneManagement of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report *Gut.* 2017 Jan;66(1):6-30.
- 14 Fontana C, Favaro M, Minelli S, Criscuolo AA, Pietrojusti A, Galante A, Favalli C. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002 Dec;46(12):3765-9.

- 15 Mégraud F, Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing. ClinMicrobiol Rev 2007;20:280-322
- 16 Meyer JM, Silliman NP, Wang W, Siepmann NY, Sugg JE, Morris D, Zhang J, Bhattacharyya H, King EC, Hopkins RJ. Risk factors for Helicobacter pylori resistance in the United States: the surveillance of H. pylori antimicrobial resistance partnership (SHARP) study, 1993-1999. Ann Intern Med. 2002 Jan 1;136(1):13-24.
- 17 De Francesco V1, Margiotta M, Zullo A, Hassan C, Valle ND, Burattini O, D'Angelo R, Stoppino G, Cea U, Giorgio F, Monno R, Morini S, Panella C, Ierardi E. Claritromycin resistance and Helicobacter pylori genotypes in Italy. J Microbiol. 2006 Dec;44(6):660-4.
- 18 Monteiro L, Oleastro M, Lehours P, Mégraud F. Diagnosis of Helicobacter pylori infection. Helicobacter. 2009 Sep;14 Suppl 1:8-14

Progetto: “Ricerca di nuovi biomarkers in grado di discriminare i pazienti IBD non responder alla terapia biologica” (Termine del progetto: 31/12/2019).

Responsabile: Dott. Marcello Chieppa

Partecipanti: Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott. Mario Correale (Patologia Clinica), Dott. Mauro Matronardi (Gastroenterologia 2), Dott.ssa Elisa Stasi (Gastroenterologia 2), Dott.ssa Margherita Curlo (Endoscopia Digestiva), Dott.ssa Grazia Serino (Contrattista), Dott. Vito Guerra (Centro Trial)

Introduzione

Le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) includono la colite ulcerosa (UC) ed il Crohn's disease (CD). Queste patologie debilitanti hanno una eziologia sconosciuta e genesi multifattoriale con diversi fattori tra cui componenti genetici, immunologici ed ambientali. Prima del 2001, la comparsa di CD era prevalentemente ritenuta un effetto di una mancata regolazione del sistema immunitario adattativo, ma la scoperta della mutazione NOD2/CARD15 ha cambiato questa percezione portando alla luce il ruolo fondamentale dell'immunità innata [1]. La proteina NOD2 è un pattern recognition receptor (PPR) che attiva il fattore nucleare NFκB in seguito al riconoscimento di una sequenza dei peptidoglicani batterici. La traslocazione di NFκB nel nucleo attiva la trascrizione di citochine pro-infiammatorie (TNFα, IL-1, IL-6 etc.) le quali a cascata possono influenzare numerose altre risposte. I pazienti con mutazioni del gene NOD2 sono caratterizzati da una aumentata permeabilità intestinale, questo sottolinea il legame tra IBD ed integrità della barriera epiteliale intestinale [2]. Inoltre, dal 2001 ad oggi sono state scoperte numerose altre mutazioni legate all'aumento del rischio di IBD, tra cui IL-23R/IL-12B, TL1A, ATG16L1, IRGM, e diversi TLRs [3]. E' importante sottolineare che eventuali mutazioni possono rendere inefficaci le terapie convenzionali, come nel caso della mutazione a carico di IL-10R per la quale è richiesta come unica alternativa terapeutica il trapianto di cellule staminali [4]. Ad eccezione del IL-10R, allo stato attuale delle conoscenze, non esiste un pannello di geni in grado di indirizzare le terapie farmacologiche più adatte al paziente. Un recente studio ha utilizzato parametri genetici e fenotipici di circa 30.000 pazienti affetti da IBD ed è riuscito a segregare CD a carico del colon e dell'ileo [5]. I recenti progressi nello studio del metagenoma intestinale hanno consentito di discriminare pazienti responder dai non responder alla terapia con anti-TNFα. Nei responder, il microbiota intestinale tornava a mostrare la biodiversità tipica di un controllo sano [6]. Sono anche stati descritti effetti benefici mediati dalla somministrazione di probiotici a pazienti

affetti da CD [7,8], mentre la presenza di *Faecalibacterium prausnitzii* è stata associata al rischio di recidiva in pazienti chirurgici [9]. Probabilmente, proprio la stocasticità dei fattori scatenanti l'IBD, determina un percorso/decorso terapeutico estremamente differente per ogni singolo paziente. Questi possono passare da periodi lunghi di remissione alla mancanza di risposta clinica alle terapie.

I dati storici del reparto di endoscopia digestiva del nostro IRCCS indicano come il 30% dei pazienti trattati con farmaci biologici anti TNF α non rispondono alla terapia, mentre, tra i responder, il 50% ha un calo/perdita di risposta con il prolungarsi dei trattamenti. Sappiamo che a queste percentuali contribuiscono in maniera fondamentale fattori ambientali. Tra questi fattori noti come il fumo che abbassa da 73 a 22 la percentuale dei responder e al 6 la percentuale dei pazienti con risposta prolungata [10,11]. L'insieme dei fattori ambientali che possono influenzare l'andamento della patologia viene definito *esposoma* ed include anche l'utilizzo di immunosoppressivi, aspetto importante per l'efficacia della risposta terapeutica.

L'insieme di variabili genetiche, immunologiche, microbiologiche ed ambientali porta alla sensazione che all'interno del grande contenitore IBD ci siano un ventaglio di patologie dalle cause diverse, ma con manifestazioni patologiche simili. Alcune tra queste patologie sono trattabili con le strategie attuali, mentre per le altre bisognerebbe intraprendere percorsi terapeutici alternativi.

L'introduzione delle terapie biologiche ha portato enormi vantaggi per i pazienti, ma allo stato attuale delle conoscenze non siamo in grado di distinguere preventivamente i pazienti responder dai non responder, anche se, grazie al dosaggio del farmaco in circolo e degli anticorpi anti-farmaco biologico siamo in grado di "personalizzare" i trattamenti per renderli più efficaci. La vera spearazione tra responder e non responder è possibile solo con l'osservazione del decorso clinico del paziente dopo un minimo di 3 mesi di infusioni, con un notevole dispendio economico (stimabile in circa 10.000 euro/paziente) e disagi per i pazienti.

La nostra proposta si inserisce nelle nuove linee per il miglioramento degli approcci terapeutici e lo sviluppo della "medicina di precisione".

La prima parte del progetto sarà la definizione di un percorso diagnostico nuovo e condiviso tra reparti differenti del nostro istituto. La comunicazione e lo scambio di informazioni sarà fondamentale ed indispensabile per il successo del progetto; riunioni bisettimanali serviranno a discutere i risultati e coordinare il lavoro di tutti i gruppi coinvolti. I risultati degli esami diagnostici (standard) verranno ordinati in una cartella clinica sperimentale in grado di accogliere i dati sperimentali ottenuti durante la seconda fase del progetto. La cartella subirà un continuo processo di miglioramento per rispondere alle esigenze o criticità evidenziate nel corso del progetto.

La seconda fase, che comincerà solo dopo aver individuato e caratterizzato con estrema precisione un numero minimo di 20 non responder e 20 responder. Utilizzeremo un ventaglio di analisi multi-omiche e diagnostiche non-convenzionali. Tra queste alcune già standardizzate, quali ad esempio la misurazione del anti-TNF circolante e di eventuali anticorpi anti-farmaco, in parallelo misureremo i livelli tissutali di TNF [12] ed anti-TNF mediante immunoistochimica. Valuteremo il microbiota intestinale. Dai campioni di feci, raccolte il giorno prima della visita endoscopica, estrarremo il DNA batterico che verrà sequenziato per evidenziare eventuali differenze tra responder e non-responder prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF. Paragoneremo i due gruppi utilizzando il multiplex per valutare un ampio spettro di citochine infiammatorie presenti nel siero e valuteremo i micro-RNA circolanti. Mediante analisi laboratoristiche monitoreremo anche markers legati al metabolismo del ferro (quali ferritina ed epcidina) che dai nostri dati preliminari risultano fondamentali per la risposta immunitaria infiammatoria[13], proteine dal ruolo anti-

infiammatorio (ad es. SLPI [14] e la calprotectina sierica [15]). Utilizzeremo anche le analisi sulla saliva dei pazienti, in quanto, eventuali riscontri positivi, ci permetterebbero di monitorare la risposta dei pazienti in maniera assolutamente non invasiva. Le analisi proteomiche effettuate sulle urine permetteranno di ottenere un profilo metabolomico dei pazienti, questo aspetto è un altro importante pezzo del puzzle che potrebbe fornire dei metaboliti da utilizzare come candidati per lo screening e la separazione tra responder e non responder.

Durante la terza fase, i dati ottenuti verranno analizzati e paragonati. La validazione statistica delle analisi verrà coordinata dal Dr. Guerra al fine di individuare candidati da validare in un secondo ciclo di sperimentazione. I biomarkers individuati verranno validati mediante immunoistochimica in maniera prospettica sui tessuti biotici dei pazienti facenti parte dello studio e mediante l'archivio storico del reparto di anatomia patologica. Utilizzando campioni provenienti da pazienti affetti da patologie diverse da quelle studiate, potremo validare anche la specificità dei biomarker selezionati. Inoltre, mediante l'utilizzo di modelli murini, geneticamente predisposti allo sviluppo di UC, utilizzeremo i dati ottenuti durante le prime due fasi dello studio, per sviluppare approcci terapeutici alternativi e mirati al trattamento, incluso il trattamento nutrizionale, dei non responder[16-17].

- [1] Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol*. 2003 Jul;3(7):521-33. Review.
- [2] Bachmann C, et al. Targeting mucosal addressin cellular adhesion molecule (MAdCAM)-1 to noninvasively image experimental Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006;130:8-16.
- [3] Liu JZ , van Sommeren S , Huang H et al. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 2015 ; 47 : 979 – 89.
- [4] Kotlarz D , Beier R , Murugan D et al. Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy . *Gastroenterology* 2012 ; 143 : 347 – 55.
- [5] Cleynen I , Boucher G , Jostins L et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet* 2015 ; 6736 : 1 – 12.
- [6] Kolho K-L , Korpela K , Jaakkola T et al. Fecal microbiota in pediatric inflammatory bowel disease and its relation to inflammation . *Am J Gastroenterol* 2015 , 921 – 30
- [7] Bamias G, Okazawa A, Rivera-Nieves J, Arseneau KO, De La Rue SA, Pizarro TT, Cominelli F. Commensal bacteria exacerbate intestinal inflammation but are not essential for the development of murine ileitis. *J Immunol* 2007;178:1809-18.
- [8] Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F. Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995;154:2434-40.
- [9] Sokol H , Pigneur B , Watterlot L et al. Faecalibacterium prausnitzii is an antiinflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 16731 – 6 .
- [10] Parsi MA , Achkar J-P , Richardson S et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease . *Gastroenterology* 2002 ; 123 : 707 – 13
- [11] Rubin DT , Hanauer SB . Smoking and inflammatory bowel disease . *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000 ; 12 : 855 – 62 .

- [12] Atreya R , Neumann H , Neufert C et al. In vivo imaging using fluorescent antibodies to tumor necrosis factor predicts therapeutic response in Crohn's disease . Nat Med 2014 ; 20 : 313 – 8.
- [13] Dendritic Cells Modulate Iron Homeostasis and Inflammatory Abilities Following Quercetin Exposure. Galleggiante V. et al. Curr Pharm Des. 2017;23(14):2139-2146.
- [14] Secretory leukoprotease inhibitor is required for efficient quercetin-mediated suppression of TNF α secretion. De Santis S, et al. Oncotarget. 2016 Oct 3. doi: 10.18632/oncotarget.12415
- [15] Meuwis M-A , Vernier-Massouille G , Grimaud JC et al. Serum calprotectin as a biomarker for Crohn's disease . J Crohn Colitis 2013 ; 7 : 678 – 83
- [16] Polyphenol administration impairs T-cell proliferation by imprinting a distinct dendritic cell maturational profile. Delvecchio FR, et al. Eur J Immunol. 2015 Sep;45(9):2638-49
- [17] Administration of reconstituted polyphenol oil bodies efficiently suppresses dendritic cell inflammatory pathways and acute intestinal inflammation. Cavalcanti E, et al. PLoS One. 2014 Feb 18;9(2):e88898
- [18] De Santis S. et al. TNF α deficiency results in increased IL-1 β in an early onset of spontaneous murine colitis. Cell Death Dis. 2017 Aug 10;8(8):e2993.

Obiettivi del progetto

Obiettivo specifico 1: Miglioramento degli standard di valutazione dei pazienti con presunto IBD

Obiettivo specifico 2: Stratificazione del campione in base alla risposta al trattamento con farmaco biologico

Obiettivo specifico 3: Individuazione e validazione di biomarkers predittivi

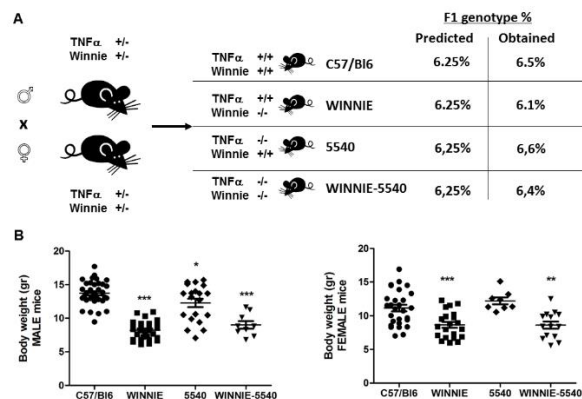
Attività svolta

Il progetto è attualmente in corso.

Abbiamo ottenuto l'autorizzazione allo studio dal comitato etico il 04/08/2017.

Attualmente non abbiamo attuato un protocollo per la raccolta delle biopsie secondo gli standard descritti del progetto, questo ha influito negativamente sulla catena di analisi laboratoristiche, abbiamo quindi concentrato gli sforzi sullo studio dei modelli murini di colite ulcerosa al fine di ottenere biomarkers utili per la diagnosi precoce.

Utilizzando modelli animali caratterizzati da infiammazione intestinale spontanea TNF α -

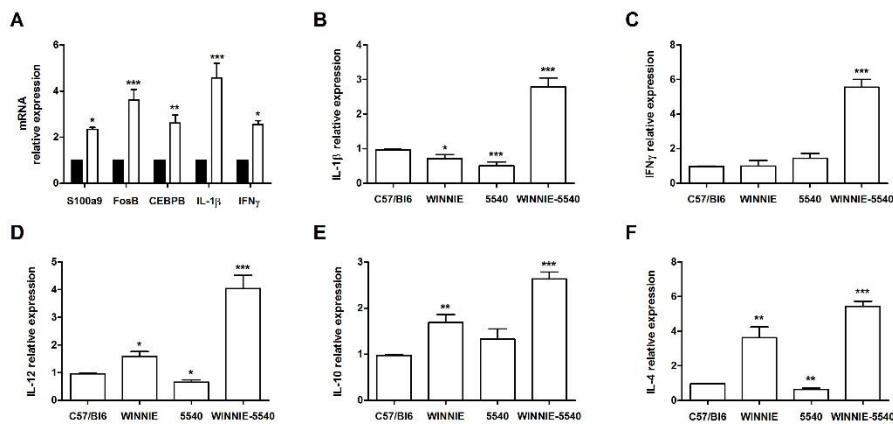


indipendente (Figura 1) abbiamo individuato due target infiammatori innovativi, tra i quali l'interleuchina infiammatoria IL-1 β sembra essere particolarmente interessante (Figura 2). [18]

Approfittando dei campioni biologici raccolti dal laboratorio di patologia clinica per l'analisi dell'anticorpo anti-farmaco sviluppato dai pazienti trattati con infliximab, abbiamo cominciato la valutazione dei livelli di TNF α ed IL-1 β . Attualmente abbiamo esaminato il siero di 41 pazienti dei quali 25 è risultato positivo a TNF α , 11 ad IL-1 β . In 7 casi

la positività al TNF α coincideva con quella ad IL-1 β .

Per l'analisi dei sieri dei pazienti afferiti presso l'Ambulatorio delle IBD, nei giorni programmati per l'infusione della terapia biologica, sono stati determinati i seguenti parametri metabolici: glucosio, colesterolo HDL, colesterolo LDL, trigliceridi, insulina, ferro, ferritina, vitamina D. Mediante i valori di glicemia ed insulinemia è stato effettuato l'HOMA test.



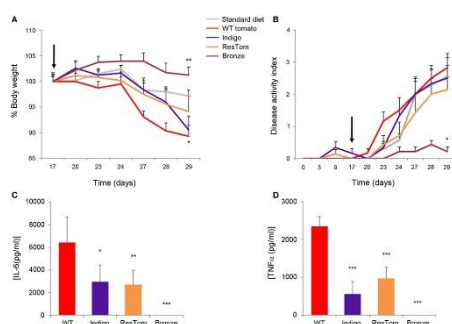
Inoltre, si è proceduto a verificare lo stato infiammatorio dei pazienti mediante determinazione della proteina C reattiva. Sono stati arruolati 18 pazienti, ritornati in media per quattro volte. Nonostante l'esiguo numero di campioni

raccolti, abbiamo analizzato le variazioni dei parametri nel corso delle infusioni.

I risultati indicano che glicemia, colesterolemia e vitamina D non variano durante la terapia. Insulinemia, colesterolo LDL e HOMA diminuiscono, mentre aumenta il colesterolo HDL, facendo pensare ad un miglioramento dell'insulino-resistenza. Aumentano i trigliceridi probabilmente in relazione alla ripresa clinica del paziente. In netto aumento è il ferro (mentre la ferritina diminuisce), che da sottoglia diventa normale e la Proteina C reattiva, che rientra nel range di riferimento.

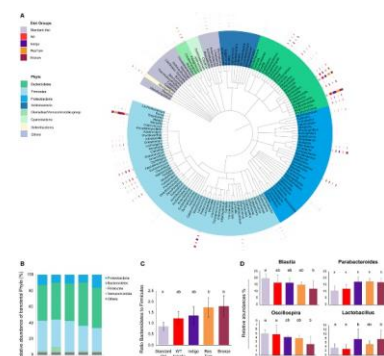
Il numero di pazienti ed ad oggi troppo ristretto per poter associare la positività ad IL-1 β con i pazienti non responder ad infliximab, ma abbiamo avviato uno studio pre-clinico su modelli murini di infiammazione intestinale TNF α -indipendente. Tale studio prevede la somministrazione di Anakinra (IL-1Ra) al fine di neutralizzare l'IL-1 β e valutare gli effetti sull'infiammazione (intestinale e sistemica).

Ad oggi, l'obiettivo 1 non è stato raggiunto, mentre sono in corso diversi studi paralleli per portare avanti l'obiettivo 2 e 3. Auspichiamo che nel 2018 sia possibile coordinare l'attività clinica con l'attività laboratoristica e di ricerca anche grazie alla piattaforma finanziata dal progetto INNONETWORK.



Abbiamo infine investito molto nello studio degli effetti immunomodulanti degli estratti naturali di origine vegetale.

Abbiamo valutato gli effetti antiinfiammatori di numerose matrici vegetali individuandone il meccanismo di azione ed il pathway molecolare indotto da queste sostanze.



Ultimamente, grazie alla collaborazione con il John Innes Centre di Norwich, nel Regno Unito, siamo riusciti ad ottenere del mangime arricchito da pomodoro arricchiti in flavonoidi e stilbenoidi. In nostri studi su modelli animali nutriti con queste linee sperimentali, hanno dimostrato la potenzialità dell'approccio nutrizionale (Figura 3). Questi topi risultano infatti meno

suscettibili a sviluppare infiammazione intestinale cronica. Inoltre, i mangimi fortificati hanno dimostrato un profondo effetto sulla modulazione del microbiota intestinale, aspetto fondamentale nel contesto della prevenzione della disbiosi tipica dei pazienti IBD (Figura 4).

Questo articolo, recentemente pubblicato dal giornale *Frontiers in Nutrition*, ha suscitato notevole interesse. Abbiamo infatti deciso di proseguire con questo studio utilizzando i nostri modelli animali prima di provare questo approccio per i pazienti non responder.

Risultati conseguiti

- 1- Individuazione di possibili marker predittivi per pazienti affetti da colite ulcerosa TNF α indipendente. L'analisi dell'IL-1 β sarà oggetto del nostro prossimo scale up
- 2- Individuazione di principi bioattivi potenzialmente in grado di migliorare la risposta clinica dei pazienti
- 3- Approvazione di studi su modelli animali per valutare l'efficacia della somministrazione di anti-IL1 β in modelli di colite ulcerosa TNF α indipendente.

Progetto: “Ruolo dei miRNA nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali: dal modello murino all'uomo” (Termine del progetto: 31/12/2019).

Responsabile: Dott.ssa Grazia Serino

Partecipanti: Dott.ssa Caruso Maria Lucia (Anatomia Patologica), Dott. Mario Correale (Patologia Clinica), Dott. Mauro Matronardi (Gastroenterologia 2), Dott.ssa Elisa Stasi (Gastroenterologia 2), Dott.ssa Margherita Curlo (Endoscopia digestiva), Dott.ssa Grazia Serino (Contrattista), Dott. Vito Guerra (Centro Trial)

Introduzione

La malattia di Crohn (CD) e la colite ulcerosa (UC), comunemente note come malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI o secondo la nomenclatura anglosassone IBD, inflammatory bowel diseases), sono patologie idiopatiche caratterizzate da uno stato flogistico del tratto gastroenterico ad andamento cronico recidivante.

L'eziologia delle malattie infiammatorie croniche intestinali non è ancora nota ma è attualmente ipotizzata un'origine multifattoriale. La predisposizione genetica è uno degli elementi preponderanti come dimostra l'aumentata percentuale di IBD nei parenti di persone affette (1). Riguardo i geni responsabili, sono ancora pochi i dati certi a disposizione, ma sono state identificate regioni di suscettibilità in almeno 12 cromosomi.

Nella patogenesi delle IBD l'elemento più importante è l'alterazione dell'equilibrio immunitario a livello della mucosa intestinale che determina una risposta inappropriata ad antigeni normalmente presenti nel lume intestinale, tra cui la flora batterica.

Il preciso meccanismo ancora non è conosciuto ma il difetto primario delle cellule epiteliali (ECs) intestinali può scatenare una cascata di eventi che termina con l'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario (2). L'epitelio intestinale rappresenta una barriera chimica, fisica ed elettrica ed è separato dal microbiota luminale da uno strato di muco spesso 50 μ m (3) dove il maggiore componente dello strato interno è Muc2. Lo studio del Dr. Eri dell'Università della Tasmania in Australia (4-5) ha dimostrato che una mutazione missenso nel gene di Muc2 in modelli murini chiamati Winnie determina la riduzione dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale. È stato dimostrato che, a livello della mucosa intestinale, la comunicazione tra le cellule dell'immunità innata e l'epitelio gioca un ruolo critico nella regolazione dell'omeostasi e

dell'infiammazione. La recente scoperta delle cellule linfoidi innate (ILCs) ha aggiunto un importante tassello nel campo dell'immunologia. Le ILCs, di cui esistono tre tipi (ILC1s, ILC2s e ILC3s localizzate in differenti organi) sono implicate nella regolazione dell'omeostasi immunologica e nella risposta infiammatoria contro allergeni e infezioni batteriche (6-8). Sebbene la popolazione delle ILCs nell'intestino rappresenta solo una piccola porzione dei linfociti totali, esse possono contribuire nella patogenesi dell'IBD poiché in risposta ai segnali derivanti dai batteri, dalle cellule mieloidi e dalle cellule epiteliali producono immediatamente grandi quantità di citochine (9-10). Ad esempio, segnali provenienti dall'epitelio come IL-7 sono importanti per la funzione delle ILC3s poiché portano ad una maggiore infiammazione a livello della mucosa intestinale (11).

Inoltre è stato dimostrato un critico meccanismo di feedback in cui l'epitelio danneggiato attiva le ILCs a riparare le funzioni della barriera epiteliale (12). Pertanto, lo studio del crosstalk esistente tra ILCs e l'epitelio intestinale nell'IBD, potrebbe condurci alla comprensione del meccanismo alla base della disregolazione dell'omeostasi intestinale e quindi della patogenesi dell'IBD.

Negli ultimi anni, nella ricerca medica particolare interesse hanno destato delle piccole molecole di RNA chiamate microRNA (miRNA) che regolano l'espressione di geni inibendo la trascrizione di RNA messaggero in proteine o favorendo la degradazione dell'RNA messaggero di specifici geni. Diversi studi dimostrano anche che i miRNA giocano un ruolo importante in molte patologie umane come le neoplasie. Inoltre, è stato dimostrato che esiste un profilo unico di espressione dei miRNA per ogni malattia e che l'espressione alterata di uno o più miRNA è specifico di ogni patologia. Per questi motivi, i miRNA potrebbero essere utilizzati sia come potenziali target terapeutici sia come nuovi biomarcatori predittivi e/o diagnostici di malattia.

Diversi lavori hanno studiato il ruolo dei miRNA nelle IBD dimostrandone il loro coinvolgimento nella patogenesi (13-14). Tuttavia, il limite della maggior parte degli studi esistenti è rappresentato dal materiale di partenza su cui è stato effettuato il profiling dei miRNA, infatti il tessuto in toto è costituito da una eterogeneità cellulare che rende difficile la comprensione dei risultati ottenuti.

In primo luogo, il tessuto intestinale comprende distretti distinti dal punto di vista anatomico e funzionale. Inoltre, a sua volta, la mucosa stessa è composta da diversi tipi cellulari tra cui linfociti, monociti e residue, microflora e loro prodotti. Considerando l'importanza della plasticità fenotipica dei diversi tipi cellulari nel tratto gastrointestinale, esaminare il profilo di espressione dei miRNA nelle cellule epiteliali dell'intestino e nelle ILCs è il primo passo per identificare i miRNA direttamente coinvolti nella patogenesi della IBD.

Scopo di questo progetto è analizzare l'espressione dei miRNA nelle cellule epiteliali e nelle ILCs isolate dal grande intestino di topi Winnie al fine di identificare nuovi target terapeutici e/o biomarcatori che potrebbero migliorare la comprensione della patogenesi delle IBD e quindi rendere più specifica la terapia e la diagnosi.

Obiettivi del progetto

- 1) Identificazione del pattern specifico di miRNA nelle cellule epiteliali e nelle ILCs isolate da diverse porzioni di colon di topi Winnie ponendo particolare attenzione ai miRNA coinvolti nella comunicazione tra i due tipi cellulari.
- 2) Identificazione dei target molecolari dei miRNA individuati e successiva caratterizzazione funzionale.
- 3) Validazione dei risultati ottenuti nel modello murino su campioni di colon provenienti da pazienti affetti da colite ulcerosa.

Attività svolta

Il modello animale Winnie caratterizzato nel nostro Istituto rappresenta un ottimo modello per lo studio della colite ulcerosa. Questo modello animale, infatti, è geneticamente predisposto a sviluppare la colite ulcerosa e mostra a livello fenotipico e a livello istologico i segni dell'infiammazione intestinale (perdita di peso, feci molli caratterizzate da presenza di sangue e sopravvivenza ridotta).

Al raggiungimento delle 16 settimane i topi sono stati sacrificati, i tessuti di colon di topi Winnie e wild-type sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento delle cellule epiteliali da tessuto.

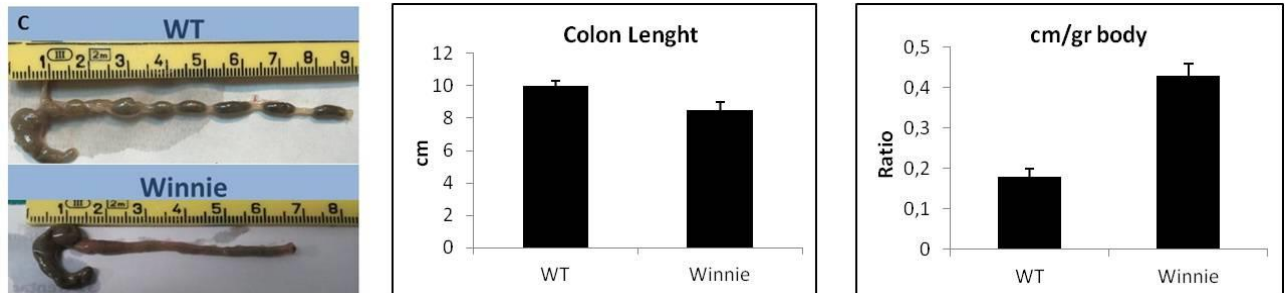
I pezzi di colon sono stati prelevati da 4 topi Winnie e 4 topi wild-type e sottoposti a digestione meccanica con il gentleMACS™ Dissociator ed enzimatica utilizzando il kit Lamina Propria Dissociation kit per topo (Miltenyi Biotec). La sospensione cellulare è stata in seguito utilizzata per selezionare le cellule epiteliali (EpCAM⁺) mediante separazione immunomagnetica positiva con biglie magnetiche coniugate con anticorpi per il marcatore EpCAM(CD326). Allo scopo di determinare la purezza delle cellule isolate, al termine della separazione è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica con l'anticorpo EpCAM-PE (Miltenyi Biotec). Sono stati utilizzati solo campioni con una purezza di cellule EpCAM⁺ superiore al 90%. Inoltre, visto che il marcatore EpCAM è espresso anche sulla popolazione leucocitaria, abbiamo anche valutato la presenza delle cellule CD45 positive nei nostri campioni mediante anticorpo CD45-APC (Miltenyi Biotec). Le cellule selezionate, dopo separazione immunomagnetica, risultavano tutte EpCAM⁺ e CD45⁻. Le cellule selezionate sono state lisate per RNA e si è proceduto all'estrazione dei miRNAs mediante kit miRNeasy mini (Qiagen), un metodo che combina la lisi del campione con fenolo/guanidina tiocianato e la purificazione dell'RNA totale che comprende anche i piccoli RNA con una membrana di silice. La concentrazione del campione ottenuto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante lo strumento Bioanalyzer (Agilent).

I campioni di RNA totale, inclusi i miRNAs, sono stati defosforilati, denaturati e marcati con molecole di Cyanine 3-pCp al 3' mediante il kit miRNA Complete Labeling and Hyb (Agilent Technologies). Successivamente si è proceduto all'ibridazione su chip Mouse miRNA Microarray Kit, Release 21 (Agilent Technologies). Dopo l'ibridazione i campioni sono stati scansionati con lo scanner Agilent G2565BA e i dati sono stati estratti con il software Feature Extraction (Agilent Technologies). I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica e successivamente sottoposti alle analisi statistiche mediante software Genespring (Agilent Technologies). Il software Genesis è stato utilizzato per il 2-D hierarchical clustering e la Principal Component Analysis.

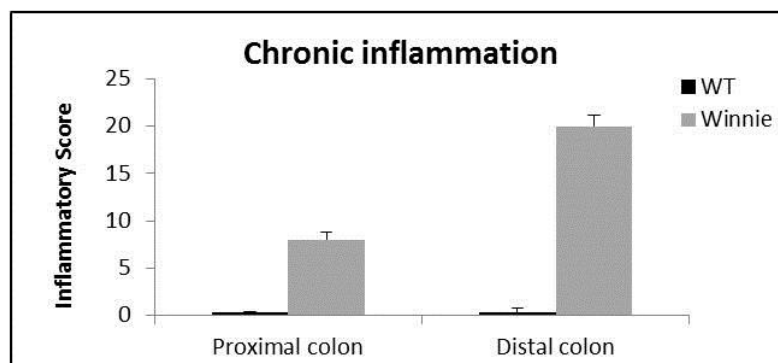
L'identificazione dei target dei miRNA è stata effettuata mediante l'utilizzo di diversi algoritmi bioinformatici tra cui miRBase 21.1 (<http://microna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), TargetScan 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/), miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), miRDB (<http://www.mirdb.org/>) e TarBase v.8 (http://carolina.imis.athena-innovation.gr/diana_tools/web/index.php?r=tarbasev8/index). Dato che si tratta di risultati predittivi, per ridurre i falsi positivi, i risultati ottenuti da ciascun database sono stati sovrapposti e sono stati considerati solo quei target predetti da almeno 3 algoritmi. Lo studio delle pathway molecolari regolate dai miRNA trovati deregolati nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type è stato effettuato mediante l'utilizzo di software come mirPath, miRSystem e Ingenuity Pathway analysis (IPA).

Risultati conseguiti

In questo primo anno, abbiamo messo a punto la metodica di isolamento delle cellule epiteliali da tessuti di colon di topi Winnie e wild-type. Al raggiungimento delle 16 settimane, dopo il sacrificio, l'analisi necroscopica ha confermato la presenza di segni di infiammazione nei topi Winnie rispetto ai topi wild-type. Infatti, il colon dei topi Winnie risultava più corto di quello del wild-type, segno di una infiammazione intestinale. Nei colon con mutazione Winnie era, inoltre, frequente la presenza di feci poco consistenti ed a volte la presenza di sangue.



La parte prossimale e distale è stata fissata e colorata con ematosilina/eosina ed è stato valutato lo score infiammatorio. Lo score infiammatorio dei topi Winnie è più elevato rispetto anche ai wild-type sia nella porzione prossimale che distale.

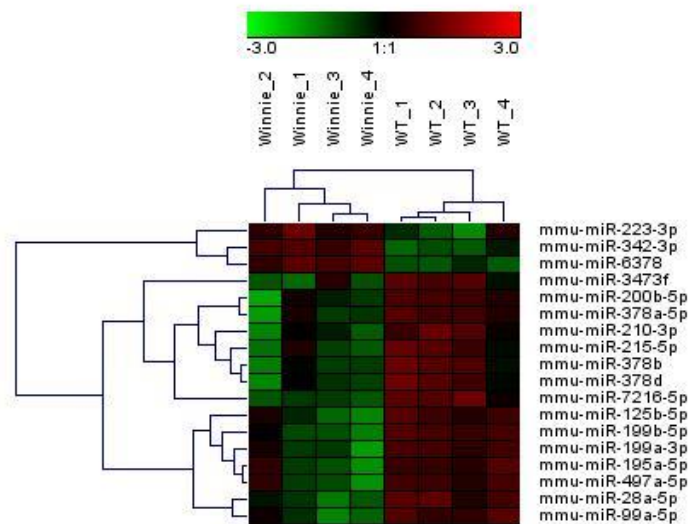


I tessuti di colon di topi Winnie e wild-type sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento delle cellule epiteliali da tessuto. Al fine di identificare i miRNA espressi nelle cellule epiteliali intestinali isolate da topi Winnie rispetto ai topi wild-type, è stato analizzato il loro totale profilo di espressione mediante la tecnica del microarray. A partire dai 1881 miRNA murini rappresentati sul microarray, sono stati identificati 460 miRNA che risultano espressi nelle cellule epiteliali isolate. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati 18 miRNA che discriminano le cellule epiteliali intestinali dei topi Winnie dalle cellule epiteliali intestinali dei topi wild-type.

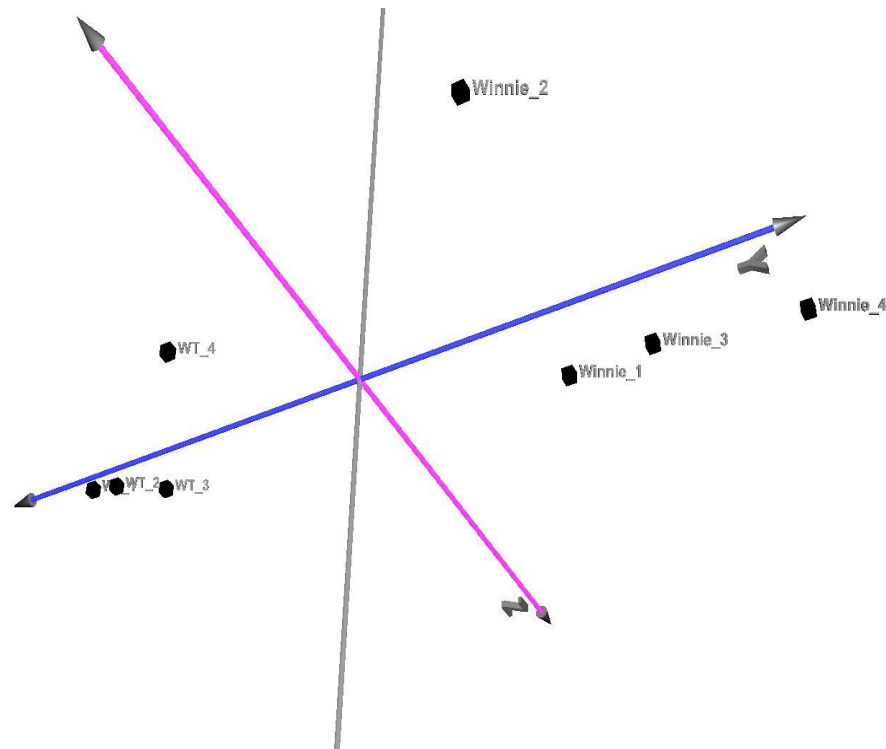
miRNA	Fold change	Regolazione
mmu-miR-125b-5p	-3.269	down
mmu-miR-195a-5p	-2.994	down
mmu-miR-199a-3p	-4.264	down
mmu-miR-199b-5p	-5.548	down
mmu-miR-200b-5p	-2.424	down
mmu-miR-210-3p	-3.252	down
mmu-miR-215-5p	-2.925	down
mmu-miR-223-3p	2.378	up

mmu-miR-28a-5p	-2.361	down
mmu-miR-342-3p	2.852	up
mmu-miR-3473f	-2.087	down
mmu-miR-378a-5p	-4.915	down
mmu-miR-378b	-2.049	down
mmu-miR-378d	-2.006	down
mmu-miR-497a-5p	-2.977	down
mmu-miR-6378	3.862	up
mmu-miR-7216-5p	-2.096	down
mmu-miR-99a-5p	-2.405	down

Il 2-D hierarchical clustering e la Principal Component Analysis dimostrano chiaramente che il profilo di espressione dei miRNA delle cellule epiteliali intestinali dei 2 modelli è nettamente distinto.



Hierarchical Clustering



Principal Component Analysis

Al fine di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNA deregolati che sono stati individuati nell'analisi del microarray, è stata effettuata un'analisi bioinformatica utilizzando diversi software di predizione accessibili pubblicamente on line. Sono stati utilizzati 6 differenti algoritmi e in seguito, per ridurre il numero di falsi positivi, sono stati sovrapposti i risultati ottenuti dai differenti database e considerati solo i geni target putativi predetti da almeno 3 dei 6 database. Basandosi sui risultati ottenuti dalle analisi bioinformatiche sono stati individuati diversi geni, particolarmente coinvolti nella fisiopatologia delle epiteliali intestinali, che erano potenzialmente regolati da alcuni dei miRNA individuati. Per approfondire le interazioni biologiche tra i miRNA trovati modulati nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto ai controlli e i geni target regolati dai miRNA, è stata effettuata un'ulteriore analisi bioinformatica per valutare le pathways e i processi biologici in cui sono coinvolti i geni target dei miRNA. In particolare, risultano significativamente modulate le seguenti pathways canoniche: Wnt, MAPK, TGF β , tight junction, Intestinal immune network for IgA production. Inoltre, tra i processi biologici più significativi sono stati identificati la proliferazione e la crescita cellulare, lo sviluppo delle cellule e degli organi, la morfologia cellulare e le interazioni cellula-cellula.

È in corso la validazione dei dati ottenuti da microarray mediante l'utilizzo della Real-Time PCR. Seguiranno gli studi funzionali per validare biologicamente l'interazione tra miRNA e gene target.

Bibliografia

1. Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. Gut. 29(7):990-6, 1988.

2. Pizarro TT, Pastorelli L, Bamias G, Garg RR, Reuter BK, Mercado JR, Chieppa M, Arseneau KO, Ley K, Cominelli F. SAMP1/YitFc mouse strain: a spontaneous model of Crohn's disease-like ileitis. *Inflamm Bowel Dis*. 17(12):2566-84, 2011.
3. Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, Chadee K. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *J Innate Immun*. 1(2):123-35, 2009.
4. Eri RD, Adams RJ, Tran TV, Tong H, Das I, Roche DK, Oancea I, Png CW, Jeffery PL, Radford-Smith GL, Cook MC, Florin TH, McGuckin MA. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol*. 4(3):354-64, 2011.
5. McGuckin MA, Eri RD, Das I, Lourie R, Florin TH. Intestinal secretory cell ER stress and inflammation. *Biochem Soc Trans*. 39(4):1081-5, 2011.
6. Fuchs A, Vermi W, Lee JS, Lonardi S, Gilfillan S, Newberry RD, Cella M, Colonna M. Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of il-12- and il-15-responsive ifn- γ -producing cells," *Immunity*. 38(4): 769–81, 2013.
7. Hepworth MR, Fung TC, Masur SH, Kelsen JR, McConnell FM, Dubrot J, Withers DR, Hugues S, Farrar MA, Reith W, Eberl G, Baldassano RN, Laufer TM, Elson CO, Sonnenberg GF. Immune tolerance. Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4⁺ T cells. *Science* 348(6238):1031-5, 2015.
8. Martinez-Gonzalez I, Steer CA, Takei F. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends Immunol*. 36(3):189-95, 2015.
9. Eken A, Singh AK, Treuting PM, Oukka M. IL-23R⁺ innate lymphoid cells induce colitis via interleukin-22-dependent mechanism. *Mucosal Immunol*. 7(1):143-54, 2014.
10. Buonocore S, Ahern PP, Uhlig HH, Ivanov II, Littman DR, Maloy KJ, Powrie F. Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. *Nature*. 464(7293):1371-5, 2010.
11. Vonarbourg C, Diefenbach A. Multifaceted roles of interleukin-7 signaling for the development and function of innate lymphoid cells. *Semin Immunol*. 24(3):165-74, 2012.
12. Aparicio-Domingo P, Romera-Hernandez M, Karrich JJ, Cornelissen F, Papazian N, Lindenbergh-Kortleve DJ, Butler JA, Boon L, Coles MC, Samsom JN, Cupedo T. Type 3 innate lymphoid cells maintain intestinal epithelial stem cells after tissue damage. *J Exp Med*. 212(11):1783-91, 2015.
13. Kalla R, Ventham NT, Kennedy NA, Quintana JF, Nimmo ER, Buck AH, Satsangi J. MicroRNAs: new players in IBD. *Gut*. 64(3):504-17, 2015.
14. Van der Goten J, Vanhove W, Lemaire K, Van Lommel L, Machiels K, Wollants WJ, De Preter V, De Hertogh G, Ferrante M, Van Assche G, Rutgeerts P, Schuit F, Vermeire S, Arijs I. Integrated miRNA and mRNA expression profiling in inflamed colon of patients with ulcerative colitis. *PLoS One*. 9(12):e116117, 2014.

LINEA 4 NUTRIZIONE

Per la linea di ricerca su “Nutrizione”, i principali risultati dai singoli Laboratori per l’anno 2017 sono i seguenti:

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica

Il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica è il Laboratorio di Ricerca più antico dell’IRCCS. Esso ha seguito l’evoluzione sanitaria della nostra regione accompagnando con le sue ricerche la transizione che si è verificata dalle malattie infettive, in particolare l’infezione da virus C dell’epatite, alle malattie croniche, in particolare tumori, sovrappeso/obesità e steatosi epatica.

I principali interessi di ricerca del Laboratorio sono:

- Effetto della Dieta Mediterranea e dell’Attività Fisica su alcune malattie metaboliche quali l’obesità, steatosi epatica, dislipidemia e diabete tipo 2I sia negli aspetti funzionali (effetto sui parametri biochimici) che strutturali (membrana dei globuli rossi).
- Prevenzione delle patologie previamente menzionate a livello della popolazione generale tramite interventi che coinvolgono i medici della medicina generale.
- Sviluppo di score di misurazione del rischio che i diversi stili di vita comportano per la salute in generale.

Il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica inoltre offre consulenza metodologica sia nell’ambito puramente epidemiologico sia nell’ambito biostatistico.

Progetto: “Effetto di due programmi di attività fisica di diversa intensità, della Dieta Mediterranea e della loro combinazione sulla NAFLD e sul profilo lipidico della membrana dei globuli rossi” (Termine di scadenza: 31/05/2017)

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Dott.ssa Caterina Bonfiglio, Dott.ssa Isabella Franco (borsista), Sig. Giampiero Deleonardis (borsista)

Introduzione

La steatosi epatica non alcolica (NAFLD) che si sviluppa in assenza di consumo esagerato di alcool è riconosciuta come grave problema di sanità pubblica. Le implicazioni cliniche della NAFLD derivano fondamentalmente dalla sua frequenza nella popolazione generale ed il suo potenziale evolversi verso forme più gravi di malattia epatica quali cirrosi e carcinoma epatocellulare. NAFLD è oggi la più comune malattia epatica mondiale e colpisce tutte le età ed etnie, con prevalenze variabili dal 34% in USA al 25% in Giappone. Nel nord di Italia la prevalenza di NAFLD raggiunge il 25% della popolazione generale ed è associata a tutti i fattori di rischio della Sindrome Metabolica (SindMet). Simili valori furono stimati per le popolazioni di Castellana Grotte e Putignano.

L’alta prevalenza di NAFLD nei paesi occidentali è probabilmente dovuta alla sua contemporaneità con l’epidemia di obesità (OB) e sovrappeso (SP) e le loro associate complicazioni metaboliche. OB, Diabete Mellito tipo 2 (DMT2) e dislipidemia sono fattori di rischio riconosciuti per NAFLD. La resistenza all’insulina è frequentemente riscontrata in pazienti con NAFLD così come in pazienti senza OB o DMT2.

L'efficacia e i profili di sicurezza della farmacoterapia nella terapia della NAFLD sono oggetto ancora oggi di discussione e, poiché l'OB è strettamente legata alla NAFLD la prima linea di trattamento è la modificazione dello stile di vita. La gestione usuale del paziente con NAFLD include una riduzione graduale del peso e un aumento dei livelli di attività fisica.

Negli ultimi anni la ricerca scientifica ha evidenziato l'efficacia della dieta con restrizione calorica nella terapia della NAFLD ma non è ancora chiaro se le abitudini alimentari che prevedono certi tipi di alimenti piuttosto di altri causano più probabilmente NAFLD. Alla luce delle difficoltà riscontrate nella riduzione del peso e il contemporaneo mantenimento di queste abitudini nel lungo termine, il cambiamento della composizione dietetica senza una necessaria restrizione calorica può offrire un'alternativa più realistica per la terapia di queste pazienti.

In questo senso l'esperienza maturata nel Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica tramite la progettazione e conduzione di due trial clinici con diversi tipi di diete che includevano la Dieta Mediterranea a basso Indice Glicemico (DMBIG) senza restrizione calorica costituisce un importante punto di partenza per la ricerca dell'effetto globale della dieta sulla NAFLD. La DMBIG confezionata dal laboratorio ha un Indice Glicemico (IG) minore di 50. Inoltre non più del 10% delle calorie giornaliere totale provengono da grassi saturi. Queste caratteristiche della dieta soddisfano i criteri accettati dalla letteratura come ottimali sia per la struttura della Dieta Mediterranea sia per la terapia della NAFLD.

La compliance con i programmi di attività fisica riscontra a lungo termine gli stessi problemi della dieta raggiungendo circa il 20% dopo due anni di follow-up. Ciò nonostante l'incremento dei livelli di attività fisica è altamente benefico per la NAFLD.

Obiettivo dello studio

Stimare l'effetto della dieta mediterranea a basso indice glicemico, di due programmi di attività fisica e della loro combinazione sullo score di NAFLD e sulla composizione lipidica della membrana dei globuli rossi.

Stato di avanzamento del progetto

Il progetto "NUTRIATT" ha avuto il via libera dal Comitato Etico il 4 Febbraio 2015 e successivamente vi è stata l'assegnazione della gara d'appalto per uso palestra con DG n° 91 del 27.02.15.

Il progetto prevedeva il reclutamento e la randomizzazione di 120 soggetti totali, arruolati in quattro sessioni, a gruppi di 30 e il trattamento aveva la durata di 3 mesi.

Al 31/01/2017 erano stati formati quattro gruppi di reclutamento con le seguenti date:

- 1° gruppo: dal 9 Aprile 2015 al 28 Maggio 2015.
- 2° gruppo: dal 1 Settembre 2015 al 6 Ottobre 2015
- 3° gruppo: dal 10 Febbraio 2016 al 12 Aprile 2016
- 4° gruppo: dal 10 Settembre 2016 al 20 Novembre 2016

Il trattamento è terminato nelle seguenti date

1. 1° gruppo: 14 Agosto 2015
2. 2° gruppo: 15 Gennaio 2016
3. 3° gruppo: 10 Agosto 2016
4. 4° gruppo: 29 Gennaio 2017

Il reclutamento e la randomizzazione degli ultimi 33 soggetti è iniziato nella prima metà del mese di Settembre 2016 e si è conclusa il 20 Novembre pertanto il trattamento si è concluso nel mese di Gennaio 2017.

Prima di iniziare i programmi di lavoro, per tutti i soggetti reclutati, è stato valutato lo stato di forma (T_0) e il livello di fitness attraverso dei test effettuati su strada (walking test) e all'interno della palestra (push up test e sit and reach test) che saranno ripetuti al 45°giorno(T_1) e al 90°giorno (T_2) .

Tabelle riassuntive:

Distribuzione del campione per sesso ed età

Classi di età (in anni)	Sesso		totale
	M	F	
≤ 30 anni	1	3	4
31-40	19	11	30
41-50	32	25	57
51-60	24	21	45
> 60	21	12	33
totale	97	72	169

Media e Range del CAP distribuito per sesso e tempo di osservazione

Tempi di osservazione	Sesso		Totale (media e range)
	M (media e range)	F (media e range)	
t base	310,02 (100-400) n = 79	285,57 (100-400) n = 49	300,66 (100-400) n = 128
t 45 gg	280,60 (147-400) n = 73	277 (111-400) n = 45	279,23 (111-400) n = 118
T 60 gg	275,01 (119-400) n = 63	261,12 (128-360) n = 32	270,34 (119-400) n = 95

Media e Range del CAP distribuito per classi di età e tempo di osservazione

Classi di età (in anni)	Tempi di osservazione		
	T0 (media e range)	T45 (media e range)	T60 (media e range)
≤ 30 anni	324,75 (283-384)	283,75 (252-323)	272,5 (243-287)
31-40	274,04 (179-337)	264,94 (147-400)	252,69 (119-361)
41-50	300,24 (168-393)	270,44 (111-384)	271,37 (128-371)
51-60	314,67 (100-400)	297,03 (214-400)	273,56 (166-400)
> 60	303,83 (100-400)	282,48 (204-362)	275,85 (147-375)

Distribuzione del campione per bracci di trattamento e tempo di osservazione

Braccio di trattamento	Tempi di osservazione		
	T0	T45	T60
Non reclutato	11		
ATFIS_1	18	17	12
ATFIS_2	18	19	16
INRAM	14	12	13
LGIMD	19	21	14
LGIMD_ATFIS1	24	22	19
LGIMD_ATFIS2	24	27	21

Media e Range del CAP distribuito per bracci di trattamento e tempo di osservazione

Braccio di trattamento	Tempi di osservazione		
	T0 (media e range)	T45 (media e range)	T60 (media e range)
Non reclutato	192,91 (100-301)		
ATFIS_1	321,28 (261-375)	282 (181-343)	278,75 (212-348)
ATFIS_2	316,72 (251-393)	290,47 (147-384)	278,06 (119-342)
INRAM	299,71 (100-400)	273,92 (157-400)	287,31 (218-400)
LGIMD	325,37 (246-400)	289 (214-365)	261,79 (147-346)
LGIMD_ATFIS1	299,21 (168-400)	259,77 (111-362)	259,31 (206-371)
LGIMD_ATFIS2	305 (249-400)	280,18 (191-400)	264,81 (128-328)

Progetto: “Nutrizione, Attività Fisica: Effetto sull’incidenza di Malattie Croniche e sul Microbiota Intestinale. Uno Studio di Coorte Retrospettivo in un Campione di Popolazione dell’Italia Meridionale (Micol 4)” (Termine di scadenza: 31/12/2018)

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Dott.ssa Caterina Bonfiglio, Dott.ssa Isabella Franco (borsista), Sig. Giampiero Deleonardis (borsista)

Introduzione

La coorte MICOL (Castellana Grotte) è stata assemblata nel 1985 ed era costituita da 2472 soggetti. La coorte è stata oggetto di studio nel 1992 e nel 2005, anno in occasione del quale è stato effettuato un nuovo campionamento della popolazione per sopperire all’invecchiamento della coorte. Infine, tra il 2013 ed il 2014 sono stati ulteriormente reclutati i soggetti aventi un’età uguale o superiore a 65 anni. Per il completamento di questo terzo follow-up, quindi, si rende necessario contattare ancora all’incirca 1800 soggetti.

Il richiamo per la quarta volta del progetto Micol (di età > 65 anni) ha previsto una fase iniziale di creazione dei file operativi per lo svolgimento dello studio: foglio informativo, consenso informato,

lettera da inviare ai medici di famiglia, lettera di invito dei soggetti facenti parte del campione, predisposizione della routine ematica, questionario di anamnesi.

Lo stile di vita (dieta) è misurato con Food-frequency Questionnaire sviluppato dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS Saverio de Bellis e che è stato usato in molti studi epidemiologici condotti dal Laboratorio. La misurazione dell'attività fisica tramite il questionario internazionale per l'attività fisica (IPAQ), nella sua forma lunga e versione italiana.

Obiettivi dello studio:

Primari:

1) Stimare l'incidenza di Malattie Croniche (MCV, DMT2, tumori, tumori legati alla dieta e DMT2) nella popolazione generale di un'area geografica definita; 2) Analisi Età-Periodo-Coorte della mortalità 1985-2017 della stessa popolazione; 3) Stimare l'incidenza di Malattie Croniche in sottogruppi di soggetti normopeso, sovrappeso e obesi (metabolicamente sani e malati); 4) Stimare l'effetto dei diversi stili di vita e la loro eventuale evoluzione su obesità, DMT2, mortalità generale e specifica e sulle caratteristiche del microbiota intestinale; 5) Ipotizzare una serie di rapporti causali tra variabili e sintetizzarle in un'ipotesi composta relativa alle dipendenze epidemiologiche tra cause ed effetti.

Secondari:

Eseguire un'analisi di sensibilità allo scopo di stimare l'impatto di differenti scenari sull'insorgenza di Malattie Croniche.

Stato di avanzamento del progetto

Il follow-up dei soggetti appartenenti alla coorte Micol under 65 anni ha cominciato la sua fase operativa e dal 01 ottobre 2017 al 31 dicembre sono stati arruolati 350 soggetti.

Il ritardo del reclutamento è dovuto all'inizio della borsa del medico responsabile per la raccolta dei dati relativi all'anamnesi. Il dottor Guerra ha iniziato la sua borsa il 1° luglio. Il primo bando è andato a vuoto ed è stato necessario rimbandirlo.

Essendo periodo estivo si è preferito non iniziare a chiamare i soggetti, ma sono stati invece raccolti dal dott Guerra i dati relativi ai soggetti deceduti del suddetto progetto (data e causa di morte), utili per studi relativi alla sopravvivenza.

Progetto: “Analisi costo-beneficio di un intervento basato sulla dieta mediterranea e l'attività fisica in pazienti diabetici, ipertesi e dislipidemicici” (Scadenza: 31/12/2019)

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Dott.ssa Maria Gabriella Caruso (Nutrizione Clinica), Dott.ssa Maria Notarnicola (Biochimica Nutrizionale), Dott. Mario Correale (Patologia Clinica), Dott. Raffaele Cozzolongo (Gastroenterologia 1), Dott.ssa Caterina Bonfiglio (Epidemiologia e Biostatistica)

Introduzione

I deleteri effetti dell'obesità e del sovrappeso sulla salute in generale possono essere significativamente e positivamente influenzati da una cultura che promuova un corretto stile alimentare e una regolare attività fisica. Il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS De Bellis di Castellana Grotte, ha condotto diversi studi di popolazione e trials clinici sugli stili di vita e la loro importanza sia nella prevenzione che nella gestione delle patologie cronico-

degenerative dei nostri tempi. Questo progetto si propone di stimare l'effetto dell'**Attività Fisica** e della **Dieta Mediterranea** sul **Diabete Mellito di tipo II**, sull'**Ipertensione** e sulla **Dislipidemia** nel confronto di un regime terapeutico farmacologico. Il campione da arruolare è composto da un totale di 120 soggetti divisi in tre gruppi: 40 nel gruppo Diabete (gD), 40 nel gruppo Ipertensione(gI) e 40 nel gruppo Dislipidemia(gDs).

PROTOCOLLO D'INTERVENTO DIABETE TIPO II

L'attività fisica rappresenta la strategia più efficace per la prevenzione del diabete mellito di tipo 2. Sulle basi di consolidate evidenze scientifiche epidemiologico-osservazionali e d'intervento riguardante la valenza terapeutica e preventiva dell'esercizio fisico sarà somministrato e dosato l'esercizio fisico dosato come prestazione sanitaria. Peraltro è stato pubblicato che la sola prescrizione non è sufficiente a determinare quel cambiamento persistente che assicura un risultato terapeutico. È necessario un periodo di "allenamento" e uno di "somministrazione" perché l'esercizio fisico possa avere maggiore probabilità di efficacia sul cambiamento dello stile di vita. È altresì documentato che un regolare programma a lungo termine d'attività fisica mista svolta da soggetti diabetici è capace di determinare un risparmio indicativo della spesa sanitaria. La disponibilità, prevalentemente resa possibile negli ultimi anni di ricerca e applicazione pratica, di strumenti che sempre con maggiore precisione ed accuratezza sono in grado di raccogliere e trasformare l'opinione del paziente in informazioni sensate sia per il clinico sia per il ricercatore, ci hanno permesso di misurare la qualità di vita relativa allo stato di salute, di un campione di soggetti rappresentativo della popolazione dismetabolica, e correlarla ai benefici indotti dall'esercizio fisico dosato e somministrato.

PROTOCOLLO DI ALLENAMENTO

Questo protocollo prevede un periodo iniziale di condizionamento di 12 sedute in cui i soggetti eseguiranno esercizi di tipo aerobico a bassa intensità (50-55%HRR), accompagnati da esercizi di potenziamento di facile esecuzione. Per ogni seduta sono previste due sezioni di lavoro principali: l'allenamento aerobico e quello di resistenza. Questa la struttura della singola lezione nel periodo di condizionamento:

STRUTTURA LEZIONE: durata totale 60'

FREQUENZA SETTIMANALE: 3 volte a giorni alterni

STRUTTURA INIZIALE DELLA LEZIONE	DURATA
Prova glicemica e spiegazione lavoro da svolgere	5'
Condizionamento e mobilità articolare	15'
Lavoro aerobico	10'
Prova glicemica e feedback di controllo, eventuale integrazione di carboidrati/liquidi	5'
Lavoro di potenziamento	10'
Defaticamento e stretching	10'
Prova glicemica e conclusione lezione	5'

Ogni singolo ciclo successivo a quello di condizionamento durerà 12 sedute. L'introduzione delle prove glicemiche all'inizio, a metà e alla fine dell'allenamento ha lo scopo di educare i soggetti all'autocontrollo e acquisire maggiore consapevolezza sulle proprie condizioni e sugli effetti positivi dell'allenamento. Anche il reintegro di piccole quantità di liquidi o carboidrati è fondamentale per evitare di incorrere in crisi ipoglicemiche, soprattutto nei primi cicli del protocollo. Gradualmente queste pause verranno ridotte nella durata, ma non saranno mai eliminate poiché molto rilevanti dal

punto di vista terapeutico. La durata di ogni fase sarà progressivamente modificata, in modo da dare più spazio al lavoro aerobico e poi quello di potenziamento, a discapito delle fasi del condizionamento, defaticamento e delle prove glicemiche che, diventeranno più veloci e automatiche per la dimestichezza acquisita dai soggetti nella gestione di questa procedura.

Es. schema protocollo di allenamento con i progressivi cambiamenti di durata e intensità

PERIODO	INTENSITA'
CONDIZIONAMENTO	INTENSITA' al 50-55% HRR + esercizi del livello di base
1' CICLO	Aumento intensità del 5% (55-60-%HRR) + introduzione di esercizi del livello intermedio
2' CICLO	Aumento durata del lavoro aerobico di 5' (tot.15'), riduzione condizionamento
3' CICLO	Aumento intensità del 5% (60-65 %HRR) e mantenimento degli esercizi del livello intermedio
4' CICLO	Aumento durata di 5' del lavoro di potenziamento (tot.15'), riduzione defaticamento
5' CICLO	Aumento intensità del 5% (65-70-%HRR) + esercizi del livello intermedio e del livello avanzato
6' CICLO	Aumento durata del lavoro aerobico di 5' (tot.20') riduzione del tempo delle prove glicemiche
7' CICLO	Aumento intensità del 5% (70-75 %HRR) + esercizi del livello avanzato
8' CICLO	Aumento durata di 5' del lavoro di potenziamento (tot.20'), riduzione di tutte le altre fasi(aerobica esclusa)

L'utilizzo del cardiofrequenzimetro è obbligatoria. La prima lezione di ogni ciclo deve essere dedicata all'esecuzione di un test che servirà all'istruttore e agli allievi per verificare eventuali miglioramenti della condizione fisica e quindi incentivare la pratica regolare dell'attività stessa. L'evoluzione degli esercizi di potenziamento avverrà modificando il numero delle serie o di ripetizioni per esercizio. Per semplificare la programmazione, gli esercizi (a carico naturale o con l'ausilio di manubri, elastici o body bar) sono stati suddivisi in base al livello di difficoltà in tre categorie:

LIVELLO BASE

(3 serie -10 ripetizioni)

TIPOLOGIA di Esercizi

ADDOMINALI

DORSALI

LIVELLO INTERMEDIO

(3-4 serie -15 ripetizioni)

GAMBE

SPALLE

GLUTEI

BICIPITI

PETTORALI

TRICIPITI

LIVELLO AVANZATO

(4-5 serie -20 ripetizioni)

Questo protocollo di lavoro è stato elaborato rispettando le linee guida **dell'AMERICAN DIABETES ASSOCIATION** e presuppone una serie di obiettivi raggiungibili, previa partecipazione costante dei soggetti.

CONTROLLO GLICEMIA

Il controllo della glicemia è estremamente importante prima di incominciare la seduta di allenamento e durante, soprattutto, tra la fine degli esercizi aerobici e l'inizio degli esercizi di forza così come alla fine della seduta stessa.

Se	Glicemia <100	Reintegro di carboidrati
Se	100 < Glicemia < 250	Attività fisica possibile
Se	Glicemia >300	No attività fisica Errore nella gestione insulina

PROTOCOLLO D'INTERVENTO IPERTENSIONE - DISLIPIDEMICI

EFFETTI INDOTTI DALL'ESERCIZIO

STADIO 1: ipertensione lieve

Durante l'esercizio dinamico si manifestano incrementi della portata cardiaca inferiori ai normotesi, e questo indica che lo stimolo indotto dall'attività tende a stabilizzare la circolazione, anche se persiste la differenza pressoria, esistente a riposo, rispetto ai normotesi. Le reazioni all'esercizio isometrico in questo stadio inducono un grosso stress sul sistema cardiovascolare ed è, quindi, da utilizzare, con molta cautela, solo in casi particolari.

STADIO 2: ipertensione media

Durante l'esercizio dinamico sono presenti adattamenti al lavoro consistenti in significativi aumenti della FC accompagnati da incrementi minori di gittata sistolica; l'insieme di questi fattori inducono un incremento simile ai soggetti normotesi. Le reazioni all'esercizio isometrico in questo stadio inducono un grosso stress sul sistema cardiovascolare ed è, quindi, da utilizzare, con molta cautela, solo in casi particolari.

STADIO 3: ipertensione grave

Durante l'esercizio dinamico si presentano gravi difficoltà all'adattamento allo sforzo già a bassi carichi di lavoro e quindi è indicato un training in ambiente protetto. Assolutamente non utilizzare esercitazioni di tipo isometrico.

TEST ERGONOMETRICO

Il test **ERGONOMETRICO (Test da sforzo)** è una metodica strumentale non invasiva fra le più diffuse in ambito cardiologico ed è un test fisiologico di tolleranza allo sforzo. L'esecuzione del test da sforzo a scopo diagnostico è ovviamente un atto medico, sia per la necessità di interpretare i dati clinici e strumentali (elettrocardiogramma, analisi gas respiratori, etc.) sia per le manovre di pronto intervento che dovessero essere necessarie. I protocolli di esecuzione prevedono:

- L'uso di ergometri: treadmill, cicloergometri, ergometri a braccia, ergometri specifici;
- Refertazione: di pertinenza del cardiologo
- Protocolli personalizzati: il protocollo di Bruce è quello più utilizzato, con la sua variante modificata per i pazienti con minore tolleranza all'esercizio.

TEST di FITNESS FISICO

I test di valutazione motoria, in generale, permettono di controllare lo stato di forma dei soggetti che intraprendono una determinata tipologia di attività fisica. In ambito fitness, i risultati dei test vengono rapportati con lo stato di benessere dei soggetti. In ambito di training metabolico, sono indicatori fondamentali di parametri riguardanti la salute, come ad esempio l'efficienza cardiovascolare e respiratoria. Eseguiti ad intervalli regolari, permettono di avere sempre un quadro aggiornato dello stato fisico dei soggetti, facilitando la pianificazione dei carichi di lavoro ed

evidenziando eventuali peggioramenti dello stato di salute. I test che prevedono poche ripetizioni di uno sforzo valutano la forza muscolare; quelli che prevedono un elevato numero di ripetizioni misurano l'endurance.

TEST di FORZA

La forza va allenata sempre con numero di ripetizioni legate al massimale, per fare questo si utilizzano test ad esaurimento che mirano a determinare i valori massimali di forza muscolare in modo da riuscire a ottenere carichi di allenamenti personalizzati in base al numero delle ripetizioni da effettuare. La metodologia prevede che il trainer metabolico stabilisca il carico adatto al soggetto (che permette da 1 a 15 ripetizioni complete), il quale, dopo aver svolto un adeguato riscaldamento, esegue le ripetizioni dell'esercizio fino ad esaurimento. Per stabilire i carichi massimali, si parte dai risultati dei test (numero di ripetizioni eseguite e carico applicato) e, avvalendosi della tabella di **SINCLAIR** riguardante i calcoli massimali con metodo diretto, s'individua la percentuale del massimale corrispondente al carico utilizzato, applicando la corretta proporzione, si calcola il valore massimale:

Proporzione:
X: 100 = Peso: % rip

PUSH UP TEST vedi Protocollo
TEST di VALUTAZIONE delle CAPACITA' AEROBICHE vedi Diabete II
SCALA DI BORG e SCALA BORG MODIFICATA vedi Protocollo
SIT and REACH TEST vedi Diabete II

TABELLA di SINCLAIR	
SINCLAIR	MASSIMALI %
1	100
2-1	95
3-2	90
5-4	85
7-6	80
9-8	75
11-10	70
14-12	65
16-15	60

Diabete II
Protocollo
Diabete II
Protocollo

METODOLOGIA

Importante affermare che, prima di accedere all'attività in ambiente fitness, il soggetto deve imprescindibilmente essere stato inquadrato dal medico specialista, che indicherà: il grado d'ipertensione, l'idoneità e la conseguente capacità di svolgere un'attività fisica. Bisogna inoltre ricordare che l'eventuale terapia farmacologica (beta-bloccanti, ca - antagonisti, ace – inibitori, diuretici etc.) può indurre durante la prestazione a una serie di complicanze e deve essere attentamente considerata al momento della pianificazione. Nei soggetti con compensati con i farmaci, andrà posta particolare attenzione nel somministrare esercizi di potenziamento per gli addominali, quadricipiti e i polpacci, che possono innalzare troppo la pressione arteriosa.

MONITORAGGIO dei PARAMETRI

Durante le sedute, è molto utile monitorare i seguenti parametri:

- Pressione arteriosa a riposo, cioè prima dell'inizio dell'attività;

- Frequenza cardiaca a riposo, durante tutta la seduta e al 3° minuto di recupero

Il soggetto dovrà riferire della percezione della fatica mediante l'uso della scala di Borg adattata; nel caso faccia uso di farmaci beta-bloccanti, che stabilizzano la frequenza cardiaca, questo rimane il mezzo fondamentale per valutare l'intensità dello sforzo. Il tecnico dovrebbe registrare i dati sulla scheda del soggetto per analizzare l'andamento nel tempo; questi dati, uniti a quelli dei test, consentono di valutare l'adattamento indotto dall'allenamento e di operare le eventuali modifiche al programma di lavoro

MEZZI

- Deambulazione su treadmill: il carico viene definito sulla base dei risultati della prova da sforzo;
- Cicloergometro: utilizzato nel riscaldamento e nella fase di lavoro, rappresenta una valida soluzione per far svolgere attività aerobica anche a individui con ridotte capacità;
- Ergometri a braccia, simulatori di voga;
- Esercizi callistenici e di mobilità articolare: sedute di ginnastica generale mirate a favorire il recupero della percezione corporea, del tono muscolare e della mobilità globale. Uso piccoli attrezzi;
- Esercizi di rinforzo muscolare: vanno scelti valutando le capacità funzionali, il grado di ipertensione e le problematiche, anche osteoarticolari, dell'individuo. Nelle diverse fasi possono essere usati metodi e attrezzi ma mai per un lavoro di tipo isometrico.
- Esercizi propriocettivi: lavoro con tavolette, a piedi nudi, con superfici di varia natura e tappeti di differenti spessori. Da eseguire solo se è necessario recuperare queste capacità;
- Esercizi di stretching: allungamento delle principali catene muscolari e delle strutture pre-articolari, eseguite evitando apnee e alternando allungamento statico a quello dinamico;
- Esercizi di ginnastica respiratoria e tecniche di rilassamento: educare l'individuo al controllo delle tensioni emotive utilizzando la respirazione per ottenere il rilassamento.

PIANIFICAZIONE DEL PROTOCOLLO DI ALLENAMENTO

1 MESOCICLO

Obiettivi

- Percezione corporea (ritmo e equilibrio) e adattamenti posturali
- Recupero o acquisizione degli schemi motori di base e della propriocettività
- Condizionamento osteo-articolare
- Percezione e interpretazione dell'intensità della fatica
- Adattamento all'ambiente
- Addestramento all'uso delle attrezzature
- Condizionamento cardio-vascolare e respiratorio
- Motivazione all'adesione e alla prosecuzione dell'attività

PROGRAMMA

4 microcicli da 3 sedute settimanali, di durata crescente.

1/2 microcicli presentano intensità e volume costanti.

3° microciclo aumenta carico lavoro

4° costante e alla fine dell'ultima seduta di questo micro ciclo si eseguono le nuove valutazioni.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Brooks GA, Fahey TD and White TP. (1996) Exercise Physiology Human Bioenergetics and Its Applications: 2nd Edition. Mountain View, CA: Mayfield Pub
- 2) Wilmore JH and Costill DL. (2005) Physiology of Sport and Exercise: 3rd Edition. Champaign, IL: Human Kinetics
- 3) Connett RJ, Gayeski TEJ & Honig CR. Lactate efflux is unrelated to intracellular PO₂ in a working red muscle in situ. *J Appl Physiol.* 1986, 61, 402-408
- 4) Gladden LB (1996). Lactate transport and exchange during exercise. In *Handbook of Physiology*, section 12, Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems, ed. Rowell LB & Shepherd JT, pp. 614-648. Oxford University Press, New York
- 5) Gladden LB (2003). Lactate metabolism during exercise. In: *Principles of Exercise Biochemistry*, 3rd edn, ed. Poortmans JR, pp. 152-196. Karger, Basel
- 6) Brooks GA (1985a). Lactate: glycolytic product and oxidative substrate during sustained exercise in mammals the lactate shuttle. In *Comparative Physiology and Biochemistry: Current Topics and Trends*, vol. A, Respiration-Metabolism-Circulation, ed. Gilles R, pp. 208-218. Springer, Berlin
- 7) Donovan CM, Brooks GA. Endurance training affects lactate clearance, not lactate production. *Am J Physiol.* 1983, Jan;244(1):E83-92
- 8) Stager JM and Tanner DA. (2005) *Swimming: 2nd Edition; An International Olympic Committee Publication.* Oxford UK: Blackwell Science Ltd
- 9) Van Montfoort MC, Van Dieren L, Hopkins WG, Shearman JP. Effects of ingestion of bicarbonate, citrate, lactate, and chloride on sprint running. *Med Sci Sports Exerc.* 2004 Jul;36(7):1239-43
- 10) Fitts RH (2003). Mechanisms of muscular fatigue. In: *Principles of Exercise Biochemistry*, 3rd edn, ed. Poortmans JR, pp. 279-300. Karger, Basel
- 11) Barany M and Arus C. (1990) Lactic acid production in intact muscle, as followed by ¹³C and ¹H nuclear magnetic resonance. In *Human Muscle Power*, NL Jones, N McCartney and AJ McComas, eds. Champaign, IL: Human Kinetics
- 12) Fabiato A and Fabiato F. Effects of pH on the myofilaments and the sarcoplasmic reticulum of skinned cells of cardiac and skeletal muscle. *J Physiol.* 1978, 276:233-255
- 13) Fuchs F, Reddy Y, Briggs FN. The interaction of cations with the calcium-binding site of troponin. *Biochim Biophys Acta.* 1970, Nov 17;221(2):407-9
- 14) Hakkinen K. Effects of fatiguing heavy resistance loading on voluntary neural activation and force production in males and females. In: *Proceedings of the second North American Congress on Biomechanics*. Chicago: The Organizing Committee. 1992. pp. 567-568
- 15) Hermansen L. Effect of metabolic changes on force generation in skeletal muscle during maximal exercise. In: *Human Muscle Fatigue*, R Porter and J Whelan eds. London: Pitman Medical. 1981
- 16) Nakamaru Y, Schwartz A. The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol.* 1972 Jan;59(1):22-32
- 17) Tesch P. Muscle fatigue in man. With special reference to lactate accumulation during short term intense exercise. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1980;480:1-40
- 18) Cairns SP. Lactic acid and exercise performance : culprit or friend? *Sports Med.* 2006;36(4):279-91

- 19) Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D. Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.2004 Sep;287(3):R502-16
- 20) Westerblad H, Allen DG & Lnnnergren J. Muscle fatigue: Lactic acid or inorganic phosphate the major cause? *News Physiol Sci*. 2002, 17, 1721
- 21) L. B. Gladden. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. 2003, *J Physiol*.558.1 pp 5-30
- 22) J Bangsbo, K Madsen, B Kiens and EA Richter Effect of muscle acidity on muscle metabolism and fatigue during intense exercise in man. *The Journal of Physiology*.Vol 495, Issue 2 587-596
- 23) C. Juel, H. Pilegaard, J. J. Nielsen, and J. Bangsbo Interstitial K⁺ in human skeletal muscle during and after dynamic graded exercise determined by microdialysis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*.2000, 278: R400-R406
- 24) Ole M. Sejersted and Gisela Sjgaard Dynamics and Consequences of Potassium Shifts in Skeletal Muscle and Heart During Exercise *Physiol*.2000, Rev. 80: 1411-1481
- 25) Brooks GA. Lactate doesn't necessarily cause fatigue: why are we surprised? *J Physiol*.2001 Oct 1;536(Pt 1):1
- 26) Donovan CM & Brooks GA. Endurance training effects lactate clearance, not lactate production. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*.1983. 7: E83-E92
- 27) York JW, Oscai LB, Penney DG. Alterations in skeletal muscle lactate dehydrogenase isozymes following exercise training. *Biochem Biophys Res Commun*.1974 Dec 23;61(4):1387-93
- 28) Mazzeo RS, Brooks GA, Schoeller DA, Budinger TF. Disposal of blood [1-13C] lactate in humans during rest and exercise. *J Appl Physiol*. 1986 Jan;60(1):232-41
- 29) Barnard RJ, Edgerton VR, Furukawa T, Peter JB. Histochemical, biochemical, and contractile properties of red, white, and intermediate fibers. *Am J Physiol*. 1971 Feb;220(2):410-4
- 30) Brooks GA. The lactate shuttle during exercise and recovery. *Med Sci Sports Exerc*.1986 Jun;18(3):360-8
- 31) Brooks GA and Fahey TD. (1984) *Exercise Physiology Human Bioenergetics and Its Applications*: 2nd Edition.Mountain View, CA: Mayfield Pub
- 32) Gollnick PD, Bayly WM, Hodgson DR. Exercise intensity, training, diet, and lactate concentration in muscle and blood. *Med Sci Sports Exerc*.1986 Jun;18(3):334-40
- 33) McGee DS, Jesse TC, Stone MG and Blessing D. Leg and hip endurance adaptations to three different weight-training programs . *J Appl Sport Sci Res*1992, 6(2):92-95
- 34) Mainwood GW, Renaud JM. The effect of acid-base balance on fatigue of skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol*.1985 May;63(5):403-16
- 35) Hermansen L, Stensvold I. Production and removal of lactate during exercise in man. *Acta Physiol Scand*.1972, Oct;86(2):191-201
- 36) Juel C. Intracellular pH recovery and lactate efflux in mouse soleus muscles stimulated in vitro: the involvement of sodium/proton exchange and a lactate carrier. *Acta Physiol Scand*. 1988 Mar;132(3):363-71
- 37) Freund H, Gendry P. Lactate kinetics after short strenuous exercise in man. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*.1978 Aug 15;39(2):123-35
- 38) McMillan JL, Ston MH, Sartin J, Kieth R, Marple D, Brown C and Lweis RD. 20-hour physiological responses to a single weight-training session . *J Strength Cond Res*. 1993, 7(1):9-21
- 39) Pierce K, Rozenek R, Stone M and Blessing D. The effects of weight training on plasma cortisol, lactate, heart, anxiety and perceived exertion . *J Appl Sports Sci Res*.1987, 1(3):58

- 40) Stone MH, Pierce K, Godsen R, Wilson D and Blessing R. Heart rate and lactate levels during weight-training in trained and untrained men. *Phys Sportsmed.* 1987, 15(5):97-105
- 41) Sutton JR. Hormonal and metabolic responses to exercise in subject of high and low work capacities. *Med Sci Sports.* 1978 Spring;10(1):1-6
- 42) Jacobs I. Blood lactate. Implications for training and sports performance. *Sports Med.* 1986 Jan-Feb;3(1):10-25
- 43) Wilmore JH and Costill DL. (2005) *Physiology of Sport and Exercise: 3rd Edition.* Champaign, IL: Human Kinetics
- 44) McArdle WD, Katch FI and Katch VL. (2000) *Essentials of Exercise Physiology: 2nd Edition* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins
- 45) Maud PJ and Foster C (eds.). (1995) *Physiological Assessment Of Human Fitness.* Champaign, IL: Human Kinetics
- 46) Conconi, F., M. Ferrari, P. G. Ziglio, P. Droghetti, and L. Codeca. Determination of the anaerobic threshold by a noninvasive field test in runners. *J. Appl. Physiol.* 1982, 52: 862-873
- 47) Ballarin, E., C. Borsetto, M. Cellini, M. Patracchini, P. Vitiello, P. G. Ziglio, and F. Conconi. Adaptation of the "Conconi test" to child

Obiettivi dello studio

L'intervento proposto sarà preceduto dalla ***misurazione del livello di attività fisica*** attraverso l'uso di ***metodi soggettivi e oggettivi*** e dall'***analisi dello stato di forma*** di soggetti utilizzando ***test di valutazione motoria*** (Vedi allegato).

Stato di avanzamento del progetto

Il Progetto in oggetto non è ancora iniziato in quanto ha presentato rallentamenti dovuti all'espletamento della gara per l'assegnazione della struttura sportiva dove svolgere l'attività fisica prevista dal protocollo di studio (DDG 454 del 22.06.17).

Nella fattispecie le risultanze della prima assegnazione hanno visto partecipare , su indicazione del dott. Osella, una palestra di Putignano, una di Castellana e una di Conversano. E' risultata vincente quella di Conversano, ma è stata considerata poco fruibile dalla popolazione oggetto dello studio e revocata l'assegnazione con DDG 656 del 03.10.17.

Pertanto a settembre si è dovuto provvedere ad un nuovo bando di gara che ha decretato l'assegnazione alla struttura sportiva "Nadir" sita in Putignano (DDG 810 del 27.11.17). Per poter diventare operativo il progetto si è reso necessario l'acquisto di misuratori e strisce di Glicemia e Lattato ancora in fase di evasione.

Nel frattempo la dott.ssa Franco:

- Ha realizzato i protocolli di intervento di attività fisica con i relativi test, disponibili in allegato;
- ha contattato i medici di famiglia per sensibilizzare l'adesione, da parte dei loro assistiti, al progetto in oggetto;
- ha preso contatti con la struttura Nadir per definire gli spazi, i tempi e gli orari di lavoro.

ren and adolescents. *Int. J. Sports Med.* 1989, 10: 334-338

Progetto: "Effetto di alcuni polimorfismi genetici e della loro interazione con i dietary patterns sulla severità della NAFLD" (Scadenza: 31/12/2019)

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: *Dott.ssa Caterina Bonfiglio (Epidemiologia e Biostatistica), Dott. Di Carlo Antonio (Genetica Medica), Dott.ssa Cariola Filomena (Genetica Medica), Dott. Gentile Mattia (ASL di Bari)*

Introduzione

Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) è la causa più comune di malattia epatica cronica nei paesi industrializzati sia in adulti che in ragazzi accompagnando l'epidemia di obesità, la così detta globesità. E' stato stimato che dal 20% al 30% degli adulti e dal 3% al 10% dei ragazzi del mondo occidentale hanno la NAFLD e questa percentuale arriva fino all'80% nella popolazione obesa. Il termine NAFLD comprende una serie di momenti della malattia epatica cronica dalla simple steatosi alla steatoepatite (NASH) con lesioni epatocellulari, necroinfiammazione ed attivazione della fibrogenesi epatica.

Le nuove metodologie hanno identificato sei polimorfismi associati alla NAFLD.

Obiettivo dello studio

Obiettivo di questa ricerca è quello di stimare l'associazione tra i diversi polimorfismi e della loro combinazione con la severità della NAFLD.

Stato di avanzamento del progetto

Sono stati arruolati 60 soggetti con le caratteristiche su menzionate che rientravano nel trial clinico "Effetto di due programmi di attività fisica di diversa intensità, della Dieta Mediterranea e della loro combinazione sulla NAFLD e sul profilo lipidico della membrana dei globuli rossi". Nell'ambito di questo progetto sono stati arruolati soggetti con diversi gradi di severità di NAFLD. I soggetti sono stati richiamati per il prelievo di sangue e per ottenere il loro consenso informato per questo ulteriore accertamento di laboratorio. I 60 controlli sono stati selezionati dalla popolazione generale di Putignano dagli elenchi già in possesso del Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica.

Per capire la valenza di questo progetto si allega database dei dati raccolti e referto relativo all'analisi genetica di un soggetto rientrato nello studio

Progetto: *"Analisi del profilo degli acidi grassi e dell'espressione dei recettori CB1e CB2 in campioni ematici di pazienti operati per cancro del colon-retto con e senza metastasi sincrone"*
(Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile scientifico: *Dott.ssa Maria Notarnicola*

Personale coinvolto: *dott. Dionigi Lorusso (Chirurgia Generale), dott.ssa Maria Gabriella Caruso (Nutrizione clinica), dott.ssa Valeria Tutino (biologa contrattista), sig. Giampiero De Leonardis (perito chimico, borsista), sig.na Valentina De Nunzio (perito chimico, borsista), sig.na Gisella Marascelli (operatore sanitario borsista)*

Introduzione

La "Lipidomica" studia le molecole dei lipidi in modo "dinamico", ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il "metabolismo cellulare", in condizioni fisiologiche e patologiche. Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che alterazioni della composizione lipidica della membrana cellulare sono associate al cancro colo-rettale (CRC), considerato una patologia metabolica dal momento che le cellule riprogrammano i loro pathways metabolici per sostenere l'elevata attività proliferativa. Nella

carcinogenesi del colon un ruolo importante viene svolto dal sistema endocannabinoide; confermando i dati della letteratura, abbiamo precedentemente dimostrato come il recettore per gli endocannabinoidi CB1) sia poco espresso nel tumore rispetto al tessuto normale circostante la neoplasia. Nostri studi pre-clinici hanno inoltre dimostrato come il processo neoplastico sia influenzato dall'espressione di recettori cellulari, noti avere un tono inibitorio sulla crescita tumorale, quali il recettore LDL, il recettore estrogenico ER β e il recettore CB1.

Obiettivi

Partendo dall'evidenza scientifica che i pazienti con CRC con metastasi sincrone mostravano un profilo lipidico sierico alterato rispetto ai pazienti con CRC senza metastasi sincrone, l'obiettivo di questo studio è quello di individuare profili lipidici di membrana caratteristici con elementi comuni di deficit, carenze o trasformazioni metaboliche nell'ambito dei gruppi dei pazienti selezionati. Da questi profili sarà successivamente possibile individuare le componenti bioattive/nutrizionali necessarie al recupero delle condizioni di equilibrio fisiologico. Associare l'analisi lipidomica allo studio dei recettori CB1 e CB2 consentirà di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di eventuali alterazioni o cambiamenti metabolici associati allo stato di malattia.

Attività svolte

Il progetto, dopo approvazione da parte del Comitato Etico, ha reclutato ad oggi 51 pazienti (29 maschi e 22 femmine), operati per carcinoma del colon-retto di cui 25 con metastasi sincrone e 26 senza metastasi al momento dell'intervento chirurgico. Durante il 2017 sono stati studiati i profili lipidomici di ciascun paziente sia sulle membrane dei globuli rossi che sul campione tissutale prelevato al momento della chirurgia. Sul siero degli stessi pazienti è stato fatto anche lo studio del pattern delle LDL: sono state dosate le LDL ossidate, glicate e le LDL piccole e dense con il Sistema Lipoprint

Risultati

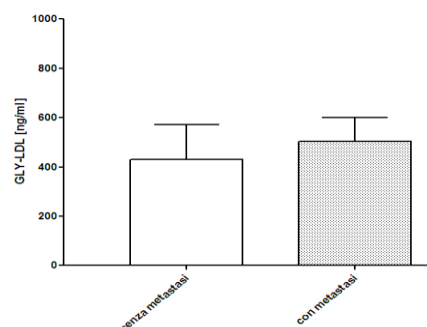
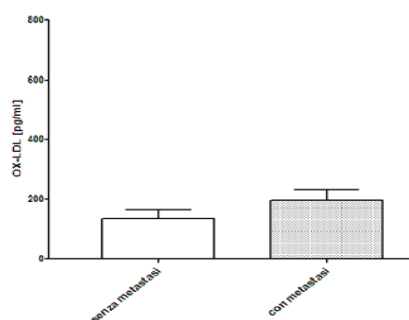
L'analisi lipidomica sulle membrane dei globuli rossi non riusciva a discriminare la presenza delle metastasi, mentre lo studio condotto sui tessuti dimostrava un più alto valore del rapporto omega6/omega3 presente nei pazienti con metastasi sincrone rispetto a quelli senza metastasi. Alterazioni significative si osservavano nei livelli di GLA e di EPA, un acido grasso polinsaturo omega-6 e omega-3, rispettivamente.

	Mucosa normale			Tessuto torale		
	No Metastasi	Metastasi	<i>p</i> -value °	No Metastasi	Metastasi	<i>p</i> -value °
SFAs	42.09±5.1	47.54±7.8	0.62	49.97±4.2	48.53±3.9	0.84
MUFAs	40.54±3.5	38.22±4.0	0.73	32.20±2.7	33.71±4.3	0.90
PUFAs	17.37±2.0	15.99±1.9	0.60	17.83±3.1	16.7±0.8	0.77
n-6/n-3	8.85±5.82	15.10±16.2	0.40	6.2±4.5	15.2±9.2	0.04
Stearic acid	15.2±6.8	18.8±7.8	0.22	18.56±7.5	19.6±6.7	0.71
Oleic acid	28.2±8.4	35.5±6.6	0.30	18.6 ±4.5	21.3±3.9	0.62
SI *	0.95±1.5	0.72±1.42	0.51	0.98±0.49	1.5±0.7	0.86
GLA	0.16±0.6	0.26±0.8	0.83	0.09±0.11	0.34±0.2	0.05
EPA	0.47±0.6	0.36±0.7	0.32	0.99±0.54	0.46±0.54	0.002
DHA	0.4±0.35	0.2±0.18	0.30	0.69±0.48	0.54±0.6	0.24

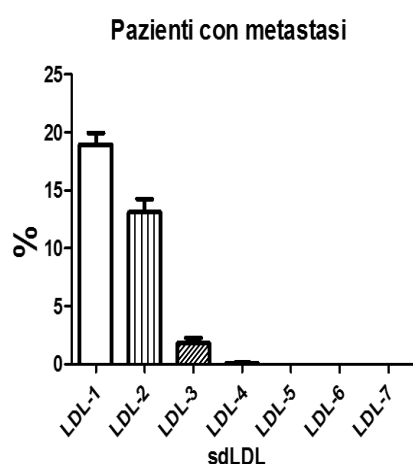
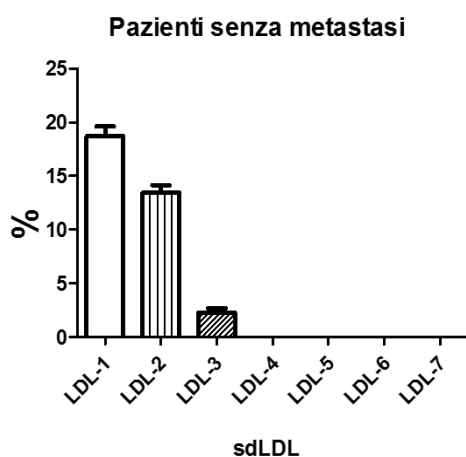
* Saturation Index (stearic acid/oleic acid ratio)

°Wilcoxon rank-sum (Mann Whitney) test

Tutti i valori sono espressi come Media±Deviazione Standard



LDL piccole e dense



I pazienti con metastasi sincrone presentano livelli più alti di LDL ossidate e glicate e come si può osservare dai grafici la frazione delle LDL-4 è presente solo nel siero dei pazienti con metastasi, suggerendo un pattern patologico del profilo LDL associato allo stato più avanzato e aggressivo della patologia neoplastica.

Ambulatorio di Nutrizione clinica

Progetto: *“Effetti di una dieta latte ovo vegetariana arricchita in omega tre sul profilo lipidomico in donne in postmenopausa”* (Scadenza: 31/05/2017)

Responsabile: Dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: dott.ssa O. Rotolo (biotecnologa borsista - fondi regionali), dott.ssa I. Zinzi (dietista borsista - fondi regionali), dott.ssa M. Notarnicola (Biochimica nutrizionale), dott.ssa V. Tutino (Contrattista), sig. V. De Nunzio (borsista), , sig. G. De Leonardis (borsista)

Introduzione

La conduzione di stili di vita corretti, a partire da una dieta sana e dall'esercizio fisico, sono un importante fattore di prevenzione contro i più comuni disturbi della menopausa e malattie croniche. Inoltre, la prevenzione secondaria (screening e diagnosi precoce, controlli medici e ginecologici frequenti) e una maggiore attenzione verso i cambiamenti del proprio corpo possono contribuire ad aiutare le donne a vincere le loro paure sulla menopausa e a godersi questa fase della vita.

Il passaggio alla menopausa può essere correlato a disturbi più o meno importanti. Esistono disturbi non correlati con certezza come ad esempio la variazione di tono dell'umore (irritabilità e depressione), i dolori osteoarticolari, l'aumento di peso e l'ipertensione. Ci sono poi una serie di disturbi certamente correlati: l'aumento del colesterolo e dei trigliceridi, l'aumento del rischio cardiovascolare (infarto e ictus), la difficoltà a dormire, la sudorazione, le cosiddette “vampate” - fenomeni vasomotori dovuti al funzionamento irregolare dei centri che controllano la temperatura corporea - disturbi urinari, secchezza di capelli e cute e l'osteoporosi. Perciò sono potenzialmente a rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, diabete, obesità e quindi rappresentano un target per valutare l'efficacia di studi d'intervento nutrizionale basati su diete protettive verso le MCV e il diabete.

Studi epidemiologici hanno mostrato che diete ricche di alimenti vegetali possono prevenire diverse patologie, tra cui malattie cardiovascolari, malattie metaboliche, patologie infiammatorie e cancro. Altri studi hanno dimostrato che alcuni cibi di origine vegetale La menopausa è una fase molto delicata e transitoria nella vita di ogni donna, durante la quale è sempre più possibile mantenere inalterata la qualità della vita. In Italia le donne in menopausa sono oltre 13 milioni; 5 su 100 entrano in questa fase prima dei 40 anni (precoce), 15 su 100 prima dei 45. Mentre l'età di ingresso nella menopausa si è mantenuta costante intorno ai 50 anni, l'aspettativa di vita nel corso dei secoli si è progressivamente allungata fino a superare gli 80 anni (84,6 anni), allargando il tempo trascorso in questa fase, che può durare anche più di 30 anni. Decade quindi il vecchio stereotipo secondo cui menopausa è sinonimo esclusivo di invecchiamento. Eppure, oggi la menopausa è un argomento di cui si parla molto poco nel nostro Paese, e spesso ancora in modo distorto.

La riduzione o la cessazione delle funzioni ovariche e il conseguente venir meno della produzione di estrogeni (gli ormoni femminili) comportano una serie di alterazioni sia a carico degli organi genitali (atrofizzazione dei tessuti interni della vagina, con conseguente sensazione di secchezza, prurito, dolore durante i rapporti sessuali), che di altri tessuti (quello osseo in modo particolare), alterazioni dell'equilibrio ormonale, del sistema nervoso e di quello cardiovascolare.

La conduzione di stili di vita corretti, a partire da una dieta sana e dall'esercizio fisico, sono un importante fattore di prevenzione contro i più comuni disturbi della menopausa e malattie croniche. Inoltre, la prevenzione secondaria (screening e diagnosi precoce, controlli medici e ginecologici frequenti) e una maggiore attenzione verso i cambiamenti del proprio corpo possono contribuire ad aiutare le donne a vincere le loro paure sulla menopausa e a godersi questa fase della vita.

Il passaggio alla menopausa può essere correlato a disturbi più o meno importanti. Esistono disturbi non correlati con certezza come ad esempio la variazione di tono dell'umore (irritabilità e depressione), i dolori osteoarticolari, l'aumento di peso e l'ipertensione. Ci sono poi una serie di disturbi certamente correlati: l'aumento del colesterolo e dei trigliceridi, l'aumento del rischio cardiovascolare (infarto e ictus), la difficoltà a dormire, la sudorazione, le cosiddette "vampate" - fenomeni vasomotori dovuti al funzionamento irregolare dei centri che controllano la temperatura corporea - disturbi urinari, secchezza di capelli e cute e l'osteoporosi. Perciò sono potenzialmente a rischio di sviluppare malattie cardiovascolari, diabete, obesità e quindi rappresentano un target per valutare l'efficacia di studi d'intervento nutrizionale basati su diete protettive verso le MCV e il diabete.

Studi epidemiologici hanno mostrato che diete ricche di alimenti vegetali possono prevenire diverse patologie, tra cui malattie cardiovascolari, malattie metaboliche, patologie infiammatorie e cancro. Altri studi hanno dimostrato che alcuni cibi di origine vegetale contengono quantità elevate di sostanze antiossidanti, sostanze che combattono i radicali liberi, o che hanno azione anti-invecchiamento.

Recentemente lo sviluppo di nuove metodologie "omiche" ha consentito di studiare a livello molecolare i cambiamenti nella composizione delle membrane cellulari.

La "Lipidomica" è una disciplina che studia le molecole dei lipidi in modo "dinamico", ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il "metabolismo cellulare", in condizioni fisiologiche o patologiche, e definendone i ruoli nell'ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente.

Gli acidi grassi, che costituiscono una delle componenti delle membrane biologiche di maggior interesse, svolgono funzioni strutturali, energetiche e metaboliche e da un punto di vista chimico sono catene acidiche lineari, monocarboniose, di lunghezza variabile. Un'analisi quantitativa e qualitativa degli acidi grassi presenti nelle membrane cellulari permette di monitorare i cambiamenti nelle loro molecole che avvengono per cause metaboliche, intrinseche ed estrinseche, quali l'infiammazione, lo stress, l'alimentazione.

Evidenze scientifiche hanno dimostrato che per studi nutrizionali, la cellula rappresentativa è l'eritrocita, biomarcatore dello stato di salute generale di un individuo. Infatti, dalla valutazione della composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana del globulo rosso, che ha una emivita di 4 mesi, è possibile monitorare lo stato nutrizionale di un soggetto e conoscere le sue abitudini alimentari, soprattutto per quanto riguarda il consumo di grassi.

Obiettivi

Valutare gli effetti di una dieta latte ovo vegetariana arricchita con omega tre (DIETA LoVE) rispetto ad una dieta latte ovo vegetariana tradizionale (DIETA LoVE) sul profilo lipidico, glucidico, parametri antropometrici e bioimpedenziometrici, nonché il profilo lipidomico delle membrane dei globuli rossi in donne in menopausa afferenti al nostro ambulatorio di nutrizione clinica. Inoltre nello stesso gruppo di soggetti saranno valutati parametri biochimici dello stato

ossidativo ed infiammatorio e studiate le variazioni dei comuni disturbi vasomotori correlati alla menopausa.

Il progetto (Prot. N.24/CE/De Bellis), è stato approvato dal CE in data 16 marzo 2016 prot. N.15 CE del 18 marzo 2016 e da aprile 2016 è iniziato il reclutamento delle donne presso l'ambulatorio di Nutrizione Clinica dell'Istituto.

Disegno dello studio

Studio randomizzato aperto. Durata del trattamento: 3 mesi; durata della sperimentazione in toto fino all'analisi dei risultati: 12 mesi

I soggetti (n=50), tutte donne in menopausa da almeno 12 mesi, in sovrappeso o obese, di età compresa tra i 45 e 55 anni saranno sottoposti ad un prelievo ematico per esami ematochimici, a visita medica con misurazione della PA e di parametri antropometrici (peso, altezza, circonferenze vita e fianchi). Sarà chiesto loro di firmare un consenso informato.

I soggetti rispondenti ai criteri di inclusione saranno arruolati nel progetto.

Criteri di inclusione: BMI 25-33, glicemia basale a digiuno < 110mg/dl; colesterolo totale >200<260 mg/dl; trigliceridi >150mg/dl<200

Criteri di esclusione: uso di TOS, uso di farmaci ipolipidemizzanti, diagnosi di diabete, uso di corticosteroidi

I soggetti arruolati, prima dell'inizio della dieta, sono stati invitati a seguire un periodo di run-in di due settimane durante il quale seguiranno la loro dieta abituale, evitando cibi ad alto contenuto di antiossidanti, e ad assumere probiotici o nutraceutici. Per facilitare l'aderenza a questo piano dietetico sarà dato ai soggetti un foglio di diario settimanale dove annoteranno la loro dieta ed i cibi consumati e le dietiste forniranno loro le istruzioni giuste per escludere dalla loro dieta cibi ricchi in antiossidanti.

Successivamente i soggetti arruolati sono stati randomizzati ad uno dei due tipi di dieta, DIETA L ω VE e DIETA LoVE, che seguiranno per 3 mesi. Alla fine del periodo di run-in, dopo 4 settimane e dopo 12 settimane dall'inizio della dieta, le donne saranno sottoposte a prelievo ematico dopo un digiuno di 12 ore e i campioni saranno conservati a -80°C e successivamente analizzati. Sarà somministrato un questionario con scala di Kupperman all'inizio e alla fine dell'intervento dietetico.

Sono state reclutate a tutt'oggi 50 donne in menopausa da almeno 12 mesi che sono state randomizzate ad uno dei due tipi di dieta: Dieta LOVE e Dieta L ω VE. Di queste 40 hanno già concluso lo studio mentre 10 donne sono state drop out. Tutte hanno ricevuto la dieta e sono sottoposte al protocollo di visite e prelievi previsto dallo studio.

Sulle 40 donne che hanno concluso lo studio, sono state effettuate le analisi biochimiche di laboratorio, il test lipidomico, le misurazioni antropometriche, la bioimpedenziometria e la calorimetria indiretta, al baseline e alla fine dei tre mesi di dieta. I risultati delle suddette misurazioni sono stati conservati in archivio e saranno oggetto di valutazione statistica al termine dello studio.

Lo studio si è concluso alla fine di dicembre 2017 e i risultati sono in corso di valutazione ed elaborazione statistica.

L'obiettivo dello studio è stato raggiunto perché abbiamo valutato gli effetti di una dieta latte ovo vegetariana arricchita con omega tre (DIETA L ω VE) rispetto ad una dieta latte ovo vegetariana tradizionale (DIETA LoVE) sul profilo lipidico, glucidico e lipidomico delle membrane dei globuli rossi in donne in menopausa afferenti al nostro ambulatorio di nutrizione clinica. Inoltre nello stesso

gruppo di soggetti abbiamo valutato parametri biochimici dello stato ossidativo ed infiammatorio, come le LDL ossidate e LDL glicate, e le LDL piccole e dense. E' stata anche valutata la risposta in termini di sintomatologia vasomotoria ai due tipi di dieta.

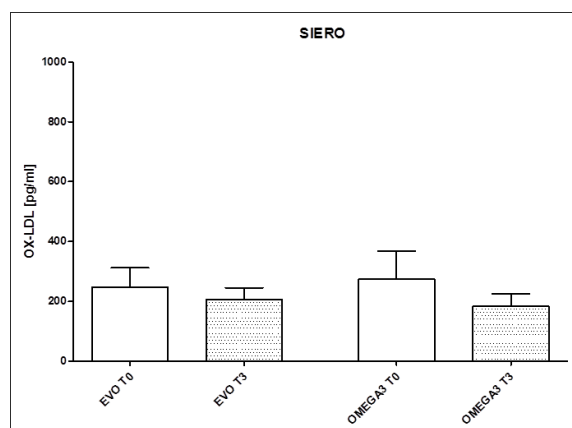
RISULTATI

I risultati riportati nelle figure sottostanti si riferiscono alle 40 donne che hanno concluso lo studio.

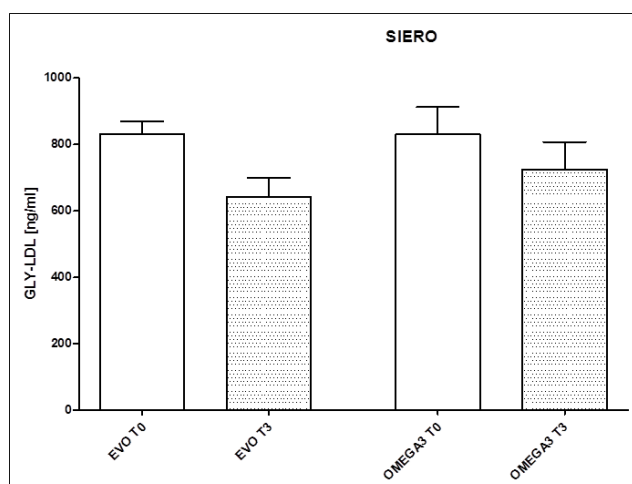
I dati sono espressi come media $\pm$ DS (n.° soggetti 40 età 54 $\pm$ 6 anni)

	DIETA LoVE T0	DIETA LoVE T3	p $\leq$ 0.05	DIETA LoVE T0	DIETA LoVE T3	p $\leq$ 0.05
Peso corporeo (Kg)	81.3 $\pm$ 13	74.6 $\pm$ 12	0.03	70.7 $\pm$ 11	64.6 $\pm$ 8.7	0.03
Indice Massa Corporeo	30.4 $\pm$ 4.5	28.1 $\pm$ 3.9	0.03	28.2 $\pm$ 3.5	25.3 $\pm$ 2.8	0.03
Circ. Vita (cm)	95.5 $\pm$ 12	86.4 $\pm$ 8.6	0.03	95.1 $\pm$ 11	86.3 $\pm$ 8.8	0.03
Massa Grassa (kg)	31.2 $\pm$ 9.3	24.4 $\pm$ 7.3	0.03	24.7 $\pm$ 6	19.2 $\pm$ 4.8	0.03
Massa Magra (kg)	50.8 $\pm$ 4.6	51.2 $\pm$ 4.5	ns	46.3 $\pm$ 5	44.6 $\pm$ 4.2	ns
Col.Tot (mg/dl)	199.5 $\pm$ 35	203.3 $\pm$ 33	ns	212.4 $\pm$ 45	192.1 $\pm$ 49	ns
Trigliceridi (mg/dl)	113.6 $\pm$ 33	102.2 $\pm$ 55	ns	144.4 $\pm$ 13	131.8 $\pm$ 45	ns
HDLCol (mg/dl)	48.4 $\pm$ 9.5	43.4 $\pm$ 6.4	ns	45.3 $\pm$ 15	54.8 $\pm$ 16**	0.03
Col tot/HDL col	4.1 $\pm$ 0.9	4.7 $\pm$ 0.5	ns	5.3 $\pm$ 1.7	3.7 $\pm$ 0.5	0.03
Glicemia (mg/dl)	95.5 $\pm$ 4.6	91.0 $\pm$ 5.4	0.03	89.3 $\pm$ 7.2	85.4 $\pm$ 1.5	ns
Insulina (mg/dl)	9.3 $\pm$ 4.7	5.3 $\pm$ 3.05	0.03	8.6 $\pm$ 4.8	4.4 $\pm$ 0.7	0.05

**Mann-Whitney test p= 0.009

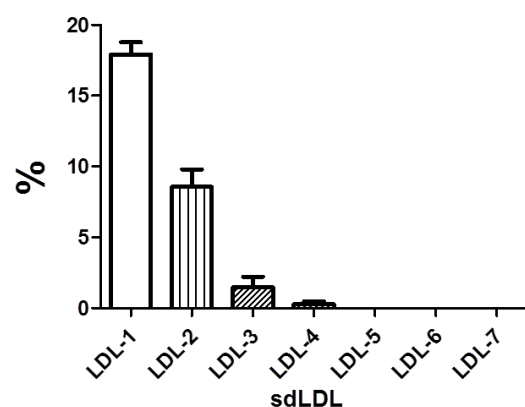


Non vi sono differenze statisticamente significative nei livelli di LDL ossidate nei due gruppi di donne sottoposte ai due tipi di dieta.

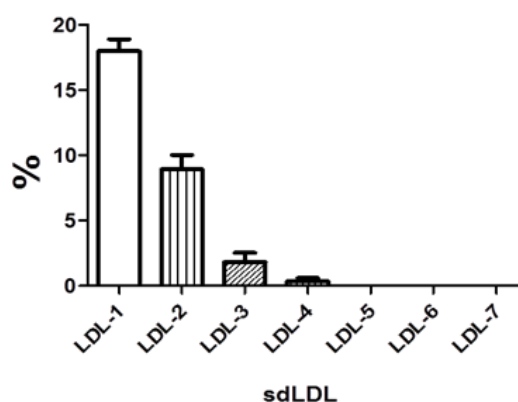


Non vi sono differenze statisticamente significative nei livelli di LDL glicate nei due gruppi di donne sottoposte ai due tipi di dieta.

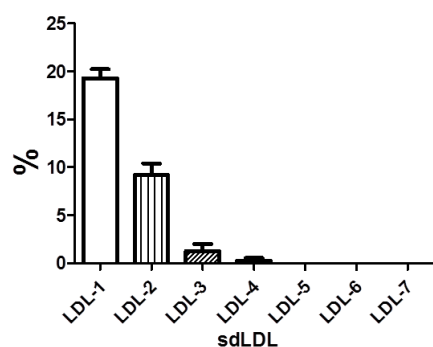
Donne in menopausa dieta EVO T0



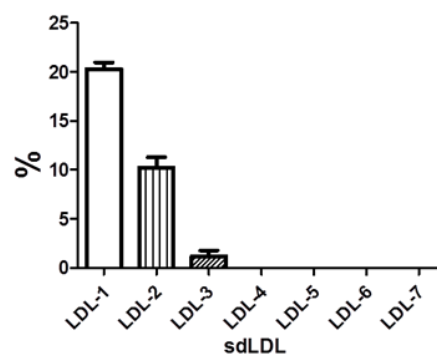
Donne in menopausa dieta EVO T3



Donne in menopausa dieta OMEGA-3 T0



Donne in menopausa dieta OMEGA-3 T3



Non vi sono differenze statisticamente significative nei livelli di LDL piccole e dense nei due gruppi di donne sottoposte ai due tipi di dieta.

PROFILO LIPIDOMICO NEI DUE GRUPPI DI DONNE

		SF As 30- 45	MUF As 13-23	PUF As 28-39	n6/n 3 3- 4,5	palmita to 17 - 27	palmitole ico 0,2 - 0,5	steari co 13 - 20	oleic o 9 - 18	vacceni co 0,7- 1,3	SI (stearico/ole ico)
DIET A EVO	T 0	53,4 9	23,20	23,31	3,52	27,79	0,14	20,14	11,9 3	1,80	1,77
	T 3	54,2 7	23,76	21,98	4,21	28,32	0,32	19,29	11,7 2	1,66	1,70
DIET A OME GA 3	T 0	52,4 6	23,23	24,28	3,64	26,89	0,17	19,93	12,2 6	1,74	1,68
	T 3	56,4 9	20,98	22,53	3,16	28,42	0,30	22,32	11,4 3	1,49	2,17

Conclusione

I due tipi di diete sono efficaci nel ridurre parametri antropometrici e bioimpedenziometrici ma non hanno avuto alcun effetto sul profilo delle LDL, sia ossidate che glicate che piccole e dense, né sul profilo lipidomico

Progetto: “Valutazione del profilo lipidomico e delle LDL piccole e dense nelle malattie cronico-degenerative in una coorte di soggetti over 65 dell’Italia Meridionale: studio nested caso-controllo” (Scadenza: 31/05/2017)

Responsabile: Dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: Caterina Bonfiglio (Epidemiologia e Biostatistica), Alberto Ruben Osella (Epidemiologia e Biostatistica), Maria Notarnicola (Biochimica Nutrizionale)

Introduzione

La “Lipidomica” studia le molecole dei lipidi in modo “dinamico”, ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il “metabolismo cellulare”, in condizioni fisiologiche e patologiche, e definendone i ruoli nell’ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente. L’analisi lipidomica di membrana include la descrizione quantitativa dei lipidi costituenti la membrana cellulare. I lipidi di membrana non presentano la medesima composizione quantitativa, ma variano a seconda del tessuto e del compartimento cellulare. La diversità nei residui di acidi grassi è necessaria per modulare le proprietà biofisiche e biochimiche delle membrane, la cui composizione deve essere in accordo con le necessità cellulari in ogni condizione metabolica.

Il doppio strato fosfolipidico, con caratteristiche anfipatiche, costituente base della membrana cellulare, è stato definito il pacemaker metabolico della cellula, in grado di descrivere il network di attività e di segnali veicolati alla e dalla membrana. La parte idrofobica della membrana è costituita dagli acidi grassi (saturi, mono- e polinsaturi) che provengono sia dalla sintesi endogena che dalla dieta (soprattutto per gli acidi grassi essenziali omega-6 ed omega-3). Il controllo omeostatico della composizione dei fosfolipidi di membrana è essenziale per la crescita cellulare e per la sopravvivenza ed è finemente regolato. Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che

alterazioni della composizione lipidica della membrana cellulare sono associate al diabete, alle malattie cardiovascolari ed al cancro, considerato oggi una patologia metabolica dal momento che le cellule riprogrammano i loro pathways metabolici per sostenere l'elevata attività proliferativa. Le alterazioni del metabolismo lipidico sono spesso una conseguenza dell'attivazione di oncogeni che promuovono la trasformazione in senso neoplastico di un tessuto. Precedentemente, noi abbiamo dimostrato che il tessuto colico tumorale presenta elevate attività non solo dell'enzima FAS (acido grasso sintetasi), ma anche di altri enzimi lipogenici come LPL (Lipoprotein Lipasi), HMGCoA reduttasi e FPPS (Farnesyl pirofosfato sintetasi).

Inoltre, recentemente, un nostro studio ha dimostrato, su un numero ristretto di casi, un alterato profilo degli acidi grassi di membrana nei pazienti con CRC rispetto ai pazienti con patologie gastrointestinali non neoplastiche [11]. Si osservava soprattutto una riduzione dei livelli degli acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 (n-3 PUFA) e un alterato rapporto n-6/n-3 PUFA.

Recentemente, particolare attenzione è rivolta al dosaggio sierico delle LDL piccole e dense, considerate attendibili marcatori biochimici associati ad un aumentato rischio di patologie metaboliche.

La combinazione del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi e il dosaggio dei livelli sierici delle LDL piccole e dense nei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, associati a parametri biochimici canonici sarà importante per ottenere una descrizione accurata dello scenario delle trasformazioni metaboliche che possono evidenziarsi in queste patologie.

Obiettivi

Stimare l'effetto della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi sull'incidenza del Cancro e infarto del miocardio. La valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio sarà effettuata su un campione di sangue periferico prelevato in provette con EDTA. Il campione ematico sarà stratificato su gradiente di FICOLL per separare plasma, linfociti e globuli rossi e sulla frazione dei globuli rossi verrà effettuata un'estrazione di lipidi totali [11]. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati con toluene e bromo-fluoruro e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici dei singoli soggetti arruolati nello studio saranno analizzati e studiati confrontandoli con cromatogrammi ottenuti iniettando metil esteri di acidi grassi usati come standards.

Stimare l'effetto delle LDL piccole e dense sull'incidenza del Cancro e di infarto del miocardio.

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Metodologie e analisi statistiche

Disegno dello Studio

Studio nested caso-controllo in una coorte di soggetti di un'area Mediterranea del Sud Italia.

I dati al baseline sono stati già raccolti e la banca biologica organizzata.

La coorte è stata arruolata nel 2005-2006 nel nostro istituto nell'ambito del progetto MICOL 3.

La coorte è stata arruolata nel 2005/2006 con un progetto finalizzato finanziato dal Ministero della Salute e condotto dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Laboratorio di Biochimica della Nutrizione e Laboratorio di Patologia Clinica dell'IRCCS Saverio de Bellis.

All'arruolamento i soggetti furono visitati, completarono un FFQ validato, furono ottenuti dettagli della loro storia medica ed i campioni di sangue conservati.

Nel 2013 i soggetti che a questa data avevano almeno 65 anni sono stati richiamati e sottoposti agli stessi controlli dell'arruolamento e gli eventi di malattia sono stati registrati. La diagnosi di ognuno degli eventi di interesse è stata validata con i medici di famiglia di ciascun soggetto.

La diagnosi di evento cardiovascolare è stato effettuato sulla base della diagnosi di Infarto Acuto del Miocardio insieme ad almeno un ECG che evidenziava lesioni acute del miocardio alla dimissione ospedaliera. La diagnosi di cancro è stata basata sulla presenza di diagnosi clinica e istopatologica o di dati ospedalieri che indicavano procedure chirurgiche o terapie mediche per il cancro.

Analisi Lipidomica

Sulla frazione dei globuli rossi dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, nonché dei controlli appartenenti tutti alla stessa coorte, conservata a -80°C , verrà effettuata un'estrazione di lipidi totali, utilizzando cloroformio e metanolo (3:1) secondo il metodo di Folch [16]. Gli acidi grassi così ottenuti saranno derivatizzati con toluene e bromo-fluoruro e analizzati in un gas cromatografo, utilizzando una colonna capillare polare di 60 m e un detector tipo FID. I profili lipidici saranno analizzati e studiati confrontandoli con cromatogrammi ottenuti iniettando metil esteri di acidi grassi usati come standards.

Analisi LDL piccole e dense

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, nonché dei controlli appartenenti tutti alla stessa coorte, conservato a -80°C , sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Analisi Statistica

La descrizione del campione verrà effettuata con tabelle di contingenza utilizzando modelli statistici appropriati per dati quantitativi (media, deviazione standard) e qualitativi (percentuali).

Verranno utilizzati inoltre due tipi di modellistica: regressione logistica classica e con effetti random ed analisi della sopravvivenza. Il modello di regressione logistica multipla è particolarmente utile per quantificare l'associazione esistente tra un fattore di rischio (esposizione), in questo caso il profilo lipidomico e le LDL piccole e dense, e l'outcome binario di interesse. Ciò nonostante in certi casi esistono differenze tra gli individui che li rendono eterogenei tra di loro ma questa eterogeneità non è stata misurata né osservata. Per questo motivo verrà utilizzato un modello logistico misto che permette di modellare il rapporto esposizione-outcome tenendo conto di questa eterogeneità. Inoltre dopo il processo di stima dei parametri di interesse (Odds Ratio) degli effetti principali verranno esplorate tutte le interazioni biologicamente plausibili all'uopo di ottenere un modello valido e biologicamente parsimonioso. Successivo approccio alla stima dei parametri sarà la stima delle distribuzioni marginali con l'obiettivo di ottenere la probabilità del verificarsi

dell'outcome per le varie combinazioni delle variabili contenute nel modello. Verrà inoltre effettuato un'analisi di sensibilità dei parametri stimati con l'obiettivo di saggiare quanto sono resistenti le stime ottenute alla proposta di scenari estremi. In questa analisi di sensibilità verranno presi in considerazione errori sistematici di classificazione, informazioni e confounding.

Il software statistico Stata 14.1 verrà utilizzato per tutte le analisi statistiche (Stata Statistical Software: Release 14, College Station, TX, USA).

Risultati al primo anno

Il progetto parte con il vantaggio di una coorte già stabilita e seguita per dieci anni. Per ogni soggetto conosciamo la storia medica, lo stile di vita, esposizione a fattori nutrizionali e parametri di laboratorio classici. Inoltre disponiamo di campioni biologici conservati nella biobanca su cui andare a dosare markers enzimatici o recettoriali che possono aiutare nell'identificazione di profili metabolici precoci di malattie complesse come il diabete, malattie cardiovascolari e cancro.

Il progetto è stato avviato a luglio 2017 in concomitanza con la stipula del contratto ad un medico esperto in epidemiologia e malattie croniche degenerative. Contemporaneamente è stata messa a punto la metodologia del dosaggio delle LDL piccole e dense.

E' stata anche rivalutata la coorte e sono stati aggiornati i dati di mortalità per malattie cardiovascolari e per tumore della coorte MICOL III al dicembre 2016.

Nel frattempo l'occasione è stata propizia per studiare la coorte MICOL e ricavarne dati ed associazioni con vari determinanti di malattia e patologie croniche.

E' in corso di determinazione l'analisi delle LDL piccole e dense sui casi di morte per malattie cardiovascolari e tumore della coorte MICOL III (morti per malattie cardiovascolari n° 85 e tumore n°75).

Progetto: “Diete, microbiota intestinale e metabolomica: valutazione di possibili sinergie”(Scadenza: 31/05/2017)

Responsabile: Dott. Gioacchino Leandro

Partecipanti: Maria Gabriella Caruso (Nutrizione clinica), Ornella Rotolo (Borsista), Lorenzo Drago, Maria Notarnicola (Biochimica Nutrizionale)

Introduzione

Lo studio delle interazioni tra alimentazione, microbiota intestinale e salute è un campo molto vasto e nuovo. La dieta è in grado di modificare l'espressione di molti geni batterici popolanti l'intestino dell'ospite, oltre che il tipo di batteri stessi, con la conseguenza che, a seconda del substrato a disposizione a livello intestinale, vengano prodotti metaboliti capaci di influenzare positivamente o negativamente la salute dell'individuo. Evidenze scientifiche dimostrano un nesso di causalità tra salute del microbiota e sviluppo di malattie infiammatorie intestinali, malattie cronico-degenerative, includenti il cancro e patologie nefrologiche (1,2,3,4).

I benefici apportati al microbiota dal largo consumo di fibre e da uno scarso apporto di proteine animali, testimoniato dall'analisi di campioni fecali, è già noto alla letteratura (5,6,7). La produzione di acidi grassi a catena corta (SCFAs) e un pH più acido delle feci conseguenti alla fermentazione delle fibre alimentari crea un ambiente meno adatto al prosperare di specie batteriche dal riconosciuto effetto patogeno e pro-infiammatorio (*Bacteroides spp*, *E.coli*, *Enterobacteriaceae*) e uno sviluppo di specie benefiche come i *Firmicutes*. Al contrario, i prodotti finali della fermentazione di substrati proteici, con pH superiore a 6,5, come acido solfidrico e ammoniaca,

contribuiscono alla patogenesi di molti disturbi gastro-intestinali, come IBS, dispepsia funzionale, cancro al colon retto. Alla luce di questi dati della letteratura, modulare la strategia dietetica da somministrare al paziente potrebbe rivelarsi un vero e proprio mezzo terapeutico e preventivo nei confronti di patologie tanto intestinali quanto sistemiche, dal momento che la dieta dei paesi occidentali industrializzati risulta sempre più ricca di proteine animali e di zuccheri e povera di alimenti di origine vegetale.

Studi presenti in letteratura confermano l'esistenza di un insieme di geni comune alla maggior parte dei soggetti ("microbiome core"); a partire da questo set di geni, il microbioma si differenzia a causa di diversi fattori: lo stato di salute dell'ospite, la sua dieta, l'ambiente in cui esso vive, il suo genotipo e l'eventuale contatto con altre colonie batteriche (8).

Nonostante l'eterogeneità riscontrata nel microbioma, si è giunti ad una classificazione degli individui basata sulla composizione batterica intestinale, definendo gli "enterotipi" come unità fondamentali di questa classificazione (9). Sulla base dell'analisi di sequenze di DNA provenienti da 39 campioni appartenenti a soggetti di sei diverse nazionalità si sono infatti individuati tre ceppi batterici principali (*Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*) i quali sono indipendenti da età, sesso, zona geografica di appartenenza o dieta, ed in base alla prevalenza di uno di essi, ogni individuo viene catalogato in uno dei tre enterotipi. Lo studio condotto dal MetaHIT ha evidenziato come sussista una relazione tra l'enterotipo di appartenenza e le funzioni del soggetto, quali ad esempio la produzione di alcune vitamine, la predisposizione all'obesità e forse anche il gruppo sanguigno (10). Si è inoltre evidenziato come il microbiota sia influenzato dallo stile di vita del soggetto, in particolar modo dalla dieta. Nel caso di dieta ricca di proteine e grassi animali si registra una predominanza dell'enterotipo *Bacteroides*, mentre una dieta composta principalmente da carboidrati comporta una predominanza di *Prevotella*. Si nota però che non si può effettuare una netta separazione degli enterotipi; si può piuttosto parlare di due tipologie di microbiota definiti "biome types" (*Bacteroides-Ruminococcus* e *Prevotella*) intesi come un continuo gradiente anziché come gruppi distinti (11). Nei soggetti è dunque possibile trovare maggior abbondanza di uno dei due "types", ma ci sarà sempre una loro parziale sovrapposizione.

La recente diffusione di tecniche di sequenziamento *high-throughput* ha apportato notevoli sviluppi nello studio del genoma umano e batterico, che consentono di produrre enormi quantità di sequenze ad un costo minore e ad una velocità superiore rispetto alle tecniche precedenti. Si possono infatti ottenere fino a 20 milioni di basi in contemporanea, rendendo tali tecnologie adatte a sequenziare genomi sempre più grandi.

In questo scenario di ricerca innovativa in forte crescita l'IRCCS De Bellis potrebbe avere un ruolo chiave, vista la posizione indiscussa di opinion leader nel territorio nella elaborazione di diete per soggetti obesi o in sovrappeso, l'ampio bacino d'utenza afferente alla struttura e la difficoltà di altri centri nell'arruolare soggetti sani al fine di coinvolgerli in studi di ricerca che prevedano una rigida adesione a uno specifico piano alimentare

Obiettivi del progetto

- Caratterizzare il microbiota intestinale con metodiche di metagenomica in soggetti sovrappeso/obesi prima e dopo precise terapie nutrizionali.
- Valutare se variazioni del microbiota intestinale correlano con parametri antropometrici e clinico-laboratoristici.

Metodologie e analisi statistiche

- Parametri antropometrici: circonferenza vita, fianchi, collo e polso;
- analisi emato-chimiche;
- ecografia addome superiore;
- composizione corporea mediante bioimpedenziometria;
- metabolismo basale mediante calorimetria indiretta;
- elaborazione e somministrazione, a tre gruppi di soggetti reclutati, di tre tipi di diete personalizzate sulla base del valore individuale di metabolismo basale (dieta A iperproteica, dieta B latte-ovo-vegetariana, dieta C mediterranea);
- somministrazione di un diario settimanale in cui il soggetto annota quotidianamente gli alimenti assunti ed eventuali sintomi gastrointestinali post-prandiali (ripienezza, meteorismo, discomfort intestinale, gonfiore addominale ecc..)
- caratterizzazione e studio del microbiota umano. L'analisi del materiale genetico prevede 2 step: il primo consiste nel processare i campioni biologici ed estrarne il DNA, mentre in un secondo momento esso viene sequenziato, in modo da trovare l'ordine delle basi nucleiche lungo la catena di DNA. Attualmente lo sviluppo delle recenti tecniche di sequenziamento *high-throughput* hanno portato a progressi notevoli in quest'ambito grazie ai principali vantaggi legati alla capacità di produrre centinaia di milioni di read in breve tempo poiché si effettua il sequenziamento di un solo gene (il 16S del DNA ribosomiale) che, essendo specifico delle specie batteriche, ne consente la discriminazione;
- analisi bioinformatica dei risultati delle analisi di metagenomica;

analisi statistica relativa alle variazioni dei singoli parametri oggetto di studio (esami clinico-laboratoristici, parametri antropometrici, score di steatosi epatica ecc..) per individuare l'effetto delle singole diete sul soggetto e le eventuali differenze esistenti tra i tre tipi di diete.

Attività svolta

L'Ambulatorio di Nutrizione Clinica vanta di un ampio bacino d'utenza che permette l'arruolamento di soggetti sovrappeso/obesi rispondenti ai criteri di inclusione del progetto.

La Gastroenterologia 1, l'Ambulatorio di Nutrizione Clinica e il Centro Trial di codesto Istituto in collaborazione con il laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, IRCCS

Ospedale Galeazzi, Università di Milano, è in grado di sviluppare il progetto di ricerca grazie sia alle professionalità che vi lavorano, sia al personale borsista dedicato al progetto.

Il progetto (Prot. N 36 del CE De Bellis) è stato approvato dal CE in data 17 maggio 2017 Prot. N 92/CE 18/05/2017. Sono stati arruolati 2 soggetti sani per ciascun braccio di ricerca (6 in totale) con BMI compreso tra 29 e 33, età compresa tra i 18 e i 60 anni che negli ultimi 3 mesi non hanno assunto farmaci e pre/probiotici, a cui è stata somministrata una dieta iperproteica, mediterranea o latte-ovo-vegetariana a seconda della randomizzazione effettuata. Sono stati acquisiti parametri antropometrici (peso, altezza, circonferenze corporee), composizione corporea mediante bioimpedenziometria, calorimetria indiretta per ottenere il valore del metabolismo basale, analizzate le analisi emato-chimiche e il referto di ecografia dell'addome superiore al fine di conoscere l'eventuale presenza di steatosi epatica.

Per ciascun soggetto è stato prelevato quindi il primo campione fecale per analizzarne il microbiota al T0.

È stata effettuata la registrazione del trial clinico in esame.

Risultati conseguiti

Dopo aver rispettato per due mesi i tre tipi di dieta ipocalorica, si è verificato:

- un calo ponderale da parte di tutti i soggetti;
- un cambiamento dei sintomi gastro-intestinali collegati alla fermentazione di substrati diversi (fibre alimentari o proteine di origine animale);

L'analisi dei parametri emato-chimici e dei campioni fecali mediante tecniche di sequenziamento dei tre gruppi di soggetti non è stata ancora conclusa.

Progetto: “Effetto dei composti naturali sull’infiammazione e carcinogenesi sperimentale in modelli animali di cac e crc” (Scadenza: 31/12/2019)

Responsabile: Dott. Mauro Mastronardi

Partecipanti: Tafaro Angela (Contrattista), Grazia Tamma (Università degli studi di Bari), Francesco Caponio (Università degli studi di Bari), Alba Panarese (Gastroenterologia 2), Maria Notarnicola (Biochimica Nutrizionale), Giusi Bianco (Contrattista), Prosper N. Boyaka (Department of Veterinary Biosciences Ohio State University Columbus)

Nei paesi sviluppati, il cancro al colon rappresenta una delle maggiori cause di mortalità e questo è in parte da associare ad un regime alimentare di tipo occidentale. Recenti studi hanno evidenziato che numerosi fitocomposti presentano delle proprietà antiinfiammatorie e antiossidanti potenzialmente utili come agenti di chemio-prevenzione (Nagendraprabhu et al. Invest. New Drugs 2011; 29 (2): 207–2224). Nel presente studio ci stiamo occupando di valutare in vitro l'effetto della curcuma (CUR), nota per le sue proprietà antiossidanti, combinata con un estratto ottenuto dalle foglie dell'ulivo (OLE) della cultivar Coratina. In particolare, ci proponiamo di identificare le più basse concentrazioni dei singoli composti, che se combinati, riducono in maniera significativa i livelli intracellulari dei ROS. A tale scopo, come modello sperimentale sono state utilizzate le cellule umane di colon Caco-2. Il livello intracellulare dei ROS è stato misurato con l'utilizzo di una sonda fluorescente nota come dihydrorhodamine-123 (10 μ M), secondo un protocollo sperimentale già testato dal gruppo di ricerca della Prof. Tamma (Tamma et. al J Biol Chem. 2014 Oct 3;289(40):27807-13), che collabora al presente progetto. La sonda dihydrorhodamine-123, in condizioni neutre, non è fluorescente; la sua fluorescenza aumenta quando è ossidata in presenza di specie reattive. Al fine di individuare l'effetto antiossidante di questi fitocomposti, sono stati condotti degli esperimenti in cui è stato valutato il potere antiossidante dei singoli composti, curcuma e OLE, in cellule in cui lo stress ossidativo veniva indotto da tert-butyl hydroperoxide (tBHP). Nello specifico, le cellule sono state incubate per due ore con tre diverse concentrazioni di curcumina (10 μ M, 100 μ M, 200 μ M). Dopo questo trattamento le cellule sono state trattate per mezz'ora con l'ossidante tBHP (2mM). La fluorescenza sviluppata è stata misurata con il fluorimetro RF-5301PC. Come si evince dalla figura 1, rispetto alla condizione di controllo si osserva un incremento statisticamente significativo solo nelle cellule trattate con il tBHP (*). Analizzando i dati rispetto alla condizione tBHP, si può osservare che la curcumina ha un effetto antiossidante a tutte e tre le condizioni utilizzate. Sono stati condotti esperimenti analoghi per valutare il potere antiossidante dell'estratto ottenuto dalle foglie d'ulivo. In particolare, le cellule sono state trattate O/N a concentrazioni crescenti di OLE (0,001mg/ml, 0,01mg/ml, 0,1mg/ml).

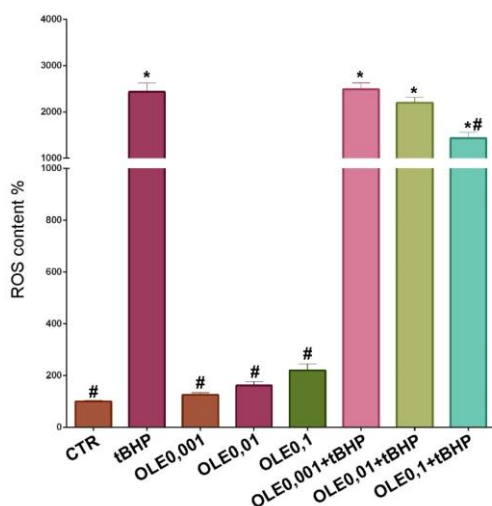


Fig.2

combinati. Alcune delle condizioni sono rappresentate nell'istogramma in figura 3. E' interessante osservare che le concentrazioni più basse di OLE (0,001mg/ml e 0,01 mg/ml), in presenza di curcumina 10 μ M non riducono in maniera significativa il livello intracellulare dei ROS. Aumentando la concentrazione di curcumina si osserva una riduzione significativa dei ROS anche alle più basse concentrazioni di OLE. Questo dato tuttavia potrebbe essere dovuto alla sola azione della curcumina come si evince dalla fig.1

Dall'analisi integrata di tutte le condizioni (fig.4) si osserva che la curcumina 10 μ M e l'OLE 0,1mg/ml, hanno un effetto combinato statisticamente significativo rispetto ai singoli trattamenti. Tuttavia poiché il livello dei ROS a tali concentrazioni risulta ancora elevato. Ci proponiamo di allestire altri test per identificare in vitro le concentrazioni migliori tali da ridurre in modo significativo, al pari del controllo, i livelli intracellulari dei ROS. Inoltre ci proponiamo di allestire dei test in cui le cellule vengono previamente sottoposte a stress ossidativo e poi trattate con questi antiossidanti di origine naturale.

I risultati sopra indicati sono relativi al primo anno di progetto. Con l'approvazione Ministeriale per la parte riguardante la sperimentazione animale si procederà agli studi *in vivo*.

Dopo questo trattamento le cellule sono state trattate per mezzora con l'ossidante tBHP. In figura 2 si può osservare che rispetto alla condizione in cui le cellule venivano lasciate in condizione di controllo, i ROS aumentano in modo significativo dopo il trattamento con il tBHP (*) in assenza e presenza di OLE. Si può tuttavia notare che rispetto alla condizione in cui le cellule venivano trattate con il tBHP (#), l'OLE determina una riduzione statisticamente significativa alla concentrazione di 0,1mg/ml.

Successivamente sono stati allestiti dei test in cui i trattamenti alle diverse concentrazioni venivano

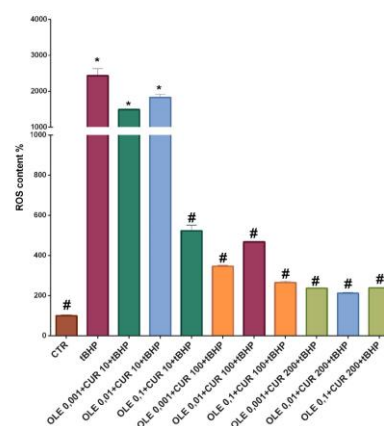


Fig.3

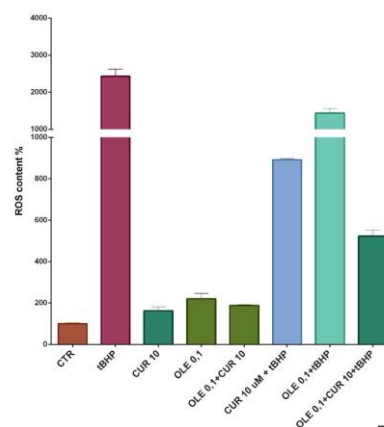


Fig.4

Elenco delle Pubblicazioni dell'Istituto anno 2017

LINEA 1

Malattie neoplastiche del fegato e del tubo digerente: Modelli sperimentali in ambito gastroenterologico

1. Clerico, A., Belloni, L., Carrozza, C., Correale, M., Dittadi, R., Dotti, C., Fortunato, A., Vignati, G., Zucchelli, G. C., Migliardi, M. & a document endorsed by the Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS). A Black Swan in clinical laboratory practice: the analytical error due to interferences in immunoassay methods. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017; 56(3):397-402.
2. Gion M., Trevisiol C., Rutjes A., Rainato G., Fabricio A., Contributors & Correale, M. Circulating tumor markers: a guide to their appropriate clinical use | Comparative summary of recommendations from clinical practice guidelines (PART 2). *International Journal of Biological Markers*. 2017; 32(1):e1-e52.
3. Cavallini, A., Rotelli, M. T., Lippolis, C., Piscitelli, D., Digennaro, R., Covelli, C., Carella, N., Accetturo, M. & Altomare, D. F. Human microRNA expression in sporadic and FAP-associated desmoid tumors and correlation with beta- catenin mutations. *Oncotarget*. 2017; 8(26):41866-41875.
4. Refolo, M. G., D'Alessandro, R., Lippolis, C., Carella, N., Cavallini, A., Messa, C. & Carr, IGF-1R tyrosine kinase inhibitors and Vitamin K1 enhance the antitumor effects of Regorafenib in HCC cell lines B. I. *Oncotarget*. 2017; 8(61):103465-103476.
5. Borzio, M., Dionigi, E., Vitale, A., Rossini, A., Marignani, M., Fornari, F., Vicari, S., De Sio, I., Farinati, F., Bertolini, E., Oliveri, F., Leandro, G., Francica, G., Mitra, M., Omazzi, B., Boccia, S., Salmi, A., Toldi, A. & Sacco, R. Management and prognosis of hepatocellular carcinoma in the elderly: Results of an in-field multicenter cohort study. *Liver International*. 2017; 37(8):1184-1192.
6. Critelli, R., Milosa, F., Faillaci, F., Condello, R., Turola, E., Marzi, L., Lei, B., Dituri, F., Andreani, S., Sighinolfi, P., Manni, P., Maiorana, A., Caporali, C., di Benedetto, F., Del Buono, M., De Maria, N., Schepis, F., Martinez-Chantar, M-L., Giannelli, G. & Villa E. Microenvironment inflammatory infiltrate drives growth speed and outcome of hepatocellular carcinoma: a prospective clinical study *Cell Death and Disease*. 2017; 8(8):e3017.
7. Cao, Y., Agarwal, R., Dituri, F., Lupo, L., Trerotoli, P., Mancarella, S., Winter, P. & Giannelli, G. NGS-based transcriptome profiling reveals biomarkers for companion diagnostics of the TGF- β receptor blocker galunisertib in HCC. *Cell Death and Disease*. 2017; 8(2):e2634.
8. Zhang, S. , Song, X. , Cao, D. , Xu, Z. , Fan, B. , Che, L. , Hu, J. , Chen, B. , Dong, M. , Pilo, M. G. , Cigliano, A. , Evert, K. , Ribback, S. , Dombrowski, F. , Pascale, R. M. , Cossu, A. , Vidili, G. , Porcu, A. , Simile, M. M. , Pes, G. M. & 7 others Giannelli, G., Gordan, J., Wei, L., Evert, M., Cong, W., Calvisi, D. F. & Chen, X. Pan-mTOR inhibitor MLN0128 is effective against intrahepatic cholangiocarcinoma in mice. *Journal of Hepatology*. 2017.

9. Agarwal, R., Cao, Y., Hoffmeier, K., Krezdorn, N., Jost, L., Meisel, A. R., Jüngling, R., Dituri, F., Mancarella, S., Rotter, B., Winter, P. & Giannelli, G. Precision medicine for hepatocellular carcinoma using molecular pattern diagnostics: results from a preclinical pilot study. *Cell Death and Disease*. 2017; 8(6):e2867.
10. Cavalcanti, E., Armentano, R., Valentini, A. M., Chieppa, M. & Caruso, M. L. Role of PD-L1 expression as a biomarker for GEP neuroendocrine neoplasm grading. *Cell Death and Disease*. 2017; 8(8):e3004.
11. Soukupova, J., Malfettone, A., Hyroššová, P., Hernández-Alvarez, M-I., Peñuelas-Haro, I., Bertran, E., Junza, A., Capellades, J., Giannelli, G., Yanes, O., Zorzano, A., Perales, J. C. & Fabregat, I. Role of the Transforming Growth Factor- β in regulating hepatocellular carcinoma oxidative metabolism. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):12486.
12. Lolli, I., Stasi, E., Fucilli, F., Pirrelli, M., Armentano, R., Campanella, G., Lotesoriere, C. & Lorusso, D. Sarcoidosis mimicking metastatic progression of pancreatic neuroendocrine tumor: A case report. *Medicine*. 2017; 96(26):e7273.
13. Scialla, S., Palazzo, B., Barca, A., Carbone, L., Fiore, A., Monteduro, A. G., Maruccio, G., Sannino, A. & Gervaso, F. Simplified preparation and characterization of magnetic hydroxyapatite-based nanocomposites. *Materials Science and Engineering C*. 2017; 76:1166-1174.
14. Buccolieri, A., Serra, A., Maruccio, G., Monteduro, A. G., Padmanabhan, S. K., Licciulli, A., Bonfrate, V., Salvatore, L., Manno, D., Calcagnile, L. & Giancane, G. Synthesis and Characterization of Mixed Iron-Manganese Oxide Nanoparticles and Their Application for Efficient Nickel Ion Removal from Aqueous Samples. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2017;:9476065.
15. Pinato, D. J., Sharma, R., Allara, E., Yen, C., Arizumi, T., Kubota, K., Bettinger, D., Jang, J. W., Smirne, C., Kim, Y. W., Kudo, M., Howell, J., Ramaswami, R., Burlone, M. E., Guerra, V., Thimme, R., Ishizuka, M., Stebbing, J., Pirisi, M. & Carr, B. I. The ALBI grade provides objective hepatic reserve estimation across each BCLC stage of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. 2017; 66(2):338-346.
16. Malfettone, A., Soukupova, J., Bertran, E., Crosas-Molist, E., Lastra, R., Fernando, J., Koudelkova, P., Rani, B., Fabra, Á., Serrano, T., Ramos, E., Mikulits, W., Giannelli, G. & Fabregat, I. Transforming growth factor- β -induced plasticity causes a migratory stemness phenotype in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*. 2017; 392:39-50.

LINEA 2

Malattie epatiche, delle vie biliari e pancreatiche non neoplastiche

17. Kalafateli, M., Wickham, F., Burniston, M., Cholongitas, E., Theocharidou, E., Garcovich, M., O'Beirne, J., Westbrook, R., Leandro, G., Burroughs, A. K. & Tsochatzis, E. Development and validation of a mathematical equation to estimate glomerular filtration rate in cirrhosis: The royal free hospital cirrhosis glomerular filtration rate. *Hepatology*. 2017; 65(2):582-591.
18. Cammà, C. & Leandro, G. Direct antiviral agents and risk of HCC: Waiting for Godot. *Journal of Hepatology*. 2017:1-2.

19. Ippolito, A. M. , Milella, M. , Messina, V. , Conti, F. , Cozzolongo, R. , Morisco, F. , Brancaccio, G. , Barone, M. , Santantonio, T. , Masetti, C. , Tundo, P. , Smedile, A. , Carretta, V. , Gatti, P. , Termite, A. P. , Valvano, M. R. , Bruno, G. , Fabrizio, C. , Andreone, P. , Zappimbulso, M. & 10 others Gaeta, G. B., Napoli, N., Fontanella, L., Lauletta, G., Cuccorese, G., Metrangolo, A., Francavilla, R., Ciraci, E., Rizzo, S. & Andriulli, A. HCV clearance after direct-acting antivirals in patients with cirrhosis by stages of liver impairment: The ITAL-C network study. *Digestive and Liver Disease*. 2017; 49(9):1022-1028.
20. Di Leo, M., Leandro, G., Singh, S. K., Mariani, A., Bianco, M., Zupparado, R. A., Goni, E., Rogger, T. M., Di Mario, F., Guslandi, M., De Cobelli, F., Del Maschio, A., Testoni, P. A. & Cavestro, G. M. Low Alcohol and Cigarette Use Is Associated to the Risk of Developing Chronic Pancreatitis. *Pancreas*. 2017; 46(2):225-229.
21. Di Maio, V. C. , Cento, V. , Lenci, I. , Aragri, M. , Rossi, P. , Barbaliscia, S. , Melis, M. , Verucchi, G. , Magni, C. F. , Teti, E. , Bertoli, A. , Antonucci, F. , Bellocchi, M. C. , Micheli, V. , Masetti, C. , Landonio, S. , Francioso, S. , Santopaolo, F. , Pellicelli, A. M. , Calvaruso, V. & 31 others Gianserra, L., Siciliano, M., Romagnoli, D., Cozzolongo, R., Grieco, A., Vecchiet, J., Morisco, F., Merli, M., Brancaccio, G., Di Biagio, A., Loggi, E., Mastroianni, C. M., Pace Palitti, V., Tarquini, P., Puoti, M., Taliani, G., Sarmati, L., Picciotto, A., Vullo, V., Caporaso, N., Paoloni, M., Pasquazzi, C., Rizzardini, G., Parruti, G., Craxì, A., Babudieri, S., Andreoni, M., Angelico, M., Perno, C. F., Ceccherini-Silberstein, F. & HCV Italian Resistance Network Study Group. Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies. *Liver International*. 2017; 37(4):514-528.
22. Onali, S., Kalafateli, M., Majumdar, A., Westbrook, R., O'Beirne, J., Leandro, G., Patch, D. & Tsochatzis, E. Non-selective beta-blockers are not associated with increased mortality in cirrhotic patients with ascites. *Liver International*. 2017; 37(9):1334-1344.
23. Guglielmi, V., Tutino, M., Guerra, V. & Giorgio, P. Rectal indomethacin or intravenous gabexate mesylate as prophylaxis for acute pancreatitis post-endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2017; 21(22):5268-5274.
24. Notarnicola, M., Caruso, M. G., Tutino, V., Bonfiglio, C., Cozzolongo, R., Giannuzzi, V., De Nunzio, V., De Leonardis, G., Abbrescia, D. I., Franco, I., Intini, V., Mirizzi, A. & Osella, A. R. Significant decrease of saturation index in erythrocytes membrane from subjects with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Lipids in Health and Disease*. 2017; 16(1):160-7.

LINEA 3

Malattie non neoplastiche dell'apparato digerente

25. Russo F., D'Attoma B., Riezzo G. Analysis and optimization of the ¹³C octanoic acid breath test. *Proceedings of the IEEE*. 2017; 6: 4528-4533.
26. Dionigi, E., Garcovich, M., Borzio, M., Leandro, G., Majumdar, A., Tsami, A., Arvaniti, V., Roccarina, D., Pinzani, M., Burroughs, A. K., O'Beirne, J. & Tsochatzis, E. A. Bacterial

- Infections Change Natural History of Cirrhosis Irrespective of Liver Disease Severity. *American Journal of Gastroenterology*. 2017; 112(4):588-596.
27. Panarese, A. Bowel preparation in diabetic patients undergoing colonoscopy. *Endoscopy*. 2017; 49(2):202.
 28. Orlando A., Linsalata M., D'Attoma B., Russo F. Changes in paracellular permeability induced by Pepsin-Trypsin digested Gliadin (PTG): role of polyamines in the *Lactobacillus rhamnosus* GG protective action. *Journal of Functional Foods*. 2017; 36:52-62.
 29. Bellini M., Usai-Satta P., Bove A., Bocchini R., Galeazzi F., Battaglia E., Alduini P., Buscarini E., CHROCODITE Study Group, AIGO, Leandro G. Chronic constipation diagnosis and treatment evaluation: the "CHRO.CO.DI.T.E." study. *BMC Gastroenterology*. 2017; 17(1):1-11.
 30. Mirizzi, N. & Riezzo, G. Consistency of cutaneous electrical activity of the human colon with respect to serosal slow waves: A simulation study. *Medical Engineering and Physics*. 2017; 43:58-63.
 31. Galleggiante, V., De Santis, S., Cavalcanti, E., Scarano, A., De Benedictis, M., Serino, G., Caruso, M. L., Mastronardi, M., Pinto, A., Campiglia, P., Kunde, D., Santino, A. & Chieppa, M. Dendritic Cells Modulate Iron Homeostasis and Inflammatory Abilities Following Quercetin Exposure. *Current Pharmaceutical Design*. 2017; 23(14):2139-2146.
 32. Russo, F., Chimienti, G., Clemente, C., Riezzo, G., D'Attoma, B. & Martulli, M. Gastric Activity and Gut Peptides in Patients With Functional Dyspepsia: Postprandial Distress Syndrome Versus Epigastric Pain Syndrome. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2017; 51(2):136-144.
 33. Clerico, A., Ripoli, A., Fortunato, A., Alfano, A., Carrozza, C., Correale, M., Dittadi, R., Gessoni, G., Migliardi, M., Rizzardi, S., Prontera, C., Masotti, S., Zucchelli, G., Guiotto, C., Iacovazzi, P. A., Giorgio, I. & Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS). Harmonization protocols for TSH immunoassays: a multicenter study in Italy. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2017
 34. Jeffery, V., Goldson, A. J., Dainty, J. R., Chieppa, M. & Sobolewski, A. IL-6 Signaling Regulates Small Intestinal Crypt Homeostasis. *Journal of Immunology*. 2017; 199(1):304-311.
 35. Chieppa, M., Galleggiante, V., Serino, G., Massaro, M. & Santino, A. Iron Chelators Dictate Immune Cells Inflammatory Ability: Potential Adjuvant Therapy for IBD. *Current Pharmaceutical Design*. 2017; 23(16):2289-2298.
 36. Di Leo, M., Bianco, M., Zuppardo, R. A., Guslandi, M., Calabrese, F., Mannucci, A., Neri, T. M., Testoni, P. A., Leandro, G. & Cavestro, G.M. Meta-analysis of the impact of SPINK1 p.N34S gene variation in Caucasian patients with chronic pancreatitis. An update. *Digestive and Liver Disease*. 2017; 49(8):847-853.
 37. Dittadi, R., Rizzardi, S., Masotti, S., Prontera, C., Ripoli, A., Fortunato, A., Alfano, A., Carrozza, C., Correale, M., Gessoni, G., Migliardi, M., Zucchelli, G., Clerico, A. & Italian Section of the European Ligand Assay Society (ELAS). Multicenter evaluation of the new immunoassay method for TSH measurement using the automated DxI platform. *Clinica Chimica Acta*. 2017; 468:105-110.
 38. De Santis, S., Galleggiante, V., Scandiffio, L., Liso, M., Sommella, E., Sobolewski, A., Spilotro, V., Pinto, A., Campiglia, P., Serino, G., Santino, A., Notarnicola, M. & Chieppa, M. Secretory Leukoprotease Inhibitor (Slpi) Expression Is Required for Educating Murine

- Dendritic Cells Inflammatory Response Following Quercetin Exposure. *Nutrients*. 2017; 9(7):1-11.
39. Barone, M., Viggiani, M. T., Losurdo, G., Principi, M., Leandro, G. & Di Leo, A. Systematic review with meta-analysis: post-operative complications and mortality risk in liver transplant candidates with obesity. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2017; 46(3):236-245.
 40. Ranaldo, N., Losurdo, G., Iannone, A., Principi, M., Barone, M., De Carne, M., Ierardi, E. & Di Leo, A. Tailored therapy guided by multichannel intraluminal impedance pH monitoring for refractory non-erosive reflux disease. *Cell Death and Disease*. 2017; 8(9):e3040.
 41. Porcelli, P., De Carne, M. & Leandro, G. The role of alexithymia and gastrointestinal-specific anxiety as predictors of treatment outcome in irritable bowel syndrome. *Comprehensive Psychiatry*. 2017; 73:127-135.
 42. De Santis, S., Kunde, D., Galleggiante, V., Liso, M., Scandiffio, L., Serino, G., Pinto, A., Campiglia, P., Sorrentino, R., Cavalcanti, E., Santino, A., Caruso, M. L., Eri, R. & Chieppa, M. TNF α deficiency results in increased IL-1 β in an early onset of spontaneous murine colitis. *Cell Death and Disease*. 2017; 8(8):e2993.
 43. Caruso, M. L., Cavalcanti, E., Penna, A. & Armentano, R. Useful Trick for Discovering Granuloma in Gastric Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2017; 23(9):E42-E43.

LINEA 4

Nutrizione

44. Russo, F., Chimienti, G., Clemente, C., Ferreri, C., Orlando, A. & Riezzo, G. A possible role for ghrelin, leptin, brain-derived neurotrophic factor and docosahexaenoic acid in reducing the quality of life of coeliac disease patients following a gluten-free diet. *European Journal of Nutrition*. 2017; 56(2):807-818.
45. Solfrizzi, V., Scafato, E., Lozupone, M., Seripa, D., Giannini, M., Sardone, R., Bonfiglio, C., Abbrescia, D. I., Galluzzo, L., Gandin, C., Baldereschi, M., Di Carlo, A., Inzitari, D., Daniele, A., Sabbà, C., Logroscino, G., Panza, F. & Italian Longitudinal Study on Aging. Additive Role of a Potentially Reversible Cognitive Frailty Model and Inflammatory State on the Risk of Disability: The Italian Longitudinal Study on Working Group Aging. *American Journal of Geriatric Psychiatry*. 2017.
46. Veronese, N., Stubbs, B., Noale, M., Solmi, M., Rizzoli, R., Vaona, A., Demurtas, J., Crepaldi, G. & Maggi, S. Adherence to a Mediterranean diet is associated with lower incidence of frailty: A longitudinal cohort study. *Clinical Nutrition*. 2017:1-6.
47. Pepe, G., Pagano, F., Adesso, S., Sommella, E., Ostacolo, C., Manfra, M., Chieppa, M., Sala, M., Russo, M., Marzocco, S. & Campiglia, P. Bioavailable Citrus sinensis Extract: polyphenolic composition and biological activity: Polyphenolic Composition and Biological Activity. *Molecules*. 2017; 22(4):1-15.
48. Sommella, E., Pagano, F., Salviati, E., Chieppa, M., Bertamino, A., Manfra, M., Sala, M., Novellino, E. & Campiglia, P. Chemical profiling of bioactive constituents in hop cones and pellets extracts by online comprehensive two-dimensional liquid chromatography with tandem mass spectrometry and direct infusion Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2017.

49. Riezzo, G., Chimienti, G., Clemente, C., D'Attoma, B., Orlando, A., Mammone Rinaldi, C. & Russo, F. Colonic Transit Time and Gut Peptides in Adult Patients with Slow and Normal Colonic Transit Constipation. *BioMed Research International*. 2017;3178263.
50. Abate, M., Laezza, C., Pisanti, S., Torelli, G., Seneca, V., Catapano, G., Montella, F., Ranieri, R., Notarnicola, M., Gazzo, P., Bifulco, M. & Ciaglia, E. Deregulated expression and activity of Farnesyl Diphosphate Synthase (FDPS) in Glioblastoma. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):14123.
51. Veronese, N., Stubbs, B., Maggi, S., Notarnicola, M., Barbagallo, M., Firth, J., Dominguez, L. J. & Caruso, M. G. Dietary Magnesium and Incident Frailty in Older People at Risk for Knee Osteoarthritis: An Eight-Year Longitudinal Study. *Nutrients*. 2017; 9(11):1-5.
52. Notarnicola, M., Tutino, V., De Nunzio, V., Dituri, F., Caruso, M. G. & Giannelli, G. Dietary ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids Inhibit Tumor Growth in Transgenic Apc(Min/+) Mice, Correlating with CB1 Receptor Up-Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18(3):1-9.
53. Indrio, F., Riezzo, G., Giordano, P., Ficarella, M., Miolla, M. P., Martini, S., Corvaglia, L. & Francavilla, R. Effect of a Partially Hydrolysed Whey Infant Formula Supplemented with Starch and *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 on Regurgitation and Gastric Motility. *Nutrients*. 2017; 9(11):1-9.
54. Sommella, E., Pagano, F., Pepe, G., Ostacolo, C., Manfra, M., Chieppa, M., Di Sanzo, R., Carabetta, S., Campiglia, P. & Russo, M. Flavonoid Composition of Tarocco (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Clone "Lempso" and Fast Antioxidant Activity Screening by DPPH-UHPLC-PDA-IT-TOF. *Phytochemical Analysis*. 2017:1-8.
55. Lozupone, M., Seripa, D., Stella, E., La Montagna, M., Solfrizzi, V., Quaranta, N., Veneziani, F., Cester, A., Sardone, R., Bonfiglio, C., Giannelli, G., Bisceglia, P., Bringiotti, R., Daniele, A., Greco, A., Bellomo, A., Logroscino, G. & Panza, F. Innovative biomarkers in psychiatric disorders: a major clinical challenge in psychiatry. *Expert Review of Proteomics*. 2017:809-824.
56. Tortelli, R., Lozupone, M., Guerra, V., Barulli, M. R., Imbimbo, B. P., Capozzo, R., Grasso, A., Tursi, M., Di Dio, C., Sardone, R., Giannelli, G., Seripa, D., Misciagna, G., Panza, F. & Logroscino, G. Midlife Metabolic Profile and the Risk of Late-Life Cognitive Decline. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 59(1):121-130.
57. Elli, L., Villalta, D., Roncoroni, L., Barisani, D., Ferrero, S., Pellegrini, N., Bardella, M. T., Valiante, F., Tomba, C., Carroccio, A., Bellini, M., Soncini, M., Cannizzaro, R. & Leandro, G. Nomenclature and diagnosis of gluten-related disorders: A position statement by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO). *Digestive and Liver Disease*. 2017; 49(2):138-146.
58. Stasi, E. Non-responsive celiac disease. Nova Publishers Howard Rivera Editor. New York, 2017:153-191 Chapter Relationships of Dietary Patterns, Foods, and Micro- and Macronutrients.
59. Indrio, F., Riezzo, G., Tafuri, S., Ficarella, M., Carlucci, B., Bisceglia, M., Polimeno, L. & Francavilla, R. Probiotic Supplementation in Preterm: Feeding Intolerance and Hospital cost. *Nutrients*. 2017; 9(9):1-8.
60. Veronese, N., Stubbs, B., Koyanagi, A., Hébert, J. R., Cooper, C., Caruso, M. G., Guglielmi, G., Reginster, J. Y., Rizzoli, R., Maggi, S. & Shivappa, N. Pro-inflammatory dietary pattern

- is associated with fractures in women: an eight-year longitudinal cohort study. *Osteoporosis International*. 2017;1-9.
61. Solfrizzi, V., Custodero, C., Lozupone, M., Imbimbo, B. P., Valiani, V., Agosti, P., Schilardi, A., D'Introno, A., La Montagna, M., Calvani, M., Guerra, V., Sardone, R., Abbrescia, D. I., Bellomo, A., Greco, A., Daniele, A., Seripa, D., Logroscino, G., Sabbá, C. & Panza, F. Relationships of Dietary Patterns, Foods, and Micro- and Macronutrients with Alzheimer's Disease and Late-Life Cognitive Disorders A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017; 59(3):815-849.
62. Russo, F., Chimienti, G., Linsalata, M., Clemente, C., Orlando, A. & Riezzo, G. The obestatin/ghrelin ratio and ghrelin genetics in adult celiac patients before and after a gluten-free diet, in irritable bowel syndrome patients and healthy individuals. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2017; 29(2):160-168.
63. Shivappa, N., Stubbs, B., Hébert, J. R., Cesari, M., Schofield, P., Soysal, P., Maggi, S. & Veronese, N. The Relationship Between the Dietary Inflammatory Index and Incident Frailty: A Longitudinal Cohort Study. *Journal of the American Medical Directors Association*. 2017; 19(1):77-82.
64. Veronese, N., Shivappa, N., Stubbs, B., Smith, T., Hébert, J. R., Cooper, C., Guglielmi, G., Reginster, J-Y., Rizzoli, R. & Maggi, S. The relationship between the dietary inflammatory index and prevalence of radiographic symptomatic osteoarthritis: data from the Osteoarthritis Initiative. *European Journal of Nutrition*. 2017:1-8.
65. Tutino, V., Caruso, M. G., De Leonardis, G., De Nunzio, V. & Notarnicola, M. Tissue Fatty Acid Profile is Differently Modulated from Olive Oil and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in ApcMin/+ Mice. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*. 2017; 17(4):303-308.

Il Direttore Scientifico
(Prof. Gianluigi Giannelli)

N.B. Questo numero di pubblicazione coincide con il numero della pubblicazione riportata in elenco pubblicazioni scaricabile dal workflow della ricerca.