



**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-Rägister
EN ISO 9001:2008
IQ-1208-14

Direzione Scientifica



**RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI
RICERCA CORRENTE
DELL'ANNO 2018**

Direzione Scientifica

LINEA 1

MEDICINA DI PRECISIONE IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 1 - “*Medicina di precisione in Gastroenterologia*”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2018 sono i seguenti:

Progetto n. 1: “Biopsia liquida: dosaggio del ctDNA (DNA tumorale circolante) stato mutazionale in pazienti affetti da GIST”

Responsabile: Dott. Ivan Lolli e Dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Marina Liso Marina e Vittoria Disciglio

Background:

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]. Studi recenti hanno dimostrato che alterazioni somatiche dei geni *KIT* e *PDGFRA* identificate nel tessuto tumorale possono essere identificate nel ctDNA dei pazienti affetti da GIST^[11-14]. 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.

Stato di avanzamento del progetto (seconda annualità):

Nel nostro istituto, istituto gastroenterologico nazionale, presso la U.O.S.D. 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 undici 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. Tutti i 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 o prima dell'intervento chirurgico. 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				Terapia	Tumore Secondario			
		Loc.	Dim. (cm)	Conta mitotica	Mutazione		Loc.	Dim. (cm)	Conta mitotica	Mutazione
1	39/F	Retto	6,5x6	>5/50 HPF	<i>KIT</i> esone 11 del Q556-K558	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	Imatinib (400 mg al giorno)	-	-	-	-
3	68/F	Stomaco	ND	ND	<i>KIT</i> esone 11 Del W557-K558	Imatinib (200 mg al giorno) Sunitinib	Fegato	12	-	-
4	74/F	Addomino-pelvica	10x8x3,5	ND	<i>Wild-Type</i>	Nessuna	-	-	-	-
5	61/M	GIST extra intestinale	20x18x13	2/50 HPF	<i>KIT</i> esone 11 Del K558-572	Nessuna	-	-	-	-
6	62/M	Stomaco/Colon	10x7x7.8	8/50 HPF	<i>PDGFRA</i> (p.E556_R560; p.Q639R)	Nessuna	-	-	-	-
7	53/M	Duodeno/Digiuno	0,63x0,75	ND	<i>KIT</i> esone 11 (p.G559D)	Nessuna	-	-	-	-
8	52/M	Stomaco	8	>5/50 HPF	<i>KIT</i> esone 11 del550_558	Imatinib Sunitinib	-	-	-	-
9	54/M	Stomaco	3	3/50HPF	Analisi in corso	Nessuna	-	-	-	-
10	53/F	Stomaco	2	<5/50HPF	Analisi in corso	Nessuna	-	-	-	-
11	49/M	Stomaco	15x10x7.5		<i>Kit</i> esone 11 Del Q556-V559	Imatinib Sutent	Fegato	-	-	-

Descrizione Casi Clinici:

Caso 1:

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 tollerato. 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 proctectomia 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.

Caso 2:

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.

Caso 3

Si descrive il caso di una donna che all'età di 68 anni ha subito intervento di gastrectomia totale per GIST (Novembre 2000). L'analisi molecolare dei geni *KIT* e *PGFRA*, eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, identifica la presenza di una delezione di 6 paia di basi nell'esone 11 del gene *KIT* coinvolgente gli amminoacidi W557 e K558 della proteina KIT.

Dopo tredici anni dalla diagnosi (Giugno 2013) la paziente ha sviluppato lesioni ripetitive a livello epatico con una grossa lesione del lobo destro di 12cm. L'esame istologico eseguito su biopsia epatica ha permesso di confermare la diagnosi di GIST. La paziente inizia il trattamento con Imatinib al dosaggio di 400mg e a causa di una ritenzione idrica importante il dosaggio farmacologico viene ridotto a 200mg (Ottobre 2013). La paziente prosegue la terapia per due anni. Dopo tre anni (Febbraio 2016) la paziente, a causa di una progressione di malattia a livello epatico, inizia trattamento farmacologico di seconda linea con Sunitinib. Prima dell'inizio del trattamento con Sunitinib, la paziente è stata sottoposta ad un prelievo di sangue venoso per estrazione del ctDNA. Dopo un anno (gennaio 2017) la paziente viene sottoposta a radioterapia a causa di lesioni metastatiche dell'encefalo. La paziente decede dopo qualche mese (maggio 2017) per progressione di malattia.

Caso 4

Si descrive il caso di una donna che all'età di 74 anni è stata sottoposta ad intervento chirurgico per esportazione di una neoformazione addomino-pelvica dalle dimensioni di di 10x8x3,5cm che aderiva alle strutture vicine. L'esame istologico della neoformazione ha permesso la diagnosi di GIST a rischio intermedio (indice proliferativo ki67 pari al 5%). Durante l'intervento chirurgico si è verificata rottura capsulare, motivo per cui tale tumore è stato considerato ad alto rischio. Sino ad oggi la paziente non è stata sottoposta ad alcuna terapia. L'analisi mutazionale di 56 geni più frequentemente alterati nei tumori solidi (*ALK, RBI, SMARCB1, FLT3, MPL, PTEN, STK11, CDH1, KDR, AKT1, JAK2, HRAS, JAK3, PDGFRA, MAP2K1, FBXW7, DNMT3A, FOXL2, TSC1, HNF1A, MSH6, PIK3CA, SMO, KIT, MET, TP53, DDR2, CSF1R, NOTCH1, SRC, EGFR, NRAS, ERBB4, GNA11, ERBB2, ABL1, VHL, SMAD4, NPM1, CDKN2A, IDH1, IDH2, BRAF, PTPN11, MLH1, APC, GNAQ, GNAS, CTNBN1, ATM, KRAS, FGFR3, FGFR2, EZH2, FGFR1*) eseguita su DNA genomico estratto da tessuto tumorale, mediante la tecnologia di sequenziamento di nuova generazione, non ha permesso di identificare mutazioni patogenetiche.

Caso 5

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 61 anni è stato sottoposto ad exeresi chirurgica di una neoformazione localizzata nell'addome superiore che dimensionava 20x18x13cm. L'esame istologico ha permesso di effettuare la diagnosi di GIST extraintestinale ad alto rischio (indice mitotico di 2/50 HPF). L'analisi molecolare dei geni *KIT* e *PDGFRA* ha permesso di identificare la mutazione coinvolgente l'esone 11 del gene c-kit (del558-572). Sino ad oggi il paziente non è stato sottoposto ad alcuna terapia farmacologica, in quanto alla diagnosi le condizioni generali erano talmente compromesse da non consentire il trattamento farmacologico della malattia.

Caso 6

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 62 anni viene sottoposto ad intervento chirurgico per esportazione di una voluminosa formazione (10x7x7,8cm) in blocco con la parete posteriore dello stomaco, il colon trasverso distale ed il terzo prossimale del colon discendente. L'esame istologico definisce neoplasia mesenchimale a cellule fusate monomorfe nella tonaca muscolare propria dell'antro gastrico con conta mitotica pari a 8 su 50 HPF, con indice proliferativo (ki-67) pari al 15%, con i caratteri immunomorfologici (CD117+--focale, DOG1+++ , CD34 neg) del GIST con alto rischio di recidiva. L'analisi molecolare dei geni *KIT* e *PDGFRA* ha permesso di identificare la mutazione patogenetica coinvolgente il gene *PDGFRA* (esone 12, p.E556_R560 ed esone 14, p.Q639R).

Caso 7

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 53 anni si ricovera al pronto soccorso per importante anemia tale da dover ricorrere ad emotrasfusioni. Il paziente viene quindi sottoposto a colonscopia che determina presenza di soffusioni emorragiche a livello dell'ascendente prossimale, cieco e valvola ileo-cecale. L'esame di tomografia computerizzata identifica al di sotto del pancreas, una formazione espansiva ovoidale (63x75 mm) circa che si estrinseca antero-medialmente all'ultimo tratto del Treitz dal quale non presenta piani di clivaggio. Il paziente viene quindi sottoposto ad intervento chirurgico per resezione duodeno-digiunale con asportazione della massa. L'esame istologico della neoformazione asportata chirurgicamente permette di diagnosticare GIST del digiuno (conta mitotica di 5 mitosi, CD117 e DOG1 positivi, CD34 debolmente positivo). L'analisi mutazionale dei geni *c-kit* e *PDGFRA* permette di identificare la variante p.G559D del gene *c-kit*.

Caso 8

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 52 anni è stato sottoposto ad intervento chirurgico di gastrectomia totale per un tumore GIST ad alto rischio (lesione di 8 cm con un indice mitotico > 5/50 HPF) con metastasi epatiche. Inizia terapia con Glivec che ha interrotto circa un anno fa per progressione di malattia. Il paziente iniziava terapia con Sunitinib al dosaggio di 37.5mg. L'analisi mutazionale dei geni *KIT* e *PDGFRA* ha evidenziato la presenza della mutazione coinvolgente l'esone 11 del gene *kit* (del550_558).

Caso 9

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 54 anni è stato sottoposto ad intervento chirurgico per escissione di GIST gastrico (neoformazione di circa 3 cm di diametro della piccola curva del fondo gastrico). L'esame istologico permette di eseguire diagnosi di GIST della parete del fondo gastrico di tipo fusocellulare (Assenza di necrosi. Mitosi 3 per 50 HPF. Margini liberi da neoplasia. Immunofenotipo: positivo CD117-DOG1-CD34. Negativo: AML. Rischio di recidiva basso). Dopo 7 mesi a seguito di comparsa di melena ed evidenza di TAC lesione digiunale, veniva sottoposto in laparoscopia a resezione digiunale. L'esame istologico di tale resezione rileva GIST del digiuno a cellule fusate, positività immunoistochimica per CD117, DOG1, CD 34 e focale per actina e muscolo liscio. Indice mitotico 3/50 HPF. Rischio di recidiva basso (4,3%). Margini chirurgici esenti da neoplasia. Sono attualmente in corso le analisi molecolari dei geni *PDGFRA* e *KIT*.

Caso 10

Si descrive il caso di una donna che all'età di 53 anni in seguito ad epigastralgie eseguiva EGDS con riscontro di mucosa gastrica lievemente atrofica con minute rilevatezze polipoidi di tipo iperplastiche e in sede antrale lesioni erosivo-ulcerative a raggiera sulle quali venivano eseguite biopsie; in sede sottocardiale formazione sottomucosa di 1,5 cm. L'esame TAC evidenziava neoformazione ovoidale sottomucosa del diametro di 19 mm, a sviluppo endofitico con minuta calcificazione intralesionale. Formazioni cistiche al lobo sinistro epatico (diametro massimo 18 mm). Piccolo adenoma surrenalico sinistro di 5 mm ad alto contenuto adiposo. Dopo 8 mesi esegue eco endoscopia che evidenzia a livello dello strato muscolare formazione tondeggiante, ipoecogena, omogenea, ivi completamente contenuta, del diametro di 18 x 18 mm ed a margini netti. Dopo due mesi l'esame TC-torace-addome-pelvi con mdc rileva in corrispondenza di III prossimale dello stomaco, sulla piccola curva, formazione sottomucosa del diametro massimo di 2 cm, che appare verosimilmente riferibile a GIST. Dopo due mesi la paziente viene sottoposta ad intervento di escissione della neoformazione gastrica. L'esame istologico permette di effettuare le diagnosi di GIST della parete fundica dello stomaco, del tipo a cellule fusate (mitosi <5 per 50 HPF. Nessun rischio di recidiva. Margini di resezione chirurgica esenti da neoplasia). Sono attualmente in corso le analisi molecolari dei geni *PDGFRA* e *KIT*.

Caso 11

Si descrive il caso di un uomo che all'età di 49 anni si sottopone a colonscopia con resezione endoscopica di polipo del colon. Dopo sei mesi il paziente viene sottoposto a gastroscopia che evidenzia una vasta area ulcerata a livello del fondo. L'esame istologico eseguito su biopsia tissutale rivela un quadro istologico ed immunofenotipico coerente con il sospetto clinico di GIST gastrico ed elementi fusati. L'esame TAC evidenzia in corrispondenza del cardias e fondo gastrico una voluminosa formazione solida disomogenea, parzialmente aggettante nel lume ove mostra ampia ulcerazione centrale, ma a maggior estrinsecazione esofitica sottodiaframmatica posteriore, delle dimensioni di 15x10x7,5 cm. L'analisi mutazionale dei geni *KIT* e *PDGFRA*, eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, rileva la presenza della mutazione del gene *KIT* (esone 11, p.Q556_V559del). L'esame PET evidenzia multiple aree di accumulo patologico del radiofarmaco in ambito epatico e in ambito scheletrico, le più evidenti in alcuni somi del tratto dorso-lombare del rachide e nel bacino. Dopo esecuzione di PET/CT il paziente inizia terapia con Imatinib che prosegue per un anno e quattro mesi. L'esame TAC eseguito dopo un anno evidenzia riduzione delle dimensioni della lesione neoplastica di GIST gastrico (10x6x4,5 cm). Il successivo esame TAC eseguito nel paziente in follow-up dopo 1 mese evidenzia in sede gastrica alla periferia della nota neoplasia, si segnala la comparsa di due lesioni solide strettamente contigue del diametro complessivo (6,7x3,5x4 cm) reperti riferibili a recidiva locale della malattia di base. Il paziente intraprende terapia con Sutent al dosaggio di 37,5 mg.

Analisi del DNA tumorale circolante:

Le varianti identificate nei geni *KIT* e *PDGFRA* nel DNA genomico estratto dai tessuti tumorali dei pazienti affetti da GIST, verranno analizzate nel ctDNA mediante lo strumento QX200 Droplet Reader (Biorad), recentemente acquisito dall'Istituto IRCCS S. de Bellis, utilizzando primers e sonde specifiche che ricadono nelle regioni dei geni *KIT* e *PDGFR* identificate alterate nei tessuti tumorali^[14].

Stato di avanzamento del progetto (terza annualità):

Nell'ambito dei tumori eredo-familiari si riporta che, sono giunti all'osservazione dell'Unità Operativa di Oncologia e dell'Unità Operativa di Genetica Medica due casi familiari in cui è stato riscontrato lo sviluppo di GIST insorto in seguito a trasmissione ereditaria di mutazioni patogenetiche del gene *NF1*.

Nello specifico, si riporta il caso di un paziente che alla valutazione obiettiva mostrava i segni clinici della neurofibromatosi di tipo 1 (NF1) tra cui numerosi neurofibromi, diffuse macchie café-au-lait, lentiginosi ascellare e noduli di Lisch. Il paziente è stato operato per resezioni di GIST multipli digiunali all'età di 69 anni e di emicolectomia destra per adenocarcinoma all'età di 72 anni. Il paziente ha inoltre subito un intervento per resezione di una lesione polipoide duodenale e ha sviluppato meningioma calcifico destro di 2,11 cm senza segni di compressione all'età di 75 anni. L'analisi mutazionale dei geni *KIT*, *PDGFRA* e *BRAF* eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, non ha rilevato la presenza di mutazioni causative dello sviluppo della patologia GIST. L'analisi molecolare eseguita su DNA estratto da sangue e finalizzata alla diagnosi molecolare di NF1 ha rilevato la presenza di una mutazione missenso con significato patogenetico (NM_000267.3: c.4267 A>G; NP_000258:p.Lys1423Glu).

Si riporta un secondo caso di una paziente che all'esame obiettivo presentava numerose macchie café-au-lait di dimensioni disomogenee e variamente distribuite associate a neurofibromi cutanei multipli. La paziente ha inoltre sviluppato carcinoma in situ della mammella (43 e 48 anni), neurinoma toraco-pleurico (48 anni), GIST (55 anni) e noduli tiroidei. Dalla raccolta dei dati anamnestici, eseguita durante una consulenza genetica all' UO di Genetica Medica, è inoltre emerso che il fratello della paziente mostrava segni clinici della Neurofibromatosi di tipo I (macchie café-au-lait di dimensioni disomogenee e variamente distribuite associate a neurofibromi cutanei multipli), il cui figlio ha manifestato neurofibromi e neurinomi ed è deceduto all'età di 31 anni. Dalla raccolta della storia familiare è inoltre emerso che un altro suo fratello (65 anni) ha mostrato i segni clinici della NF1 (neurofibromi cutanei e neurinomi), che sono stati inoltre riscontrati in sua figlia deceduta all'età di 10 anni. Sulla base di tali valutazioni la paziente è stata sottoposta a prelievo ematico finalizzato alla diagnosi molecolare di NF1. L'analisi molecolare eseguita ha permesso di identificare la mutazione c.2033dupC (p.Ile679Aspfs*21) nel gene NF1. L'analisi molecolare di tale variante patogenetica coinvolgente il gene *NF1* è stata confermata in uno dei fratelli della paziente. L'analisi mutazionale dei geni *KIT*, *PDGFRA* e *BRAF* eseguita su biopsia tissutale mediante sequenziamento diretto, non ha rilevato la presenza di mutazioni causative dello sviluppo della patologia GIST.

Il gene *NF1* è localizzato sul cromosoma 17 ricopre una regione di 350 kb, è costituito da 60 esoni che codificano per una proteina di 2818 aminoacidi, la neurofibromina, che regola negativamente i livelli cellulari delle proteine RAS attive attraverso la sua attività GTPasica. Il dominio centrale di questa proteina, composto da circa 413 aminoacidi è codificato dalla regione genica compresa tra gli esoni 20 e 27a, e costituisce il maggiore dominio funzionale della proteina NF1 ed è stato nominato GRD (GAP-related domain)^[15]. La regolazione negativa delle proteine RAS mediata dal dominio GRD rappresenta uno step cruciale nella regolazione del pathway Ras-MAPK e tale via risulta deregolata in una significativa percentuale di tumori. Mutazioni nel gene NF1, possono determinare una produzione della neurofibromina non funzionale causando un'attivazione della via RAS/RAF/MAPK con conseguente proliferazione e crescita cellulare non controllata. I tumori GIST, in cui non si identificano le mutazioni dei geni *KIT* e *PDGFRA*, sono definiti Wild Type GIST (WT GIST) e mostrano un profilo mutazionale differente dai tumori GIST positivi per le mutazioni dei geni *KIT* e *PDGFRA*^[16].

La NF1 (MIM#162200, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>), chiamata anche Malattia di Von Recklinghausen o Neurofibromatosi periferica o multipla, è la più comune tra le forme di neurofibromatosi. Si tratta di una sindrome autosomica dominante con una prevalenza stimata di

1/3000 nati vivi. L'espressione fenotipica è estremamente variabile anche all'interno dello stesso nucleo familiare.

I pazienti affetti da Neurofibromatosi di tipo 1, presentano una maggiore suscettibilità allo sviluppo di tumori rispetto alla popolazione generale. È stato riportato che il 7% dei pazienti affetti da NF1 possono sviluppare GISTs. Sino ad oggi, circa il 60% di GISTs negativi per le mutazioni dei geni *KIT*, *PDGFRA*, *RAS*, *SDH* hanno mutazioni nel gene NF1^[16]. I GIST associati a mutazioni del gene NF1, hanno basso rischio di ricorrenza, sono tumori a basso grado di malignità e si localizzano più frequentemente nell'ileo, nel duodeno e nello stomaco. Sino ad oggi, in letteratura sono stati descritti pochissimi casi di pazienti affetti da NF1 che hanno sviluppato GIST. La caratterizzazione molecolare dei GIST di questi casi ha mostrato che tali tumori non mostrano alterazioni genetiche nei geni *KIT* e *PDGFRA*. Tuttavia di questi casi, non è stata riportata la caratterizzazione molecolare del gene NF1 sia a livello germinale che a livello somatico^[17-21].

Nel nostro Istituto abbiamo caratterizzato molecolarmente due casi familiari affetti da NF1 che hanno sviluppato GIST. Considerato che le manifestazioni cliniche e le possibili complicanze della NF1 possono manifestarsi in momenti diversi della vita di un individuo è necessario impostare follow-up e sorveglianza clinico strumentale mirata e personalizzata in base all'età del paziente, alla gravità e alla peculiarità dei sintomi.

Obiettivi specifici dello studio:

Il presente studio si pone l'obiettivo di verificare, nei pazienti afferenti la U.O.S.D. di Oncologia affetti da GIST, l'applicabilità clinico-diagnostica della biopsia liquida. Questo studio si pone l'obiettivo di caratterizzare le alterazioni somatiche nel DNA tumorale circolante (ctDNA) dei geni *KIT* e *PDGFRA* noti per essere associati alla patogenesi del GIST nel 50% dei casi. 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^[22] e tali dati verranno correlati alle caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti.

Obiettivo specifico 1:

Stimare l'efficienza della biopsia liquida (analisi del ctDNA) nel confronto della biopsia tissutale (analisi del DNA tumorale tissutale), determinare la sensibilità clinica e la specificità clinica della biopsia liquida nei pazienti GIST e definire la percentuale di concordanza fra i due test.

Obiettivo specifico 2:

Correlare i dati di sensibilità clinica e specificità clinica nella biopsia liquida con le caratteristiche clinico – patologiche dei pazienti: malattia localizzata, malattia metastatica, sede anatomica del tumore, carico tumorale, indice mitotico, infiltrazione vascolare.

Obiettivo 1:

Al fine di stimare l'efficienza della biopsia liquida (analisi del ctDNA) nel confronto della biopsia tissutale (analisi del DNA tumorale tissutale), il DNA del tessuto tumorale ottenuto mediante atto chirurgico o biopsia, verrà utilizzato per l'analisi mutazionale dei geni *KIT* e *PDGFRA* in modo tale da verificare la concordanza dello stato mutazionale degli stessi con il ctDNA. Aliquote di pool di plasma raccolto da soggetti sani e commercializzato dalla ditta BIORECLAMATION IVT (New York, USA) verranno utilizzate per estrarre DNA libero circolante. Quest'ultimo verrà utilizzato come standard di riferimento al fine di valutare la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA. La sensibilità clinica sarà calcolata rapportando il numero di campioni di DNA risultati positivi all'analisi mutazionale dei geni *KIT* e *PDGFRA*, sia nel plasma che nel

tessuto, al numero totale di campioni di tessuto tumorale risultati positivi all'analisi mutazionale degli stessi geni. La specificità clinica sarà calcolata rapportando il numero di campioni di DNA risultati negativi all'analisi mutazionale dei geni *KIT* e *PDGFRA*, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, al numero totale di campioni di tessuto tumorale risultati negativi all'analisi mutazionale degli stessi geni. La percentuale di concordanza sarà calcolata rapportando la somma del numero di campioni di DNA positivi all'analisi mutazionale, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, e del numero di campioni di DNA negativi all'analisi mutazionale, sia nel plasma che nel tessuto tumorale, al numero totale di pazienti di cui si analizzeranno il campione di plasma e il campione di tessuto tumorale^[22].

Obiettivo 2:

I dati di sensibilità clinica e specificità clinica verranno correlati con le caratteristiche clinico – patologiche dei pazienti: malattia localizzata, malattia metastatica, sede anatomica del tumore, carico tumorale, indice mitotico, infiltrazione vascolare.

Dati preliminari:

Il numero di pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di GIST nel nostro istituto, che rappresenta l'istituto gastroenterologico nazionale, dal 1988 ad oggi è pari a 87. Nell'ultimo triennio (dal 01-01-2014 al 31-12-2016) sono stati diagnosticati 29 casi e dal 01-01-2017 sino ad oggi sono stati diagnosticati 11 casi. Prevediamo che in 36 mesi del progetto potremo arruolare 30 nuovi casi.

Metodologie e analisi statistiche:

I GIST sono considerati tumori rari. Il progetto RARECARE (Surveillance of Rare Cancers in Europe) definisce raro un tumore che mostra un'incidenza inferiore o uguale a 6/100.000/anno.

Il GIST ha un tasso di densità di incidenza pari a 1 – 1,5 per 100.000 abitanti l'anno nella popolazione italiana. Possiamo pertanto stimare per la regione Puglia, in cui risiedono 4.063.088 abitanti, 48 nuovi casi attesi per anno. Tale stima è stata calcolata considerando un tasso di densità di incidenza pari a 1,18 per 100.000 abitanti per anno e assumendo che la densità di incidenza del tumore è omogenea in tutto il territorio nazionale.

Il numero di pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di GIST nel nostro istituto, che rappresenta l'istituto gastroenterologico nazionale, dal 1988 ad oggi è pari a 87. Nell'ultimo triennio (dal 01-01-2014 al 31-12-2016) sono stati diagnosticati 29 casi e dal 01-01-2017 sino ad oggi sono stati diagnosticati 11 casi. Prevediamo pertanto che in 36 mesi del progetto potremo arruolare 30 nuovi casi. Saranno sottoposti a un prelievo ematico (in provetta con EDTA).

In biobanca saranno conservate, seguendo le SOP specifiche, aliquote di plasma e ctDNA.

La nostra esperienza acquisita negli anni passati ci dice che di 29 casi GIST dell'ultimo triennio, 23 volte è stato possibile ottenere tessuti derivanti dall'asportazione chirurgica. Pertanto, consideriamo che dei nuovi casi che saranno reclutati (numero stimato pari a 30) avremo circa 24 casi di cui potremo analizzare il tessuto tumorale. Per i restanti casi di cui non potremo avere il tessuto tumorale, analizzeremo le mutazioni hot-spot dei geni *KIT* e *PDGFRA* (mutati nell'85% dei casi GIST) nel ctDNA dei pazienti.

La normale pratica clinica prevede che la diagnosi di GIST avviene per via radiologica. La diagnosi con TAC o RM pur essendo suggestiva di GIST pone frequentemente la necessità di diagnosi differenziale con altre neoplasie. In questi casi la necessità di una caratterizzazione istologica della massa si impone nell'ottica

di giungere ad una corretta diagnosi e di conseguenza ad una corretta definizione della strategia terapeutica. Il materiale per l'esame istologico può essere ottenuto, oltre che con un atto chirurgico,

anche attraverso tecniche endoscopiche quali, per esempio, l'ecoendoscopia oppure con biopsia transcutanea della massa.

L'analisi mutazionale del ctDNA verrà effettuata utilizzando una tecnologia ad alta sensibilità: droplet digital PCR (ddPCR (acquisito di recente nel nostro Istituto)). Tale strumento permette di identificare alleli mutati rari con una sensibilità analitica pari allo 0.01%^[8]. Per tutti quanti i casi in cui sarà possibile ottenere una biopsia tissutale, si procederà all'analisi mutazionale dei geni *PDGFRA* e *KIT* in modo da poter verificare la concordanza dello stato mutazionale degli stessi geni con il ctDNA. Aliquote di Pool di plasma raccolto da soggetti sani e commercializzato dalla ditta BIORECLAMATION IVT (New York, USA), verranno utilizzate per estrarre DNA libero circolante. Quest'ultimo verrà impiegato come standard di riferimento al fine di valutare la sensibilità analitica e la specificità analitica delle tecniche utilizzate. Verranno inoltre determinate la sensibilità clinica e la specificità clinica del test molecolare su ctDNA dei pazienti GIST che analizzeremo^[22].

Risultati attesi:

Considerato il lungo decorso dei pazienti GIST e le diverse opzioni terapeutiche dipendenti dallo stato mutazionale del tumore, lo sviluppo di un test non invasivo, quale la biopsia liquida, che permette di determinare la presenza di mutazioni comporta dei 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.

Il presente studio permetterà di sviluppare un test analitico che prevede l'utilizzo della tecnologia droplet digital PCR per la determinazione di mutazioni che ricorrono frequentemente nei geni *KIT* e *PDGFRA* nei casi GIST.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Uno dei possibili rischi è rappresentato dal mancato raggiungimento del numero di casi GIST che prevediamo di includere nel presente studio. In caso di mancato raggiungimento del numero ci prefiggiamo di coinvolgere altri centri per l'arruolamento di nuovi casi.

Innovazioni:

L'analisi del ctDNA potrà in futuro integrare/sostituire la biopsia tradizionale ed essere utilizzata per: i) definire la prognosi del paziente; ii) valutare la risposta alla terapia; iii) monitorare il decorso della malattia nel tempo, con la verifica dell'insorgenza di eventuali mutazioni somatiche secondarie, responsabili dei meccanismi di resistenza, che potranno permettere al clinico di selezionare la sequenza ottimale di trattamento utilizzando farmaci target di seconda linea terapeutica.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il nostro team di ricerca comprende ricercatori medici e ricercatori biologi e possiede delle solide basi per l'esecuzione della presente proposta scientifica ed assicura la risoluzione di possibili problemi attraverso diversi approcci complementari.

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. Maier J et al., Detection of mutant free circulating tumor DNA in the plasma of patients with gastrointestinal tumor harboring activating mutations of CKIT or PDGFRA. *Clin Cancer Res.* 2013 Sep 1;19(17):4854-67
12. Kang G. et al., Detection of KIT and PDGFRA mutations in the plasma of patients with gastrointestinal tumor. *Target Oncol.* 2015 Dec; 10(4):597-601.
13. Wada N. et al., Detecting Secondary C-KIT Mutations in the peripheral blood of patients with Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumor. *Oncology.* 2016; 90(2):112-7
14. Boonstra PA et al., A single digital droplet PCR assay to detect multiple KIT exon 11 mutations in tumor and plasma from patients with gastrointestinal stromal tumors. *Oncotarget.* 2018 Feb 14;9(17):13870-13883.
15. Thomas L, Richards M, Mort M, Dunlop E, Cooper DN, Upadhyaya M. Assessment of the potential pathogenicity of missense mutations identified in the GTPase-activating protein (GAP)-related domain of the neurofibromatosis type-1 (NF1) gene. *Hum Mutat.* 2012 Dec;33(12):1687-96. doi: 10.1002/humu.22162.
16. Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciot R, Pauwels P, De Wever I, Vermeesch JR, de Raedt T, De Paepe A, Speleman F, van Oosterom A, Messiaen L, Legius E. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Hum Mol Genet.* 2006 Mar 15;15(6):1015-23. Epub 2006 Feb 6.
17. Andersson J, Sihto H, Meis-Kindblom JM, Joensuu H, Nupponen N, Kindblom LG. NF1-associated gastrointestinal stromal tumors have unique clinical, phenotypic, and genotypic characteristics. *Am J Surg Pathol.* 2005 Sep;29(9):1170-6.
18. Miettinen M, Fetsch JF, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors in patients with neurofibromatosis 1: a clinicopathologic and molecular genetic study of 45 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006 Jan;30(1):90-6.
19. Valencia E, Saif MW. Neurofibromatosis type 1 and GIST: is there a correlation? *Anticancer Res.* 2014 Oct;34(10):5609-12.
20. Agaimy A, Vassos N, Croner RS. Gastrointestinal manifestations of neurofibromatosis type 1 (Recklinghausen's disease): clinicopathological spectrum with pathogenetic considerations. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(9):852-62.

21. Nishida T, Tsujimoto M, Takahashi T, Hirota S, Blay JY, Wataya-Kaneda M. Gastrointestinal stromal tumors in Japanese patients with neurofibromatosis type I. *J Gastroenterol.* 2016 Jun;51(6):571-8.

22. 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).

Timeline / Prodotti finali:

Obiettivo specifico 1 timeline: gli esperimenti saranno iniziati nel primo anno e completati entro i sei mesi del terzo anno.

Obiettivo specifico 2 timeline: l'obiettivo specifico 2 verrà raggiunto entro la fine del terzo anno.

Prima metà del progetto:

Nei primi 18 mesi del progetto prevediamo di lavorare sull'obiettivo specifico 1.

Seconda metà del progetto:

Negli ultimi 18 mesi del progetto prevediamo di completare l'obiettivo specifico 1 e l'obiettivo specifico 2

Progetto n. 2: "Effetti metabolici delle terapie biologiche anti-TNF α in pazienti con IBD"

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Pasqua Letizia Pesole, Mauro Mastronardi, Palma Aurelia Iacovazzi, Marcello Chieppa, Vito Guerra, Maurizio Gaetano Polignano

Background

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 morbilità 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. Tuttavia, non tutti i pazienti rispondono ad IFX, e una grande percentuale, fino al 40%, sviluppa una perdita di risposta (loss of response, LOR) ad un anno dall' inizio della terapia. Si pensa che questo fenomeno sia dovuto a fattori quali bassi livelli di farmaco in circolo, aumentata clearance del farmaco e sviluppo di anticorpi anti-IFX. La LOR richiede una escalation di dosi, un intervallo di tempo inferiore tra una dose e l' altra o l' aggiunta di immunosoppressori. Tutte queste strategie, purtroppo, aumentano il rischio di potenziali effetti collaterali. Si è studiato molto il meccanismo con cui avvengono immunogenicità, sviluppo di anticorpi contro il farmaco e LOR, al fine di predire la risposta alla terapia in uno stadio precoce della malattia. La Therapeutic drug monitoring (TDM) è una strategia emergente che permette di raggiungere la terapia biologica ottimale misurando le concentrazioni sieriche di farmaco (conosciute come trough level) e di anticorpi contro il farmaco.

La 90 K/MAC-2BP è una N-glicoproteina (PM 70-95 KD) che è stata originariamente descritta come antigene circolante nel sovrantante di cellule di carcinoma mammario umano. È stata identificata come membro della superfamiglia degli Scavenger Receptor Cystein Rich (SRCR), di cui fanno parte proteine implicate maggiormente nelle funzioni di difesa dell' ospite. La correlazione tra le concentrazioni di 90K e alcune citochine in pazienti asintomatici ed in individui sani hanno mostrato come la 90 K può essere parte di un network di risposta immune e infiammatoria. Le funzioni fisiologiche della proteina extracellulare comprendono immunomodulazione e modulazione della proliferazione, motilità, migrazione e adesione tra le cellule attraverso l' interazione con i recettori presenti sulla superficie cellulare. Nello specifico, l' induzione del signaling mediato dalla 90K coinvolge una up-regolazione della produzione di citochine, come interleukin 2 (IL-2), interleukin 6 (IL-6), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), e TNF- α .

Obiettivo dello studio

L'obiettivo dello studio è stato analizzare le variazioni dei parametri infiammatori PCR (proteina C reattiva) e ferritina e della glicoproteina 90K/MAC-2BP, marcatore della risposta immunitaria innata, nei pazienti affetti da IBD ed in terapia con IFX, in rapporto sia al farmaco in circolo sia alla presenza di anticorpi anti-farmaco.

Materiali e metodi

In questo studio osservazionale sono stati considerati un totale di 29 pazienti (8 UC, 21 CD) con diagnosi di IBD ed in terapia con IFX, afferiti presso l'IRCCS "Saverio de Bellis" (Castellana Grotte, BA, Italia), da Febbraio 2017 a Dicembre 2018.

Preliminarmente, i pazienti sono stati informati circa la natura dello studio e hanno firmato il modulo di consenso informato predisposto. Lo studio è stato eseguito secondo la dichiarazione di Helsinki. Il protocollo di questa ricerca ha previsto che i pazienti fossero sottoposti ad un prelievo venoso, a digiuno, prima della infusione della terapia biologica con IFX. Sono stati raccolti campioni di siero, subito processati e dello stesso campione sono state conservate più aliquote a -80° C, presso i laboratori dell'IRCCS, secondo adeguati standard di conservazione. Nello studio non c'è stato intervento farmacologico in quanto lo studio è stato di tipo osservazionale. Il farmaco è stato somministrato per via endovenosa con un dosaggio di 5 mg/kg e l'intervallo tra le infusioni è variato in rapporto alle decisioni cliniche ed, in ogni caso, le variazioni temporali tra un'infusione e l'altra sono state minime. Nello studio non è stata fatta distinzione tra il farmaco originale ed il biosimilare, in quanto precedenti studi hanno dimostrato l'assenza di differenza in termini di efficacia, sicurezza e immunogenicità tra l'originale ed il biosimilare.

Si è proceduto a verificare lo stato infiammatorio dei pazienti mediante determinazione su siero della PCR e della ferritina, attraverso sistemi analitici di chimica clinica automatizzati (Beckman Coulter DXi e DXc 600). I livelli sierici di Infliximab e degli anticorpi anti-Infliximab sono stati valutati simultaneamente mediante dosaggio ELISA (LISA Tracker Duo IFX, Theradiag, France). Inoltre, è stata determinata la concentrazione della 90K/Mac-2BP mediante dosaggio ELISA (Human s90K/MAC-2bp, Invitrogen, Austria). I dosaggi dei diversi parametri considerati sono stati effettuati sui campioni raccolti immediatamente prima della I (baseline), III (I3) e V (I5) infusione. Per 18/29 pazienti è stato possibile proseguire le determinazioni sui campioni prima della VIII infusione (I8).

I dati sono stati sottoposti al test non parametrico Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) per valutare le differenze tra i gruppi di pazienti con e senza farmaco in circolo e quelli che hanno sviluppato o meno anticorpi. Le differenze sono state definite significative con $p < 0.05$. L'elaborazione è stata condotta utilizzando il software STATA 12.1 Statistical Software (StataCorp), 2014, release 12 (College Station, TX).

Risultati

Dei 29 pazienti studiati, 21 (72,4%) sono risultati affetti da CD e 8 (27,6%) da UC. Le caratteristiche dei pazienti sono state riassunte in tabella 1.

	Pazienti CD n = 21	Pazienti UC n = 8
Sesso M/F	11/10	8/0
Età (anni)	38.09 ± 13.74	38.50 ± 12.32
Peso (kg)	70.90 ± 23.33	76 ± 14.95
Fumatori	5	0

Tab. 1 Informazioni cliniche dei pazienti. Età e peso sono riportati come media ± SD.

In primis, abbiamo valutato quanti pazienti avessero farmaco in circolo e quanti avessero sviluppato anticorpi contro il farmaco nel corso delle infusioni, indipendentemente dalla patologia (Tabelle 2, 3).

	I ₃		I ₅		I ₈	
	Farmaco in circolo §		Farmaco in circolo §		Farmaco in circolo §	
	No (<1.0 µg/mL)	Si (≥1.0 µg/mL)	No (<1.0 µg/mL)	Si (≥1.0 µg/mL)	No (<1.0 µg/mL)	Si (≥1.0 µg/mL)
PAZIENTI TOTALI (UC+ CD)	n =1	n=28	n=9	n=20	(n=8)	(n=10)
PAZIENTI CD	n=1	n=20	n=6	n=15	n=5	n=8
PAZIENTI UC	n=0	n=8	n=3	n=5	n=3	n=2

Tab. 2 Numero dei pazienti con farmaco in circolo e non, in totale e divisi per patologia.

	I ₃		I ₅		I ₈	
	Anti-IFX ^		Anti-IFX ^		Anti-IFX ^	
	Si (>10 ng/mL)	No (≤10 ng/mL)	Si (>10 ng/mL)	No (≤10 ng/mL)	Si (>10 ng/mL)	No (≤10 ng/mL)
PAZIENTI TOTALI (UC+ CD)	n =4	n=25	n=9	n=20	(n=5)	(n=13)
PAZIENTI CD	n=2	n=19	n=8	n=13	n=3	n=10
PAZIENTI UC	n=2	n=6	n=1	n=7	n=2	n=3

Tab. 3 Numero dei pazienti che presentano anticorpi e non, in totale e divisi per patologia.

Abbiamo considerato come terapeutici i livelli di IFX maggiori del limite di sensibilità della metodologia da noi utilizzata per il dosaggio [$\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$], mentre abbiamo valutato la presenza degli anticorpi anti-IFX utilizzando il cut-off di 10 ng/ml, in accordo con il metodo utilizzato. Prima della III infusione, 28/29 pazienti hanno mostrato livelli terapeutici di IFX, mentre 4/29 hanno presentano livelli di anticorpi $>10 \text{ ng/ml}$. Prima della V infusione, 9/29 pazienti non hanno mostrato il farmaco in circolo e per 5 (55,5%) di questi la non presenza del farmaco è concomitante allo sviluppo di anticorpi. Nella I₈, dei 18 pazienti valutati, 8/18 i livelli di IFX sono risultati al di sotto del limite e per 5 (62,5%) di questi è stata determinata la presenza di anticorpi.

Abbiamo valutato, quindi, la variazione dei parametri quali PCR, ferritina e 90 K, nel corso delle infusioni, in rapporto sia alla presenza del farmaco in circolo e sia alla formazione degli anticorpi contro il farmaco, considerando i pazienti in toto e divisi per patologia (Tabelle 4-9). Nel primo caso, nella infusione I₃ la PCR tendeva a diminuire nei pazienti con livelli di IFX $\geq 1.0 \mu\text{g/ml}$ rispetto a quelli con livelli $<1.0 \mu\text{g/ml}$, anche se in maniera non significativa ($p=0.12$). Nelle infusioni I₅ e I₈ si è osservato, invece, una diminuzione significativa ($p=0.004$ e $p=0.007$, rispettivamente) (Figura 1).

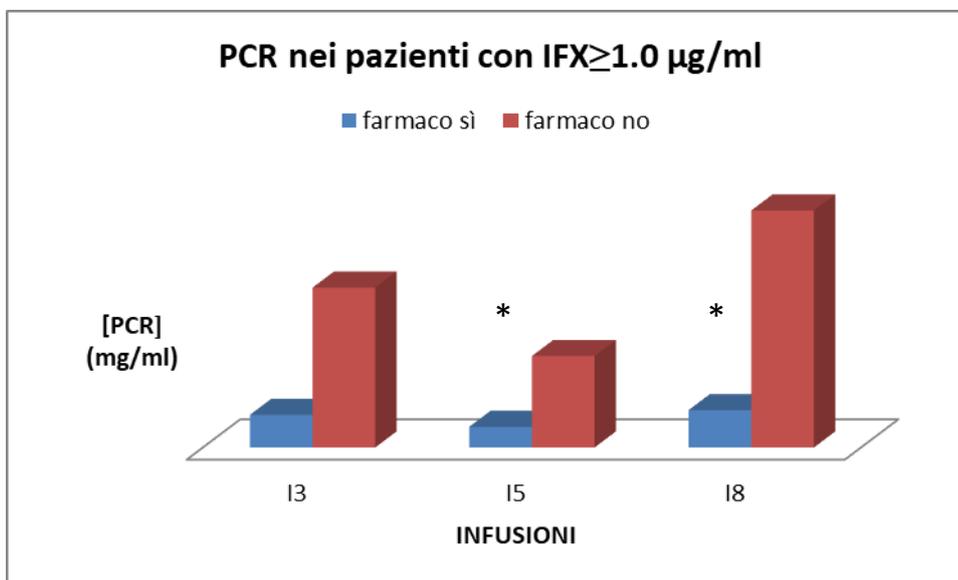


Figura 1. Diminuzione della PCR nei pazienti in rapporto alla presenza del farmaco, nel corso delle infusioni.

Per quanto riguarda la differenza dei livelli di PCR in rapporto allo sviluppo degli anticorpi anti-IFX, abbiamo trovato una lieve tendenza alla diminuzione nelle I₃ e I₅ ($p=0.06$ e $p=0.45$, rispettivamente) nei pazienti in cui non erano presenti anticorpi, mentre sembrava aumentare nella I₈ ($p=0.15$). Analizzando il comportamento dei livelli di PCR nel CD e nella UC, la diminuzione della PCR è stata più evidente nei pazienti con CD rispetto a quelli con UC. Le analisi condotte sulla 90 K non hanno mostrato differenze significative nei pazienti con IBD, sia in rapporto alla presenza del farmaco, sia allo sviluppo di anticorpi. Tuttavia, nei pazienti con UC, abbiamo notato come a differenza delle I₃ e I₅, in cui la concentrazione media della 90 K è rimasta pressoché costante ($p=0.74$ e $p=0.83$, rispettivamente), nella I₈ c'è stato un aumento di questa glicoproteina in coloro che hanno sviluppato anticorpi, anche se non in modo significativo ($p=0.08$), rispetto a quelli che stavano rispondendo alla terapia (Figura 2). La ferritina, considerato un marcatore di infiammazione, è diminuita in maniera significativa ($p=0.03$) nei pazienti con farmaco in circolo, indipendentemente dalla patologia (Figura 3).

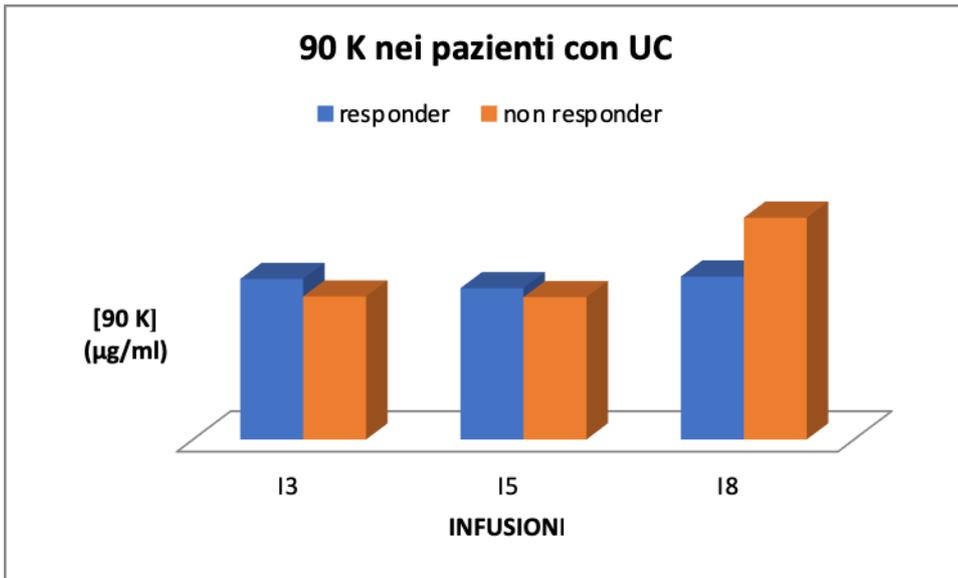


Figura 2. Aumento della 90 K nei pazienti affetti da UC, in rapporto allo sviluppo di anticorpi, nel corso delle infusioni.

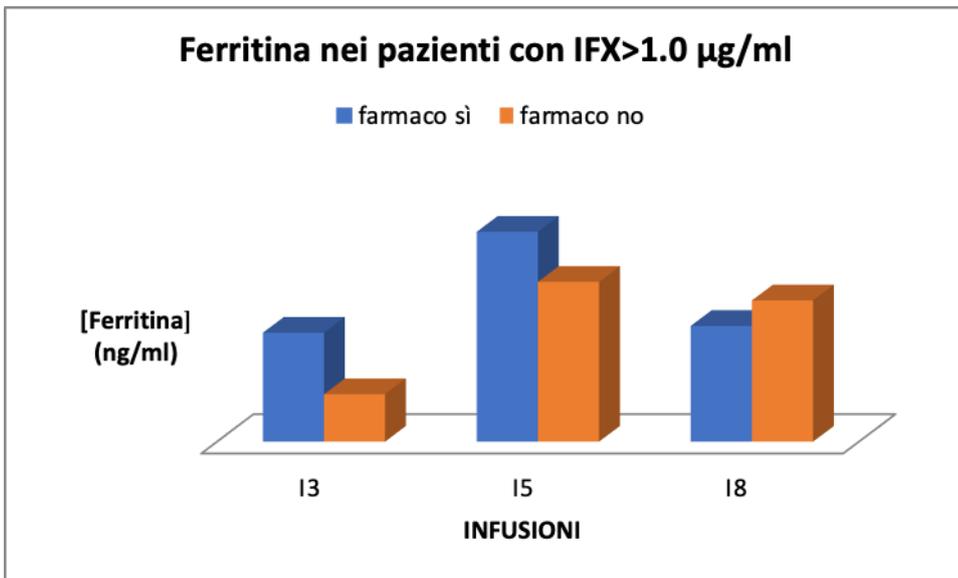


Figura 3. Diminuzione della ferritina nei pazienti IBD, nella I₈, indipendentemente dalla patologia, in rapporto al farmaco in circolo, nel corso delle infusioni.

PAZIENTI TOTALI (UC + CD)

	Baseline (n=29)	I ₃			I ₅			I ₈		
		Farmaco in circolo §		p [#]	Farmaco in circolo §		p [#]	Farmaco in circolo §		p [#]
		No (<1.0µg/mL) (n=1)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=28)		No (<1.0 µg/mL) (n=9)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=20)		No (<1.0 µg/mL) (n=8)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=10)	
90K (µg/ml) (M±SD)	7.05±4.01	7.20±.	6.89±4.34	0.63	6.91±2.51	7.20±3.92	0.98	7.53±1.71	8.72±4.12	0.70
CRP (mg/ml) (M±SD)	1.43±3.02	2.01±.	0.41±0.74	0.12	1.15±1.42	0.26±0.23	0.004	2.98±5.40	0.47±0.36	0.007
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	55.97±50.53	17.90±.	45.68±58.02	0.90	67.03±66.77	88.04±155.61	0.89	59.26±47.32	48.55±48.69	0.03

Tab. 4

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; § Infliximab; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

PAZIENTI CD	Baseline (n=21)	I ₃			I ₅			I ₈		
		Farmaco in circolo §		p [#]	Farmaco in circolo §		p [#]	Farmaco in circolo §		p [#]
		No (<1.0 µg/mL) (n=1)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=20)		No (<1.0 µg/mL) (n=6)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=15)		No (<1.0 µg/mL) (n=5)	Si (≥1.0 µg/mL) (n=8)	
90K (µg/ml) (M±SD)	6.87±3.97	7.2±.	7.01±4.80	0.62	6.52±2.83	7.75±4.25	0.39	7.00±1.20	9.07±4.59	0.50
CRP (mg/ml) (M±SD)	0.89±1.11	2.01±.	0.29±0.24	0.10	1.25±1.66	0.26±0.21	0.01	0.60±0.30	0.46±0.38	0.07
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	53.21±48.20	17.90±.	40.52±46.25	1.00	83.60±73.64	85.14±175.09	0.39	64.88±60.57	57.94±50.31	0.11

Tab. 5

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; § Infliximab; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

PAZIENTI UC	Baseline		I ₃		I ₅		I ₈		p [#]	
	(n=8)	Farmaco in circolo §		Farmaco in circolo §		Farmaco in circolo §				
		No	Si	No	Si	No	Si			
		(<1.0 µg/mL (n=0)	(≥1.0 µg/mL (n=8)	(<1.0 µg/mL (n=3)	(≥1.0 µg/mL (n=5)	(<1.0 µg/mL (n=3)	(≥1.0 µg/mL (n=2)			
90K (µg/ml) (M±SD)	7.52±4.34	--	6.58±3.16	--	7.68±1.93	5.53±2.28	0.30	8.23±2.30	7.30±0.28	0.56
CRP (mg/ml) (M±SD)	2.85±5.47	--	0.69±1.36	--	0.97±1.04	0.28±0.31	0.18	6.95±8.00	0.51±0.42	0.08
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	63.22±59. 08	--	58.59±83. 14	--	33.90±42. 49	96.74±87. 13	0.10	49.90±17. 02	11.00±10. 04	0.08

Tab. 6

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; § Infliximab; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

PAZIENTI TOTALI (UC+CD)

	Baseline		I ₃		I ₅		I ₈		p [#]	
	(n=29)	Anti-IFX ^		Anti-IFX ^		Anti-IFX ^				
		Si	No	Si	No	Si	No			
		(>10 ng/mL (n=4)	(≤10 ng/mL (n=25)	(>10 ng/mL (n=9)	(≤10 ng/mL (n=20)	(>10 ng/mL (n=5)	(≤10 ng/mL (n=13)			
90K (µg/ml) (M±SD)	7.05±4.01	8.11±3.61	6.70±4.39	0.23	8.47±5.05	6.49±2.45	0.56	7.62±1.87	8.48±3.80	0.67
CRP (mg/ml) (M±SD)	1.43±3.02	0.82±0.80	0.41±0.79	0.06	1.57±1.93	1.37±3.45	0.45	1.30±1.86	1.70±4.27	0.15
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	55.97±50. 53	11.20±9.1 9	50.09±59. 92	0.08	47.19±42. 93	59.92±54. 16	0.40	53.14±44. 94	53.38±49. 54	0.46

Tab. 7

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; ^ Anti-IFX, Presenza Anticorpi anti-IFX; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

PAZIENTI CD	I ₃				I ₅				I ₈			
	Baseline	Anti-IFX ^		p [#]	Anti-IFX ^		p [#]	Anti-IFX ^		p [#]		
	(n=21)	Si (>10 ng/mL) (n=2)	No (≤10 ng/mL) (n=19)		Si (>10 ng/mL) (n=8)	No (≤10 ng/mL) (n=13)		Si (>10 ng/mL) (n=3)	No (≤10 ng/mL) (n=10)			
90K (µg/ml) (M±SD)	6.87±3.97	10.20±4.24	6.68±4.70	0.1 5	8.78±5.31	6.55±2.54	0.5 1	6.47±0.68	9.02±4.29	0.1 6		
CRP (mg/ml) (M±SD)	0.89±1.11	1.15±1.22	0.29±0.24	0.1 5	0.90±1.53	0.32±0.23	0.5 6	1.24±1.04	0.49±0.64	0.4 9		
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	53.21±48.2 0	10.25±10.8 2	42.51±46.6 3	0.2 3	71.50±65.9 2	92.82±187. 89	0.5 1	46.47±27.8 0	46.80±45.1 1	0.6 1		

Tab. 8

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; ^ Anti-IFX, Presenza Anticorpi anti-IFX; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test

PAZIENTI UC	I ₃				I ₅				I ₈			
	Baseline	Anti-IFX ^		p [#]	Anti-IFX ^		p [#]	Anti-IFX ^		p [#]		
	(n=8)	Si (>10 ng/mL) (n=2)	No (≤10 ng/mL) (n=6)		Si (>10ng/mL) (n=1)	No (≤10 ng/mL) (n=7)		Si (>10 ng/mL) (n=2)	No (≤10ng/mL) (n=3)			
90K (µg/ml) (M±SD)	7.52±4.34	6.03±1.95	6.77±3.61	0.74	6.00±.	6.38±2.48	0.83	9.35±1.77	6.87±0.78	0.08		
CRP (mg/ml) (M±SD)	2.85±5.47	0.48±0.08	0.76±1.60	0.17	0.55±.	0.54±0.76	0.51	1.21±0.45	0.43±0.43	0.25		
Ferritina (ng/ml) (M±SD)	63.22±59.0 8	12.15±11.5 2	74.07±92.2 0	0.18	82.80±.	71.80±82.9 4	0.83	47.50±40.7 3	36.33±48.5 1	0.56		

Tab. 9

* Prima del 3°, 5°, ed 8° Trattamento; ^ Anti-IFX, Presenza Anticorpi anti-IFX; # Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test.

Progetto n. 3: “Classificazione molecolare e immunofenotipica dei carcinomi gastrici: correlazione con HER2 e PD-L1”

Responsabile: dott.ssa Anna Maria Valentini

Partecipanti: dott. Raffaele Armentano, dott.ssa Maria Lucia Caruso, dott.ssa Federica Di Pinto, dott. Cristiano Simone, dott.ssa Luciana Russo, dott.ssa Vittoria Di Sciglio.

Il trattamento terapeutico dei pazienti con carcinoma gastrico (CG) rappresenta ancora una grande sfida. Infatti, nonostante i recenti progressi della diagnostica molecolare, gli unici biomarkers predittivi approvati per il CG includono l'overespressione di HER2 per la selezione dei pazienti al trattamento con Trastuzumab e la instabilità dei microsattelliti per la selezione dei pazienti al trattamento con Pembrolizumab (immunoterapia).

Sin dalla classificazione di Laurén, risultata utile nella comprensione della storia naturale della carcinogenesi gastrica, ci sono stati numerosi tentativi con lo scopo di individuare una classificazione che fosse in grado di fornire più precise indicazioni prognostiche e terapeutiche. Recentemente, grazie al continuo aumento delle conoscenze dei complessi pathway molecolari coinvolti nelle neoplasie, sono state proposte nuove classificazioni del CG al fine di integrare i dati clinici e morfologici con quelli molecolari e individuare marcatori utili per la definizione della prognosi e nella valutazione della risposta alla terapia.

Il progetto Linea 1 – Cod. 3 ha lo scopo di caratterizzare i carcinomi gastrici dal punto di vista immunofenotipico, mediante determinazione dello status di PD-L1, p53, MLH1, E-Caderina, EBV, HER2, e correlarli con i fattori istopatologici quali sede, tipo istologico, grading, aspetti angioinvasivi, infiltrazione perineurale e stadio. Il progetto si pone anche l'obiettivo di valutare la densità dei TILs nel microambiente tumorale ed effettuare una classificazione dei carcinomi nei 4 Tumor Microenvironment Immune Types (TMITs), correlandoli con i fattori istopatologici, al fine di individuare sottotipi di carcinomi gastrico potenzialmente eleggibili al trattamento con gli anticorpi anti-HER2 o in alternativa aprire la strada a immunoterapie mirate con gli inibitori dei checkpoint immunitari.

Nella prima fase del progetto, si è proceduto alla determinazione dell'espressione di PD-L1, correlandola con lo status dei geni MLH1 e HER2 e con l'infezione da Epstein Barr Virus (EBV), nel contesto del microambiente tumorale. I risultati ottenuti dallo studio sono stati oggetto di un lavoro scientifico in corso di pubblicazione sulla rivista *Oncology Letters*.

Di seguito la sinossi del lavoro.

Lo studio è stato condotto su un totale di 70 campioni di carcinomi gastrici fissati in formalina e inclusi in paraffina, provenienti da 70 pazienti (46 maschi e 24 femmine) operati presso il nostro Istituto tra il 2014 e il 2017. Le caratteristiche clinicopatologiche dei pazienti sono riassunte in Tabella 1.

Si è proceduto quindi alla determinazione dell'espressione immunoistochimica di PD-L1 (E1L3N Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), CD8 (C8/144B, Dako, Glostrup, Denmark), MLH1 (ES05 Dako, Glostrup, Denmark) ed HER2 (anticorpo policlonale Dako, Glostrup, Denmark).

La infezione da EBV è stata messa in evidenza mediante ibridazione in situ cromogenica (CISH) utilizzando l'RNAscope detection kit (Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, USA).

I casi con score HER2 2+ all'indagine immunoistochimica sono stati sottoposti alla metodica CISH con kit Zytovision GmbH (Bremerhaven, Germany) per valutare la eventuale amplificazione genica. I CG con score immunoistochimico 3+ e 2+/con amplificazione genica sono considerati come HER2 positivi.

Otto casi su 70 (11%) hanno mostrato positività di PD-L1 sulle TCs, mentre il 40% dei GCs ha mostrato positività di PD-L1 soltanto sulle IICs (Tabella 1). Sei (75%) di 8 CGs PD-L1 positivi sulle TCs, hanno mostrato positività anche sulle IICs, mentre il 35% dei CGs PD-L1 negativi hanno

mostrato positività sulle IICs (Tabella 1, $p < 0.05$). La positività al PD-L1 sulle IICs è risultata più alta nei carcinomi gastrici di tipo intestinale rispetto a quelli di tipo diffuso (56 vs. 25%, $p < 0.05$) ed è significativamente associata con un fronte di avanzamento di tipo espansivo. Immagini rappresentative dell'espressione immunoistochimica di PD-L1 nelle TCs e IICs sono mostrate in figura 1.

Diciannove campioni (27%) sono risultati HER2 positivi, di cui 13 con score 3+ e 6 con score 2+ e amplificazione genica (Figura 2). Tra i campioni risultati HER2 positivi, uno (5%) ha mostrato positività di PD-L1 sulle TCs e sulle IICs, sette (37%) hanno mostrato positività solo sulle IICs (Tabella 1). Non è stata dimostrata una correlazione significativa tra l'espressione di PD-L1 e lo status di HER2 (Tabella 1).

Per quanto riguarda lo status del gene MLH1, è stata riscontrata una correlazione positiva tra l'espressione di PD-L1 e il deficit del sistema di riparazione dei mismatch (MMR-D) (Tabella 1).

Tra i 70 pazienti, 2 (3%) sono risultati positivi all'infezione da EBV, mostrando una intensa colorazione nucleare (Figura 2). Questi due campioni mostravano anche espressione di PD-L1 sulle TCs (Tabella 2).

Figura 1. Espressione immunoistochimica di PD-L1 sulle TCs (A) e sulle IICs (B)

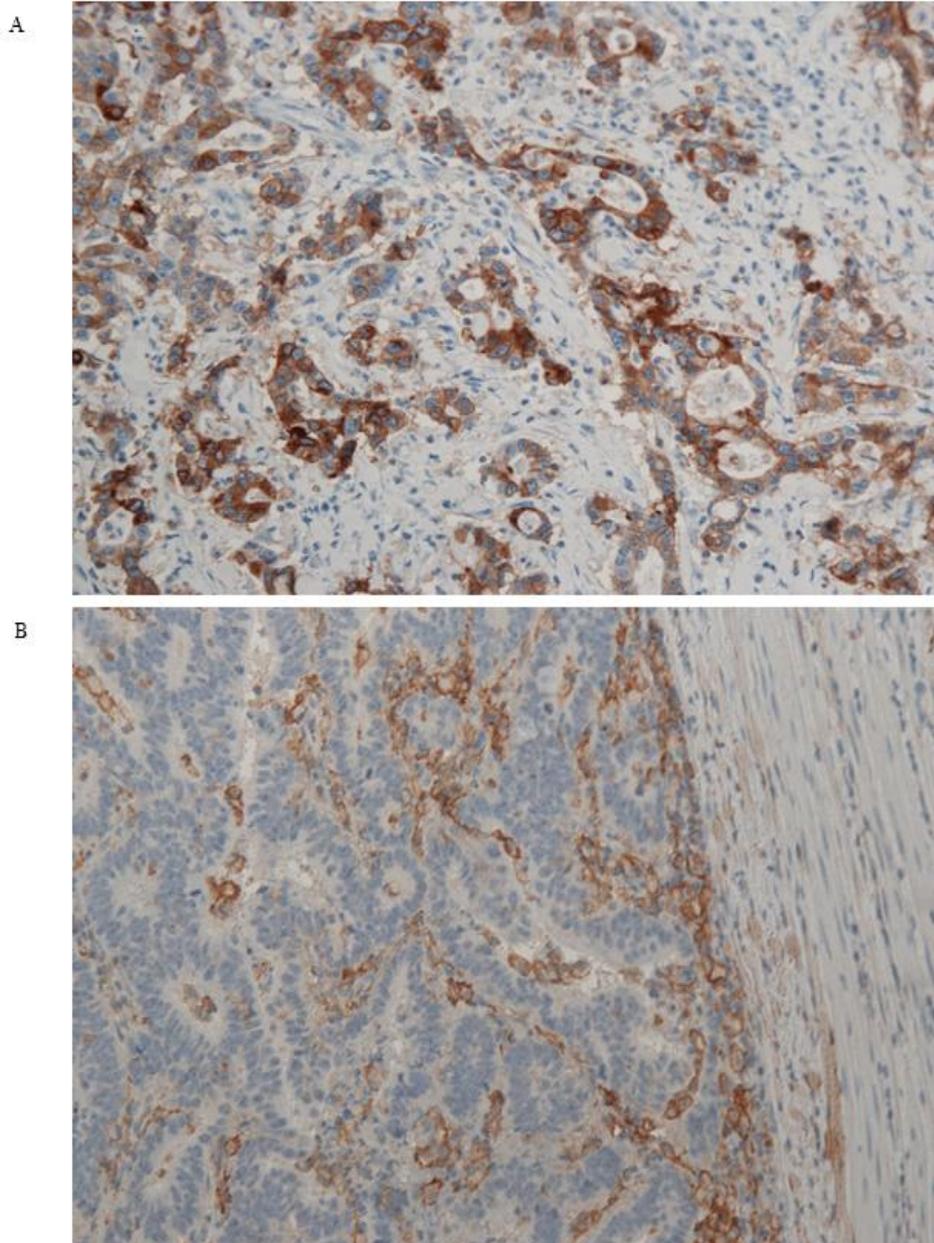


Figura 2. CG con score immunohistochimico 3+ (A) e amplificazione genica di HER2 (B)

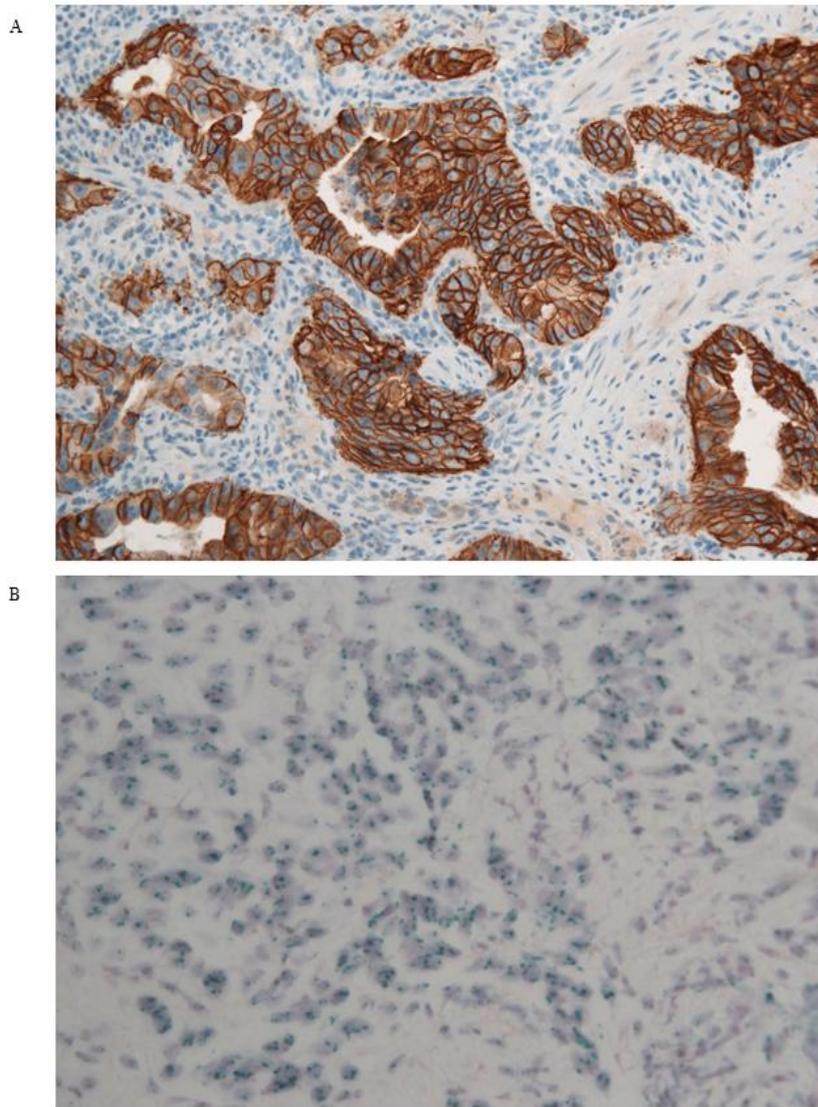


Figura 3. EBV CISH: positività nucleare delle cellule tumorali gastriche.

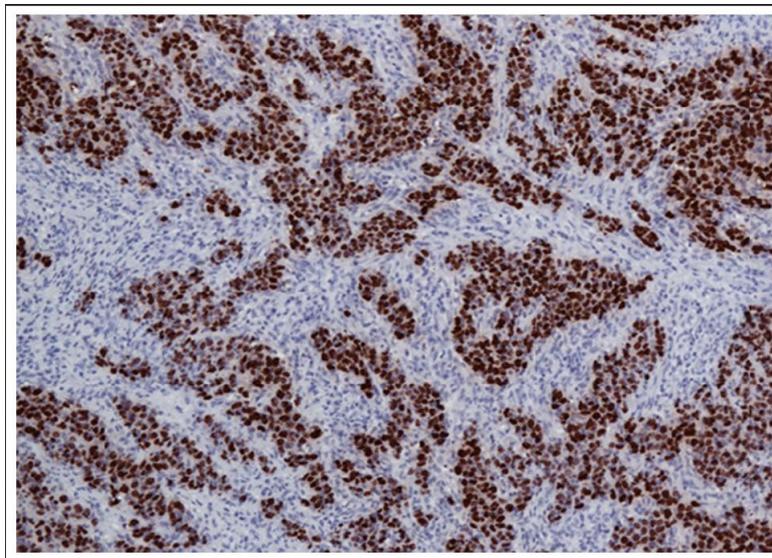


Tabella 1. Correlazione tra espressione di PD-L1 e caratteristiche clinicopatologiche.

Caratteristiche	Totale (n=70), n (%)	PD-L1 TCs		P-value	PD-L1 IICs		P-value
		Positivi (n=8), n (%)	Negativi (n=62), n (%)		Positivi (n=28), n (%)	Negativi (n=42), n (%)	
Sesso				NS			NS
Femmine	24 (34.00)	3 (12.50)	21 (87.50)		9 (37.50)	15 (62.50)	
Maschi	46 (66.00)	5 (11.00)	41 (89.00)		19 (41.00)	27 (59.00)	
Età	65.83±10.63	70.75±11.40	65.19±10.45	NS	67.39±10.99	65.12±10.27	NS
Sede tumorale				NS			NS
Distale	33 (47.00)	3 (9.00)	30 (91.00)		13 (39.00)	20 (61.00)	
Prossimale	37 (53.00)	5 (13.50)	32 (86.50)		15 (40.50)	22 (59.50)	
Tipo istologico				NS			<0.05
Diffuso	36 (51.00)	5 (14.00)	31 (86.00)		9 (25.00)	27 (75.00)	
Intestinale	34 (49.00)	3 (9.00)	31 (91.00)		19 (56.00)	15 (44.00)	
Gradig istologico				NS			NS
G1+G2	12 (17.00)	0 (0.00)	12 (100.00)		6 (50.00)	6 (50.00)	
G3	58 (83.00)	8 (14.00)	50 (86.00)		22 (38.00)	36 (62.00)	
Fronte di avanzamento				NS			<0.05
Espansivo	14 (20.00)	3 (21.00)	11 (79.00)		9 (64.00)	5 (36.00)	
Infiltrativo	56 (80.00)	5 (9.00)	51 (91.00)		19 (34.00)	37 (66.00)	
Budding tumorale				NS			NS
Assente	25 (36.00)	2 (8.00)	23 (92.00)		13 (52.00)	12 (48.00)	
Alto	45 (64.00)	6 (13.00)	39 (87.00)		15 (33.00)	30 (67.00)	
Densità IICs				<0.05			NS
Lieve	45 (64.00)	2 (4.00)	43 (96.00)		15 (33.00)	30 (67.00)	
Marcata	25 (36.00)	6 (24.00)	19 (76.00)		13 (52.00)	12 (48.00)	
pT status				NS			NS
T1-T2	10 (14.00)	0 (0.00)	10 (100.00)		4 (40.00)	6 (60.00)	
T3-T4	60 (86.00)	8 (13.00)	52 (87.00)		24 (40.00)	36 (60.00)	
pN status				NS			NS
N0	13 (19.00)	3 (23.00)	10 (77.00)		7 (54.00)	6 (46.00)	

N+	57 (81.00)	5 (9.00)	52 (91.00)	21 (37.00)	36 (63.00)
MMR status				<0.05	<0.05
Alterato	7 (10.00)	4 (57.00)	3 (43.00)	7 (100.00)	0 (0.00)
Non alterato	63 (90.00)	4 (6.00)	59 (94.00)	21 (33.00)	42 (67.00)
HER2 status				NS	NS
Positivo	19 (27.00)	2 (10.50)	17 (89.50)	8 (42.00)	11 (58.00)
Negativo	51 (73.00)	6 (12.00)	45 (88.00)	20 (39.00)	31 (61.00)
Densità CD8⁺				<0.05	NS
Alta	16 (23.00)	5 (31.00)	11 (69.00)	7 (44.00)	9 (56.00)
Bassa	54 (77.00)	3 (5.50)	51 (94.50)	21 (39.00)	33 (61.00)
PDL1 TCs				-	<0.05
Positive	8 (11.00)	-	-	6 (75.00)	2 (25.00)
Negative	62 (89.00)	-	-	22 (35.00)	40 (65.00)

Tabella 2. Correlazione tra EBV status, espressione di PD-L1 e densità dei CD8⁺ TILs.

Caratteristiche	Totale (n=70), (n) %	PD-L1 TCs		P-value	PD-L1 IICs		P-value	CD8 ⁺ TILs		P-value
		Positivi (n=8), n (%)	Negativi (n=62), n, (%)		Positivi (n=28), n (%)	Negativi (n=42), n (%)		Alti (n=16), n (%)	Bassi (n=54), n (%)	
EBV status				<0.05			NS			<0.05
Positivo	2 (3)	2 (100)	0 (0)		1 (50)	1 (50)		2 (100)	0 (0)	
Negativo	68 (97)	6 (0)	62 (100)		27 (40)	41 (60)		14 (21)	54 (79)	

Sulla base dei risultati dell'espressione immunohistochemica di PD-L1 sulle TCs e della densità dei TIL CD8⁺, abbiamo classificato i 70 CGs nei 4 TMITs: TMIT I (PD-L1+/CD8 alti) 5 (7%) (Figura 4); TMIT II (PD-L1-/CD8 bassi) 51 (73%); TMIT III (PD-L1+/CD8 bassi) 3 (4%); TMIT IV (PD-L1-/CD8 alti) 11 (16%). L'associazione tra i TMITs e le caratteristiche clinicopatologiche dei campioni sono mostrate in Tabella 3.

Figura 4. TMIT I: campione di CG PD-L1+ con alta densità di linfociti T CD8+ (inserto).

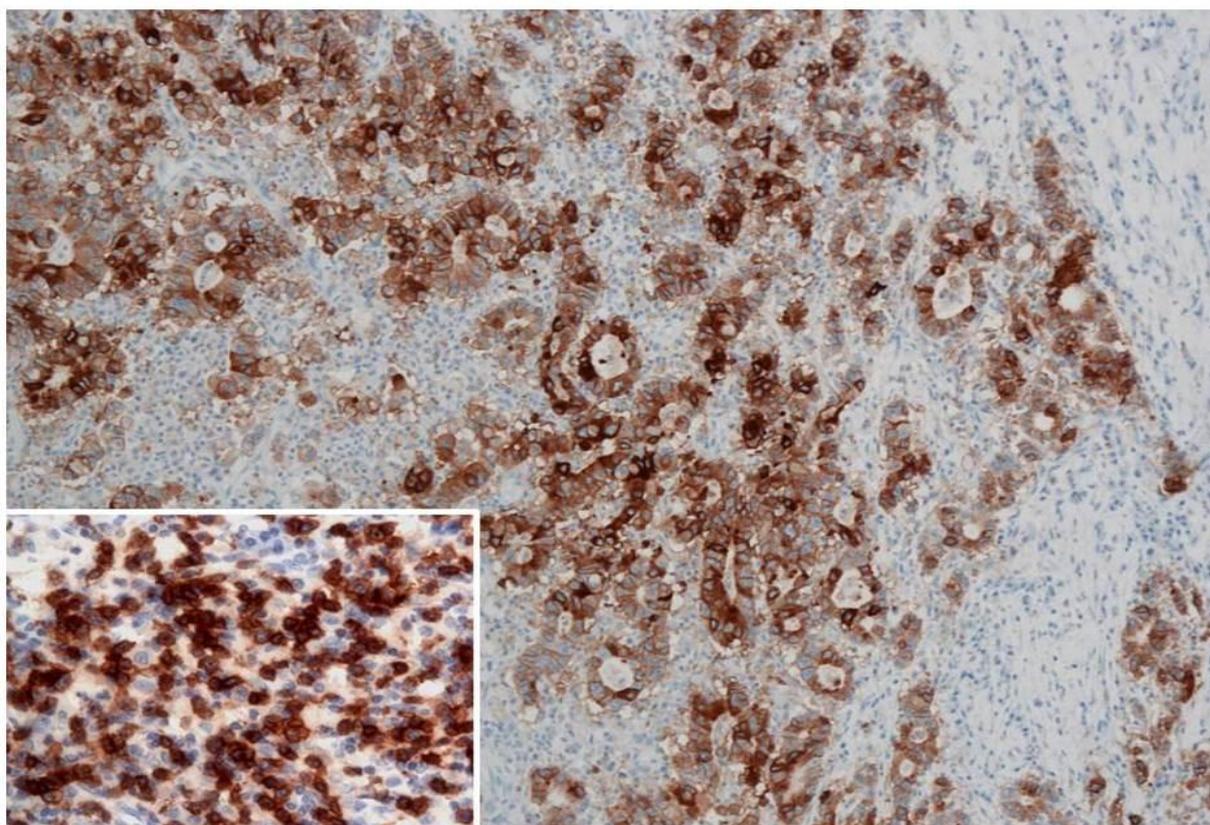


Tabella 3. Correlazione tra TMITs e caratteristiche clinicopatologiche.

	Totale (n=70), n (%)	TMIT				P-value
		I (n=5), n (%)	II (n=51), n (%)	III (n=3), n (%)	IV (n=11), n (%)	
Sesso						NS
Femmine	24 (34.00)	1 (4.00)	15 (62.50)	2 (8.00)	6 (25.50)	
Maschi	46 (66.00)	4 (9.00)	36 (78.00)	1 (2.00)	5 (11.00)	
Età	65.83±10.63	65.50±14.39	64.60±10.66	76.00±4.76	67.67±9.53	NS
Sede tumorale						NS
Distale	33 (47.00)	1 (3.00)	24 (73.00)	2 (6.00)	6 (82.00)	
Proximale	37 (53.00)	4 (11.00)	27 (73.00)	1 (3.00)	5 (13.00)	
Tipo istologico						NS
Diffuso	36 (51.00)	4 (11.00)	25 (69.00)	1 (3.00)	6 (17.00)	
Intestinale	34 (49.00)	1 (3.00)	26 (76.00)	2 (6.00)	5 (15.00)	

Grado tumorale						NS
G1+G2	12 (17.00)	0 (0.00)	12 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
G3	58 (83.00)	5 (9.00)	39 (70.00)	3 (5.00)	11 (16.00)	
Fronte di avanzamento						<0.05
Espansivo	14 (20.00)	1 (7.00)	9 (64.00)	3 (22.00)	1 (7.00)	
Infiltrativo	56 (80.00)	4 (7.00)	42 (75.00)	0 (0.00)	10 (18.00)	
Budding tumorale						NS
Assente	25 (36.00)	0 (0.00)	20 (80.00)	2 (8.00)	3 (12.00)	
Alto	45 (64.00)	5 (11.00)	31 (69.00)	1 (2.00)	8 (18.00)	
pT status						NS
T1-T2	10 (14.00)	0 (0.00)	9 (90.00)	0 (0.00)	1 (10.00)	
T3-T4	60 (86.00)	5 (8.00)	42 (70.00)	3 (5.00)	10 (17.00)	
pN status						NS
N0	13 (19.00)	1 (8.00)	8 (61.50)	1 (8.00)	3 (22.50)	
N+	57 (81.00)	4 (7.00)	43 (75.00)	2 (3.50)	8 (14.50)	
MMR status						<0.05
Alterato	7 (10.00)	2 (28.50)	3 (43.00)	2 (28.50)	0 (0.00)	
Non alterato	63 (90.00)	3 (5.00)	48 (76.00)	1 (2.00)	11 (17.00)	
HER2 status						NS
Positivo	19 (27.00)	1 (5.00)	15 (79.00)	1 (5.00)	2 (10.50)	
Negativo	51 (73.00)	4 (8.00)	36 (71.00)	2 (4.00)	9 (17.00)	
EBV status						<0.05
Positivo	2 (3.00)	2 (100.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	0 (0.00)	
Negativo	68 (97.00)	3 (4.00)	51 (75.00)	3 (4.00)	11 (17.00)	

Lo studio ha quindi mostrato che PD-L1 è più espresso sulle IICs (40%) che sulle TCs (11%). La maggior parte dei pazienti con espressione di PD-L1 sulle TCs ha mostrato positività del PD-L1 anche sulle IICs, suggerendo che l'espressione di PD-L1 nel CG è prevalentemente controllata da una resistenza immuno-adattativa, indotta dalle cellule immuni attraverso la via dell'interferone-gamma, piuttosto che da un pathway costitutivo

In accordo con altri Autori, lo studio ha dimostrato una correlazione significativa tra MMR-D e espressione di PD-L1 sia sulle TCs che sulle IICs. Questo risultato è spiegato dal fatto che i tumori MMR-D sono considerati altamente immunogenici a causa dell'elevato carico mutazionale, responsabile della resistenza immuno-adattativa. È stata individuata anche una associazione tra l'espressione di PD-L1 e lo status di EBV. Nessuna associazione è stata messa in evidenza tra PD-L1 e HER2 status.

Applicando lo schema per la classificazione nei TMITs, lo studio ha dimostrato che la maggior parte dei CGs (73%) apparteneva al TMIT II, caratterizzato da uno stato di ignoranza immunologica e perdita di sensibilità all'immunoterapia. Il 7% dei CG si collocava nel gruppo TMIT I, caratterizzato da una risposta immuno-adattativa e una buona possibilità di rispondere alla terapia con gli inibitori dei checkpoint immunitari. Quindi a differenza del TMIT I, per i TMIT II, III, IV, si rende necessaria l'individuazione di altri bersagli terapeutici o altri checkpoint immunitari diversi dal pathway PD-1/PD-L1.

In conclusione, lo studio ha sottolineato l'importanza di studiare il microambiente tumorale gastrico piuttosto che la sola espressione di PD-L1 per la valutazione della eleggibilità dei pazienti all'immunoterapia con inibitori di PD-1/PD-L1, utilizzando metodi semplici, a basso costo e disponibili in tutti i laboratori di anatomia patologica, quali l'immunoistochimica e l'ibridazione in situ.

Progetto n. 4: “Modulazione morfologica e funzionale della Colite Ulcerosa mediante l'utilizzo di sottopopolazioni cellulari TNF α -KO nel modello murino Winnie”

Responsabile: dott.ssa Maria Lucia Caruso, dott. Marcello Chieppa

Partecipanti: dott.ssa Elisabetta Cavalcanti

Background:

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). Nonostante il coinvolgimento fondamentale del sistema immunitario, la causa scatenante spesso non risiede in popolazioni cellulari di origine non ematopoietica. È 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. 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. 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 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 TNF α in questo fenomeno è ritenuto fondamentale, anche se ignoriamo ancora quali siano le cellule coinvolte nella produzione della prima onda di TNF α , quelle cioè ad attivare la cascata infiammatoria. Sebbene le DCs residenti nell'intestino siano rese incapaci di produrre infiammazione dall'ambiente intestinale, una prolungata esposizione ad antigeni provenienti dal lumen intestinale può cambiare questo stato di attivazione. 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 abbiamo utilizzato come modello di infiammazione causata dalla mancanza di muco e dalla conseguente esposizione cronica ai batteri del lumen intestinale. Abbiamo, pertanto, studiato la risposta immunitaria nell'intestino dei topi *Winnie*; inoltre abbiamo incrociato i topi *Winnie* con topi KO correntemente in commercio. Abbiamo utilizzato tecniche di chimerismo e di adoptive transfer per analizzare la produzione di TNF α da parte delle singole popolazioni cellulari. La nostra ipotesi è che l'assenza dello strato di muco favorisca la produzione di TNF α 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'innescò 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 TNF α o del TNF α R ci permette 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 specifici dello studio:

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

Nel dettaglio, le attività oggetto del presente studio sono le seguenti:

- valutazione e caratterizzazione della colite ulcerosa dal punto di vista morfologico funzionale nei modelli murini creati: *Winnie*, *Winnie- TNF α -KO*, *Winnie- TNF α -RKO*, *Winnie- RAG*, *Winnie- RAG-TNF α -KO*, *Winnie- RAG-TNF α -RKO*
- valutazione del fenotipo dei vari attori cellulari e dei meccanismi molecolari dei mediatori responsabili dell'infiammazione cronica nelle IBD, che permetterà nuove opportunità di comprensione della patogenesi e di miglioramento delle attuali strategie terapeutiche
- valutazione del ruolo del TNF α nello sviluppo di neoplasie del colon retto in soggetti geneticamente predisposti (*Apc^{Min}*) in presenza di infiammazione (*Winnie*).
- analisi dell'eventuale aumento di patologie neoplastiche associate alla presenza o mancanza di T

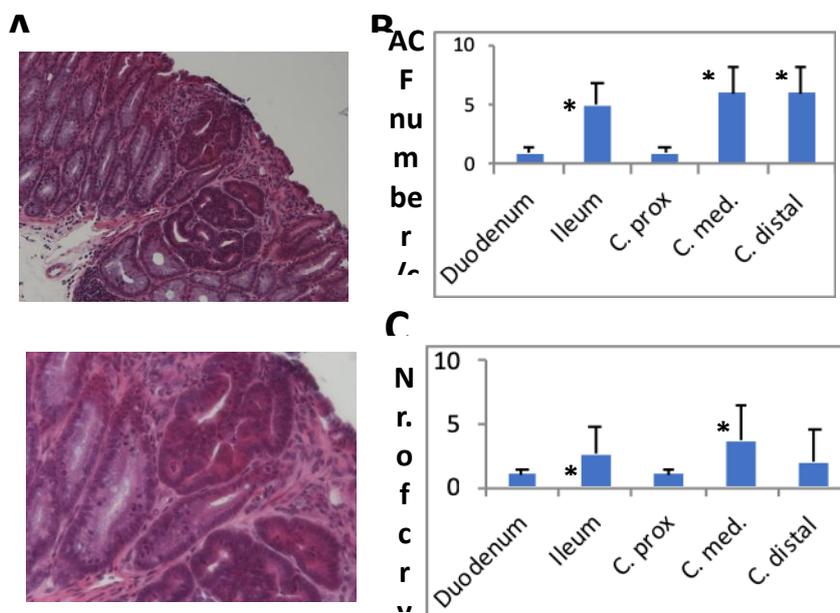
Stato avanzamento del progetto:

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 preneoplastiche 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 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. 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. 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 ACF sono stati classificati come iperplastici (non displastici, spesso inclusi ACF iperplastici serrati) o displastici, basati principalmente sulle caratteristiche morfologiche. È stato inoltre dimostrato che solo gli ACF displastici evolvono in adenomi e adenocarcinomi. 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 all'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.



Progetto n. 5: “Valutazione espressione tissutale di SMYD3”

Responsabile: Dott.ssa Maria Lucia Caruso e Prof. Cristiano Simone

Partecipanti: Raffaele Armentano, Elisabetta Cavalcanti, Cristiano Simone, Candida Fasano e Giovanna Forte.

Background:

L'ampliamento delle conoscenze sulla biologia molecolare dei tumori e il conseguente incremento delle scelte terapeutiche ha significativamente aumentato le possibilità di trattamento per i pazienti affetti da carcinoma colon rettale e gastrico.

Le neoplasie dell'apparato digerente rappresentano una delle maggiori cause di morbosità e mortalità per cancro. Infatti, il carcinoma colon rettale rappresenta la seconda causa di morbosità per neoplasia. Analogamente il carcinoma gastrico resta la seconda causa al mondo di morte per cancro (1). Infatti, la maggior parte dei CRC sono adenocarcinomi e derivano dalla trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso la sequenza adenoma-carcinoma. Il CRC è una malattia eterogenea, caratterizzata da numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche (2). Lo sviluppo, la crescita e la eventuale trasformazione maligna dei polipi adenomatosi sono associati all'accumulo di alterazioni di oncogeni e geni oncosoppressori. Talune alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei CRC ereditari. Più frequentemente i fattori ambientali alterano direttamente, nel corso della vita, il DNA delle cellule epiteliali della mucosa intestinale, inducendo o favorendo la progressione tumorale.

La progressione tumorale dallo stato di adenoma a quello di carcinoma è accompagnata da alterazioni genetiche multiple ed è conosciuta come sequenza adenoma-carcinoma. Oggi l'epigenetica è definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili dell'espressione genica non causati da variazioni della sequenza primaria di DNA (3). I meccanismi epigenetici, che comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni covalenti post-traduzionali delle proteine istoniche, le modificazioni non covalenti, come l'incorporazione di varianti istoniche e il rimodellamento dei nucleosomi, gli RNAs non codificanti, come i microRNAs, influenzano in modo significativo l'espressione genica modulando l'organizzazione spaziale della cromatina, ovvero il chromatin packaging. Recentemente è stato dimostrato che in molte patologie, tra le quali il cancro, questi meccanismi epigenetici di controllo risultano alterati e compromessi (4). Negli ultimi anni la ricerca oncologica ha spostato la sua attenzione sulla identificazione di nuove molecole nodali di pathways cancro specifici, per individuare possibili target molecolari contro cui sviluppare terapie più mirate e meno tossiche. In questo scenario assume sempre più rilievo il ruolo svolto dalla proteina SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi e di progressione tumorale. Questa proteina, infatti, risulta overespressa in numerose forme di cancro, come quello della mammella, dello stomaco, del pancreas, del colon-retto (CRC), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC) (5-9).

SMYD3 è un'istone di- e tri-metiltransferasi, appartenente alla famiglia delle "SET domain proteins", cioè proteine caratterizzate dal dominio funzionale SET altamente conservato in tutte le istone metiltransferasi (10). La funzione biologica più nota di questo enzima è la metilazione della lisina 4 dell'istone H3. A differenza di quanto accade nelle cellule neoplastiche, nelle cellule normali SMYD3 non sembra essere indispensabile per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Tuttavia, anche in cellule normali l'overespressione di SMYD3 è sufficiente ad accelerare la crescita cellulare e ad attivare dei geni di pathways coinvolti nella trasformazione delle cellule tumorali e nella loro migrazione (11-12). Anche nel cancro del colon

retto (CRC) e nell'epatocarcinoma (HCC) appare evidente la centralità di SMYD3 in pathways proliferativi, come dimostrato dagli studi condotti su modelli preclinici, ovvero in topi KO per SMYD3 in cui sono stati indotti tumori gastroenterologici (del colon e del fegato). In questi modelli KO si è osservata regressione tumorale, al contrario di quanto accadeva in topi wt dove SMYD3 potenzia la trascrizione e quindi l'espressione di molti oncogeni, tra cui *cmyc*, *βcat*, *stat3* e tutti i geni della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) alla base della trasformazione epatica maligna (Sarris et al. 2016). Nonostante la correlazione esistente tra la deregolazione di SMYD3 e la tumorigenesi, i meccanismi alla base della modulazione di SMYD3, e della sua funzione attivatoria della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali, non sono stati ancora completamente chiariti. Una vasta letteratura riporta la stretta correlazione tra un'upregolazione di SMYD3 e la cancerogenesi in diversi organi. Nel CRC mutazioni dell'oncogene KRAS sono correlate con l'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 (13). Pertanto, In questo scenario, una migliore comprensione del ruolo di SMYD3 nella tumorigenesi del tratto gastroenterico, potrebbe essere un vantaggio per futuri interventi farmacologici.

STATO DI AVANZAMENTO PER LA SECONDA ANNUALITÀ DEL PROGETTO

Obiettivo 1a-b: Valutare la frequenza di espressione di SMYD3 nei tessuti di colon normali, displastici e neoplastici, e valutare se esiste una differente espressione di SMYD3 nei tumori del colon-retto con instabilità dei micro satelliti (MSI).

Per raggiungere i primi obiettivi abbiamo studiato l'espressione di SMYD3 a livello di RNA e proteina in modelli di cancro del colon-retto (CCR) rappresentativi dei fenotipi riscontrati nella comune pratica clinica. Infatti, abbiamo caratterizzato i livelli di mRNA di SMYD3 in tre linee cellulari (HT29, CACO2, SW480) modello di tumori con fenotipo CIN (instabilità cromosomica), quattro linee (Hct116, LS174T, DLD1 e LoVo) con fenotipo MIN (instabilità dei microsatelliti) e tumori ottenuti *in vivo* nel modello murino APC^{min/+} rappresentativo della sindrome umana della Poliposi Adenomatosa Familiare (FAP). I risultati ottenuti sono stati comparati con i livelli di espressione di mRNA e proteina di SMYD3 sia in un modello di colonociti normali (linea cellulare commerciale NCM460) che nella mucosa normale di topi C57 (modello wild type dei topi APC^{min/+}). I nostri dati mostrano come tutte le linee con fenotipo CIN presentano overespressione di SMYD3 a livello dell'mRNA (FIGURA 1). Non solo, anche i tumori rilevati nei topi APC^{min/+}, che rappresentano un modello murino di neoplasie con fenotipo CIN, mostrano upregolazione del trascritto di SMYD3, confermando *in vivo* i risultati ottenuti nelle cellule umane fatte crescere *in vitro* (FIGURA 1). Diversi i risultati invece ottenuti sui modelli del fenotipo MIN, rappresentativi del 10% di tutti i tumori del colon-retto, ma soprattutto della sindrome di Lynch, sindrome del cancro del colon retto ereditario non poliposico (HNPCC). In questo modello i nostri dati indicano che solo il 50% delle cellule di CCR mostrano overespressione di SMYD3 mRNA, le restanti linee (LS174T, DLD1) presentano livelli di trascritto di SMYD3 paragonabili ai colonociti normali (NCM460) (FIGURA 1). Questi risultati suggeriscono che l'mRNA di SMYD3 possa essere upregolato nella maggioranza dei tumori CCR, dato che in clinica oltre il 90% dei tumori hanno fenotipo CIN e solo circa il 10% presenta fenotipo MIN. L'upregolazione trascrizionale è uno dei meccanismi patogenetici classici della deregolazione di SMYD3 nella tumorigenesi, con alcune vie di segnalazione ed alcuni geni attivi nel ciclo cellulare particolarmente importanti nell'attivazione delle sequenze promotoriali regolatrici dell'espressione genica di SMYD3. È vero però che il reale effettore dell'attività del gene SMYD3 è il suo prodotto proteico, una metiltransferasi coinvolta nel supportare la proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche. Pertanto, abbiamo deciso di

valutare l'espressione della proteina SMYD3 negli stessi modelli. I nostri risultati mostrano come ci sia overespressione della metiltrasferasi SMYD3 in tutti i modelli con fenotipo CIN (HT29, CACO2, SW480, APCmin/+) ed in due sole (50%) linee con fenotipo MIN (LoVo, Hct116) rispetto ai colonociti normali (NCM460), all'epitelio normale di topi C57 ed alle due linee con fenotipo MIN con bassa espressione di SMYD3 (DLD-1, LS174T) (FIGURA 1). Questi dati sono anche molto importanti dal punto di vista fisiopatologico. Infatti, l'overespressione di una proteina nei tumori può dipendere da differenti meccanismi come ad esempio un eccesso di traduzione proteica (in assenza di upregolazione del suo mRNA) oppure una riduzione della sua degradazione (sempre in assenza di upregolazione del suo mRNA). Per quanto riguarda invece l'espressione di SMYD3 nei modelli di CCR abbiamo una correlazione diretta fra i livelli di espressione dell'mRNA e quelli del prodotto proteico, suggerendo che alla base dell'overespressione di SMYD3 nel CCR ci sia soprattutto un meccanismo patogenetico di incrementata trascrizione genica (FIGURA 1).

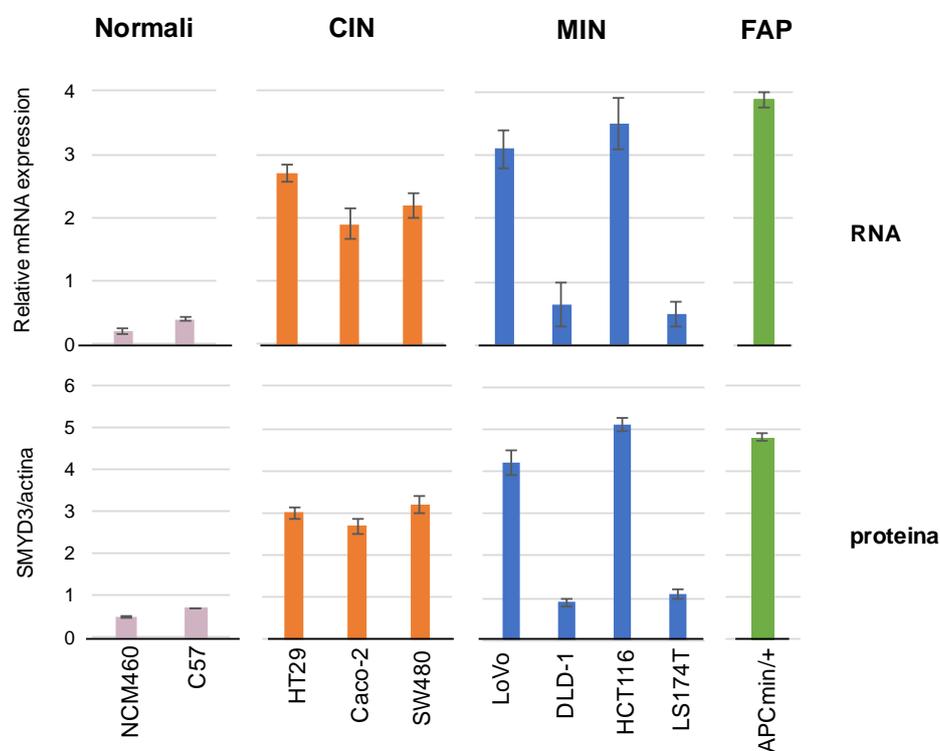


FIGURA 1: Valutazione dell'espressione di SMYD3 mediante real time PCR (RNA) e immunoblot (proteina, densitometria) in linee di CCR con diverso fenotipo: CIN: instabilità cromosomica, MIN: instabilità microsatteliti; FAP: poliposi adenomatosa familiare.

Obiettivo 1d: Valutare se esiste una correlazione tra SMYD3 e le mutazioni KRAS/BRAF

Per raggiungere l'obiettivo 1d abbiamo caratterizzato l'espressione di SMYD3 a livello di mRNA e proteina in modelli di cancro del colon-retto (CCR) rappresentativi dei genotipi (KRAS/BRAF) riscontrati nella comune pratica clinica. Infatti, abbiamo caratterizzato i livelli di mRNA di SMYD3 in cinque linee cellulari (HCT116, LS174T, DLD1, LoVo, SW480) modello di tumori con mutazioni di KRAS e BRAF wild type (KRAS mut/BRAF wt), una linea (HT29) con mutazioni di BRAF e KRAS wild type (KRAS wt/BRAF mut) ed una linea cellulare (Caco-2) con entrambi i geni wild type (KRAS wt/BRAF wt). L'analisi di espressione dell'mRNA ha mostrato come non

sembra ci sia una correlazione fra lo status mutazionale dei principali geni della via di segnalazione intracellulare RAS/RAF/MEK/ERK. Infatti, è stato possibile rilevare l'alta espressione del trascritto di SMYD3 in cinque linee cellulari su sette (circa 70%) in maniera indipendente rispetto al genotipo di ogni linea cellulare (FIGURA 2). Come valore basale abbiamo assunto i livelli di trascritto presenti in colonociti normali (linea cellulare commerciale NCM460) (FIGURA2). SMYD3 mRNA è upregolato indipendentemente da mutazioni di KRAS o di BRAF, infatti è aumentato in HCT116, SW480 e LoVo (KRAS mut/BRAF wt), in HT29 (KRAS wt/BRAF mut) ed in Caco-2 che non hanno mutazioni di nessuno dei due geni (KRAS wt/BRAF wt), mentre è espresso a livelli basali in DLD-1 e LS174T (KRAS mut/BRAF wt) (FIGURA 2).

Dato che l'obiettivo 3 prevederà il cotargeting di SMYD3 con le vie di segnalazione del CCR, abbiamo deciso di valutare anche i livelli della proteina SMYD3 (target farmacologico di inibitori come BCI-121 o di silenziamento genico con siRNA specifici) negli stessi modelli. Anche per quanto riguarda l'espressione proteica di SMYD3 nei modelli di CCR con differente status mutazionale di KRAS/BRAF abbiamo una correlazione diretta fra i livelli di espressione dell'mRNA e quelli del prodotto proteico, suggerendo che alla base dell'overespressione di SMYD3 nel CCR ci sia soprattutto un meccanismo patogenetico di incrementata trascrizione genica (FIGURA 2). Questi dati suggeriscono di testare l'inibizione di SMYD3 nel CCR in maniera indipendente da mutazioni KRAS/BRAF potendo valutare un cotargeting anche con inibitori del pathway RAS/RAF/MEK/ERK.

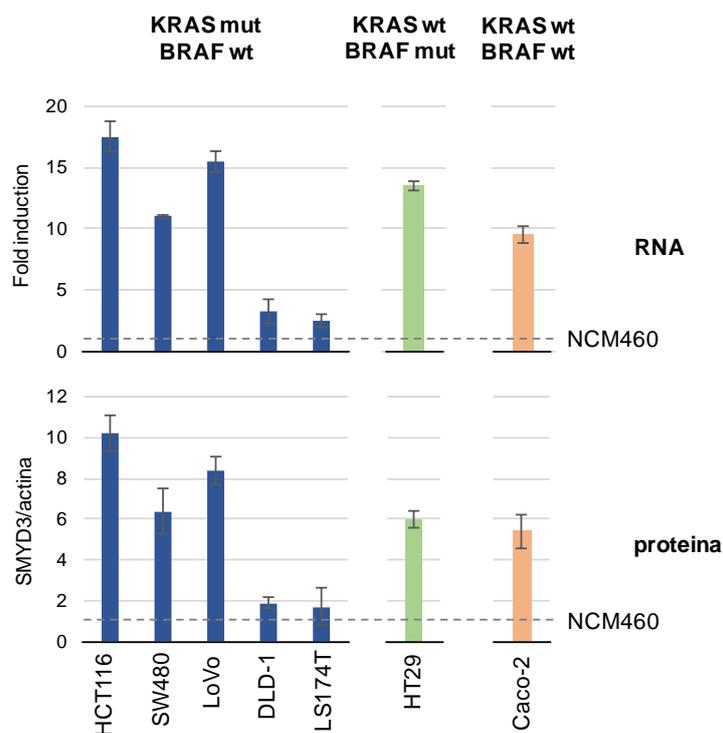


FIGURA 2: Valutazione della correlazione tra espressione di SMYD3 e mutazioni a carico di KRAS/BRAF mediante real time PCR (RNA) e immunoblot (proteina, densitometria) in linee di CCR con diverso stato mutazionale. L'analisi è stata normalizzata sui valori ottenuti nei colonociti normali NCM460.

Obiettivi specifici dello studio:

L'obiettivo dello studio è di valutare l'espressione tissutale di SMYD3 tramite immunistochimica nel colon e nello stomaco normale, displastico e neoplastico.

Successivamente valutare la correlazione tra l'espressione tissutale di SMYD3 con le caratteristiche clinico-patologiche e l'outcome dei pazienti con carcinoma colon-rettale e gastrico.

Obiettivo specifico 1:

- a. valutare la frequenza di espressione di SMYD3 nei tessuti di colon normali, displastici e neoplastici.
- b. valutare se esiste una differente espressione di SMYD3 nei tumori del colon-retto con instabilità dei micro satelliti (MSI)
- c. correlare il grado istologico e l'espressione di SMYD3 per indagare il valore prognostico di SMYD3 in pazienti con carcinoma colon rettale
- d. valutare se esiste una correlazione tra SMYD3 e le mutazioni KRAS /BRAF
- e. verificare se MSI, la mutazione KRAS/ BRAF e l'espressione di SMYD3 possano essere un fattore fortemente prognostico di sopravvivenza libera da recidiva e globale (PFS-OS) nei pazienti con carcinoma colon rettale.

Obiettivo specifico 2:

- a. valutare la frequenza di espressione di SMYD3 nel tessuto gastrico normale, displastico e neoplastico.
- b. valutare se esiste una correlazione tra SMYD3 ed HER2
- c. correlare il grado istologico e l'espressione di SMYD3 per indagare il valore prognostico di SMYD3 in pazienti con carcinoma gastrico.

Obiettivo specifico 3:

- a. l'identificazione e il co-targeting di percorsi oncogeni sinergici, che potrebbero fornire effetti molto più vantaggiosi per il trattamento del carcinoma colon rettale e gastrico

Obiettivo 1:

L'espressione e l'attività di SMYD3 è fortemente upregolata sia a livello trascrizionale che trasduzionale in numerose forme di cancro, come quello della mammella, dello stomaco, del pancreas, del colon-retto (CRC), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC). SMYD3 svolge un'importante funzione nell'aggressività del tumore e può agire come un promettente target per la previsione prognostica (prognostic prediction). Pertanto, in questa prima fase del progetto si andrà a valutare la frequenza di espressione di SMYD3 nei tessuti di colon normali, displastici e neoplastici. Successivamente si andrà a determinare se esiste una differente espressione di SMYD3 nei tumori del colon-retto con instabilità dei micro satelliti (MSI), in quanto i tumori con instabilità dei microsatelliti appaiono più responsivi alla immunoterapia rispetto ai tumori con stabilità del micro satellite. Attualmente nella nostra casistica abbiamo valutato 37 pazienti che non presentano instabilità dei microsatelliti e 26 con instabilità dei microsatelliti, se necessario andrà effettuata sul resto dei pazienti ad opera della U.O. di Genetica. Poi sarà correlato il grado istologico, le mutazioni KRAS /BRAF e l'espressione di SMYD3 per indagare il valore prognostico di SMYD3

in pazienti con carcinoma colon rettale. Infine, si andrà a verificare se MSI, la mutazione KRAS/BRAF e l'espressione di SMYD3 possano essere un fattore fortemente prognostico di sopravvivenza libera da recidiva e globale (PFS-OS) nei pazienti con carcinoma colon rettale.

Obiettivo 2:

Attualmente il carcinoma gastrico resta la seconda causa al mondo di morte per cancro. Diversi studi hanno valutato l'espressione del recettore HER-2 nel carcinoma gastrico come fattore prognostico ma tutt'oggi il ruolo risulta controverso. Pertanto, obiettivo di questo studio sarà valutare la frequenza di espressione di SMYD3 nel tessuto gastrico normale, displastico e neoplastico. E successivamente individuare una eventuale correlazione tra SMYD3 ed HER2. Infine, i livelli di espressione di SMYD3 saranno correlati con correlarla con le caratteristiche cliniche e patologiche e con l'outcome dei pazienti con carcinoma gastrico.

Obiettivo 3:

Nel complesso, i risultati del progetto proposto forniranno importanti informazioni sul ruolo di SMYD3 nell'evoluzione del carcinoma colon-retto e gastrico. Pertanto, in questa ultima fase del progetto si procederà alla identificazione ed il co-targeting di percorsi oncogeni sinergici, che potrebbero fornire effetti molto più vantaggiosi per il trattamento del carcinoma colon rettale e gastrico

Metodologie e analisi statistiche:

La valutazione dell'espressione di SMYD3 sarà effettuata con metodica immunohistochimica. I dati clinici, il grado istologico e l'espressione dei marcatori molecolari saranno analizzati con analisi statistiche adeguate allo studio: test esatto di Fisher o il test χ^2 a seconda dei casi, analisi ANOVA, test T per campioni indipendenti. Le curve di sopravvivenza saranno stimate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier, e le differenze tra di loro saranno valutate dal log-rank test di Mantel Cox. Tutte le analisi statistiche saranno effettuate utilizzando la SPSS Statistics V21.

Risultati attesi:

Ci auspichiamo con questo progetto di approfondire la comprensione del ruolo di SMYD3 nella fisiopatologia e terapia del carcinoma colon rettale e gastrico

Innovazioni:

Il nostro progetto si integra nel percorso delineato dalla più recenti progressi nella ricerca sul cancro, che prevedono lo studio di target molecolari tumore-specifici, con lo scopo di migliorare l'efficacia del trattamento e la specificità.

Bibliografia:

1. Kanwal Tariq and Kulsoom Ghias Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med.* 2016 Mar; 13(1): 120–135.
2. East JE, Saunders BP, Jass JR. Sporadic and syndromic hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colon: classification, molecular genetics, natural history, and clinical management. *Gastroenterol Clin North Am.* 2008;37:25

3. 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.
4. Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Yousfi N, Perichon M, Chaussepied M, Chluba J, Langsley
5. G, Weitzman JB. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res.* 2012 Feb 1; 72(3): 810-20. Berger et al., 2009
6. 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.
7. 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
8. Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, Nakamura Y. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet.* 2005 Oct; 37(10): 1104-7
9. Liu Y, Luo X, Deng J, Pan Y, Zhang L, Liang H. SMYD3 overexpression was a risk factor in the biological behavior and prognosis of gastric carcinoma. *Tumour Biol.* 2015 Apr; 36(4): 2685-94
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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 MAPkinasephosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Nov; 49(11): 1024-34.

Progetto n. 6: “Effetti del Regorafenib in combinazione con la Vitamina K1 e con inibitori della via IGF/IGF1-R, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano”

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D’Alessandro (biologa contrattista) e dott.ssa Maria Grazia Refolo (biologa contrattista)

Il progetto sostiene l’ipotesi che l’impiego di trattamenti combinati, in cui al Regorafenib e alla Vitamina K1, entrambi inibitori della via di trasduzione Ras/MAPK, vengono associati specifici inibitori della via del segnale IGF1/IGF1-R, abbia il doppio vantaggio di potersi avvalere di dosaggi

più bassi dei farmaci, nonché di ovviare a possibili fenomeni di resistenza. In questo modo è possibile ottenere una più efficace azione inibitoria sulla crescita e motilità di cellule di epatocarcinoma umano. Sperimentazioni da noi già effettuate hanno evidenziato che quando il Sorafenib viene combinato alla Vitamina K1, la concentrazione del farmaco richiesta per l'inibizione della crescita delle cellule tumorali risulta sostanzialmente ridotta. Inoltre, è noto che la crescita delle cellule di HCC e gli effetti degli agenti terapeutici possono essere modulati da componenti del microambiente tumorale come ad esempio le piastrine secernenti diversi Fattori di Crescita ad azione mitogena. Uno dei GFs strettamente correlato alla crescita dell'HCC è l'IGF1 il quale attraverso il suo specifico Recettore attiva il pathway biochimico coinvolto nella crescita cellulare e nella motilità. È stato valutato l'effetto di un inibitore specifico dell'IGF1-R, il GSK1838705A, sulla migrazione cellulare già inibita dal Sorafenib e dalla vitamina K1. I nostri risultati in linee cellulari di HCC dimostrano che l'impiego dell'inibitore dell'IGF1-R abbassa significativamente il tasso di migrazione oltre che causare riduzione e depolarizzazione dell'actina. I dati ottenuti sono stati oggetto di un lavoro scientifico:

- D'Alessandro R, Refolo MG, Lippolis C, Carella N, Messa C, Cavallini A, Carr BI. Strong enhancement by IGF1-R antagonists of hepatocellular carcinoma cell migration inhibition by Sorafenib and/or vitamin K1. *Cell Oncol* 2018 Jun;41(3):283-296

Alla luce di evidenze sperimentali che indicano una non completa sovrapposizione dei bersagli molecolari di Sorafenib e Regorafenib abbiamo esteso la nostra analisi anche alla determinazione degli effetti di trattamenti combinati di questi due inibitori tirosin-kinasici sulla crescita e migrazione di linee cellulari di HCC. I dati ottenuti con saggi di proliferazione, *in vitro*, dimostrano che l'azione inibitoria esercitata da bassi dosaggi di Sorafenib risulta essere potenziata quando si utilizza il farmaco in combinazione con bassi dosaggi del suo analogo Regorafenib. 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). Al fine di potenziare ulteriormente l'azione inibitoria abbiamo aggiunto al trattamento combinato Sorafenib/Regorafenib anche il GSK1838705A, quale inibitore dell'IGF1R, o il Ramucirumab, un anticorpo monoclonale antagonista specifico del recettore VEGFR2. Vi è grande interesse per l'utilizzo di questo farmaco anti-angiogenetico nella terapia dell'HCC, in quanto di recente è stato approvato dall'FDA come farmaco di seconda linea in pazienti che hanno sviluppato resistenza alla terapia di prima linea con Sorafenib e che presentano elevati livelli sierici di AFP ≥ 400 ng/ml. Pertanto, abbiamo utilizzato due linee cellulari che si caratterizzano per differenti livelli di AFP, le PLC/PRF/5 presentano infatti bassi livelli di AFP (5ng/ml) le HepG2 elevati livelli della stessa (2000ng/ml). I risultati di proliferazione e di apoptosi ottenuti evidenziano in modo chiaro che l'effetto inibitorio dovuto al trattamento Sorafenib/Regorafenib viene ulteriormente potenziato tanto dall'aggiunta di GSK1838705A quanto da quella di Ramucirumab che risulta particolarmente efficace nelle cellule HepG2. I trattamenti combinati di Sorafenib e Regorafenib risultano efficaci anche nell'inibire la motilità cellulare e anche in questo caso la triplice combinazione con GSK1838705A o Ramucirumab risulta in una inibizione quasi completa della migrazione cellulare soprattutto nelle HepG2 trattate con Ramucirumab. Abbiamo poi misurato i livelli di AFP e di DCP, un altro marcatore i cui livelli sono spesso elevati in HCC, nelle stesse condizioni sperimentali descritte per entrambe le linee cellulari. Come atteso, in entrambe le linee cellulari si osserva un abbassamento dei livelli di secrezione di AFP in seguito ai trattamenti singoli con i farmaci considerati ma gli effetti dei trattamenti combinati sono più cospicui soprattutto dopo trattamenti in cui alla combinazione Sorafenib/Regorafenib si aggiunge GSK1838705A nelle cellule PLC/PRF/5 e Ramucirumab nelle HepG2. È interessante notare come le PLC/PRF/5, al contrario delle cellule HepG2, presentano livelli maggiori di secrezione di DCP. Anche in questo caso i livelli di DCP secreto risultano particolarmente diminuiti in seguito ai trattamenti combinati Sorafenib/Regorafenib, Sorafenib/Regorafenib/Ramucirumab e soprattutto Sorafenib/Regorafenib/ GSK1838705A. Abbiamo eseguito un'analisi sullo stato di attivazione di due delle principali vie del segnale

bersaglio dell'azione dei farmaci molecolari oggetto di studio. Il trattamento combinato con due o più farmaci permette di inibire simultaneamente tanto il pathway MAPK, su cui agiscono in particolare il Sorafenib e il Regorafenib, quanto il pathway PI3K/Akt su cui agiscono in particolare l'IGF1 e il Ramucirumab potrebbe rappresentare un utile approccio al trattamento dell'HCC. Come atteso, in entrambi i tipi cellulari i livelli di fosforilazione di Erk risultano diminuiti in seguito ai trattamenti singoli con tutti i farmaci in esame, ma i decrementi maggiori si osservano in seguito al trattamento combinato Sorafenib/Regorafenib e nei triplici trattamenti tanto con il GSK1838705A quanto con il Ramucirumab. I livelli di attivazione di Akt risultano diminuiti solo di poco dopo i trattamenti singoli con Sorafenib e Regorafenib, ma i decrementi diventano maggiori dopo trattamento combinato con i due inibitori. Il GSK1838705A e il Ramucirumab non solo hanno un effetto significativo quando somministrati singolarmente ma potenziano in modo sostanziale l'azione di Sorafenib/Regorafenib. Soprattutto nelle cellule ad alto contenuto di AFP (HepG2) il decremento di P-Akt, in seguito al trattamento con Sorafenib/Regorafenib/Ramucirumab è del 60% rispetto al controllo. Questi risultati sono oggetto di un lavoro sottomesso alla rivista Journal Cell Physiology: D'Alessandro R, Refolo MG, Caterina Messa and Carr IB. "IGF1R and VEGFR2 antagonism enhance the inhibitory effect of low concentration Sorafenib and Regorafenib combination on HCC cell growth and motility"

Progetto n. 7: "Studio dei fattori molecolari predittivi di risposta e di resistenza alla terapia anti-angiogenetica con Ramucirumab e Paclitaxel nel tumore gastrico metastatico"

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D'Alessandro e dott.ssa Maria Grazia Refolo

Il progetto prevede di:

A. analizzare in modo dinamico, in 40 pazienti con carcinoma gastrico (GC) avanzato in terapia di seconda linea con Ramucirumab e Paclitaxel a seguito di progressione dopo un trattamento chemioterapico di prima linea, l'espressione dei più importanti Fattori di Crescita e Citochine coinvolti nel processo di angiogenesi correlato alla neoplasia

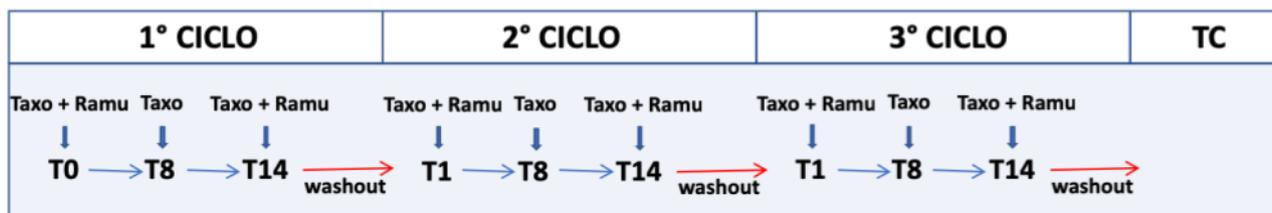
B. valutare l'espressione di specifici ncRNA (microRNA e long non-coding RNA), prima e durante il trattamento combinato di Ramucirumab e Paclitaxel.

C. studiare, in vitro, gli effetti del trattamento con il Ramucirumab o di trattamenti combinati con Ramucirumab e altri agenti chemioterapici o molecolari, sulla crescita e migrazione cellulare.

Allo stato attuale sono stati reclutati 18 pazienti afferenti all' U.O. di Oncologia del nostro Istituto e 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.

A seguito della firma del consenso informato, di ogni paziente entrato nello studio ci è pervenuto un prelievo ematico prima dell'inizio della terapia, che rappresenta il T0 (tempo di riferimento), e altri successivi durante la terapia, secondo lo schema di seguito riportato:

STUDIO DINAMICO



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 controllo di malattia 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. Per la determinazione dei livelli dei fattori di crescita e delle citochine presenti nel siero è stata utilizzata la tecnologia Bio-PlexMagPIX Suspension Array System che permette un'analisi simultanea di differenti biomolecole all'interno dello stesso campione. Nelle prime indagini sierologiche effettuate su 40 campioni in doppio derivanti da 13 pazienti, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono stati analizzati gli analiti di seguito elencati: VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, sVEGFR-1, sVEGFR-2, PDGF-AB/BB, FGF-basic, EGF, sEGFR, PLGF, sTIE-2, SCF and Angiopoietin-2 in quanto strettamente correlati al processo di neoangiogenesi tumorale. Nell'analisi abbiamo distinto due diversi gruppi di pazienti, sulla base della valutazione clinica effettuata dopo i primi tre mesi di trattamento. Un primo gruppo costituito da pazienti che mostravano progressione della malattia (gruppo A) e un secondo gruppo di pazienti che erano in controllo di malattia (gruppo B) (risposta alla terapia o malattia stabile). I risultati preliminari ottenuti per VEGFA, VEGFR2, VEGFR1 e PDGF, hanno mostrato differenze nella variazione dei livelli di espressione nel tempo tra i pazienti del gruppo A e quelli del gruppo B. Infatti, nei pazienti in controllo di malattia, si assisteva ad un aumento transitorio del VEGFA dopo la prima somministrazione di Ramucirumab seguita da livelli bassi stabili fino alla progressione della malattia, mentre nei pazienti in rapida progressione lo stesso VEGFA si presentava con un aumento rapido e progressivo. VEGFR2 e VEGFR1 hanno mostrato uno schema opposto in quanto in caso di controllo di malattia il VEGFR2 risultava diminuito, mentre il VEGFR1 presentava livelli molto bassi destinati ad aumentare durante il trattamento. Al momento della progressione il pattern dei due recettori era invertito. L'andamento del PDGF si è mostrato sovrapponibile a quello del VEGFR2 diminuendo durante il controllo della malattia e aumentando durante la progressione. Nelle sperimentazioni *in vitro* sono state analizzate quattro diverse linee cellulari di tumore gastrico (HGC-27, N87, KATO III, AGS) relativamente ai processi di crescita e motilità cellulare a seguito di trattamenti singoli o combinati con Ramucirumab e Paclitaxel. Un intervallo di concentrazioni è stato esaminato per ciascuno dei due farmaci mediante test di proliferazione cellulare valutato dopo 48 ore di trattamento. L'aggiunta del Ramucirumab ha esercitato un potente effetto inibitorio sulla proliferazione; inoltre abbiamo evidenziato che concentrazioni di Ramucirumab pari a 50 o 100 μ M (a seconda della linea cellulare in esame) erano in grado di potenziare l'effetto inibitorio di Paclitaxel abbassando la sua IC50. I valori di Combination Index (CI) calcolati per queste combinazioni di farmaci sono risultati ben al di sotto della linea di additività ($CI \leq 1$), dimostrando che un'azione sinergica dei due farmaci è probabilmente alla base degli effetti riscontrati sulle linee cellulari. Il ruolo del Ramucirumab nel potenziamento degli effetti esercitati dal Paclitaxel è stato confermato anche nel processo apoptotico, altro aspetto che bilancia la proliferazione nel processo di crescita cellulare, e nella migrazione indagata su diverse matrici. Sono in corso sperimentazioni volte alla comprensione dei meccanismi alla base dell'azione sinergica esercitata dalla combinazione Ramucirumab e Paclitaxel. In particolare, saranno indagate le principali cascate di segnale bersaglio dei farmaci in esame come MAPK e PI3K/Akt/mTOR.

Progetto n. 8: “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”

Responsabile: Dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: dott. Dionigi Lorusso, dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott.ssa Valeria Tutino, sig.na Valentina De Nunzio).

Gli obiettivi del suddetto progetto erano non solo l’individuazione di profili lipidici di membrana caratteristici, ma anche il tentativo di associare l’analisi lipidomica allo studio dei recettori degli endocannabinoidi (CB1 e CB2) al fine di comprendere i meccanismi molecolari che sono alla base di eventuali alterazioni o cambiamenti metabolici associati allo stato di malattia.

La valutazione della composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana cellulare associata allo studio dei recettori degli endocannabinoidi nei tessuti degli stessi pazienti risulta importante per acquisire informazioni sullo loro stato nutrizionale ed infiammatorio che consentono di progettare formulazioni nutraceutiche protettive.

Ad oggi, nell’ambito del Progetto, sono stati reclutati 65 soggetti sui quali è stata fatta l’analisi lipidomica sulle membrane dei globuli rossi e sul tessuto colico prelevato in sede di intervento chirurgico. Lo studio del profilo lipidomico ha dimostrato che i pazienti con metastasi sincrone presentavano livelli più bassi di acido eicosapentanoico (EPA) e livelli molto più alti di acido gamma-linoleico (GLA), un acido grasso poliinsaturo omega-6 e un più alto rapporto Omega-6/Omega-3.

Analisi Lipidomica sui globuli rossi:

	Soggetti con CRC		p-value °
	No Metastasi	Metastasi	
SFA	55.02±6.2	53.7±8.3	0.92
MUFA	22.02±3.8	21.11±4.1	0.81
PUFAs	23.94±5.6	25.1±3.9	0.75
n6/n3	4.5±1.6	4.6±1.2	0.52
Stearic acid	21.5±4.6	22.3±6.71	0.85
Oleic acid	12.7±2.3	12.9±3.2	0.95
SI *	1.9±0.5	2.2±1.4	0.88
GLA	0.03±0.1	0.09±0.2	0.25
EPA	0.44±0.58	0.53±0.3	0.70
DHA	2.76±1.5	2.8±1.4	0.96

SFA= acidi grassi saturi; MUFAs= acidi grassi monoinsaturi; PUFAs= acidi grassi polinsaturi; GLA= acido gamma-linolenico; EPA= acido eicosapentanoico; DHA= acido docoesanoico; * Saturation Index (stearic acid/oleic acid ratio); °Wilcoxon rank-sum (Mann Whitney) test; I valori sono espressi come Media ± Deviazione Standard

Analisi lipidomica su tessuto colico

	Mucosa normale			Tumore		
	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

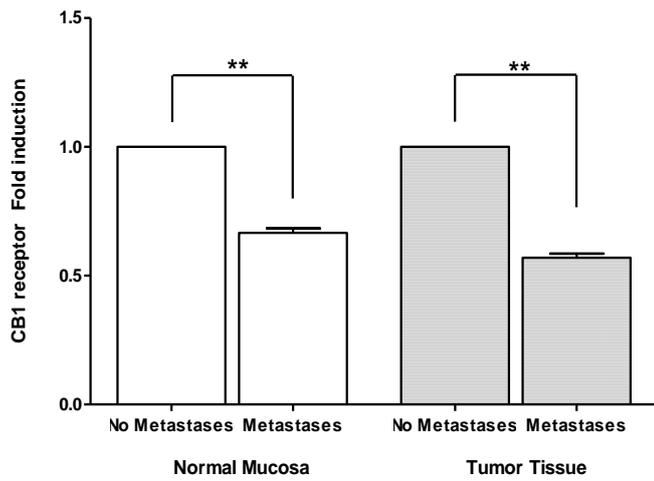
SFA= acidi grassi saturi; MUFAs= acidi grassi monoinsaturi; PUFAs= acidi grassi polinsaturi; GLA= acido gamma-linolenico; EPA= acido eicosapentanoico; DHA= acido docoesanoico; * Saturation Index (stearic acid/oleic acid ratio); °Wilcoxon rank-sum (Mann Whitney) test; I valori sono espressi come Media ± Deviazione Standard

Il suddetto Progetto prevedeva anche lo studio dell'espressione dei recettori CB1 e CB2 che svolgono sicuramente un ruolo importante nella regolazione della proliferazione cellulare e di conseguenza nella patogenesi del cancro. Il recettore CB1 è un modulatore negativo della proliferazione nel cancro del colon-retto, il recettore CB2 ha invece un'azione anti-infiammatoria.

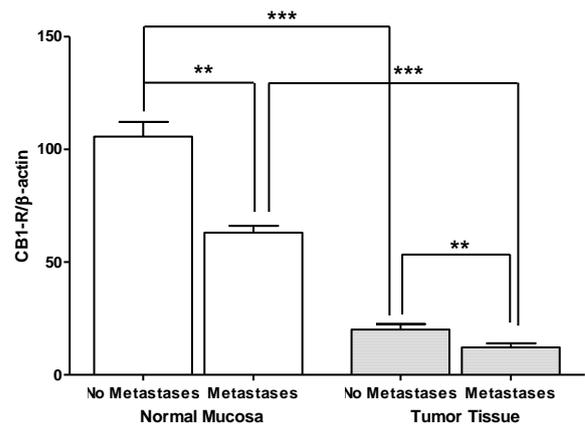
Lo studio ha dimostrato una significativa riduzione dell'espressione genica e della proteina dei due recettori CB1 e CB2 nel tumore, rispetto alla mucosa sana circostante la neoplasia. Inoltre, i pazienti con metastasi sincrone presentavano livelli di recettori molto più bassi rispetto ai soggetti senza metastasi. Di conseguenza, negli stessi campioni, abbiamo dimostrato significativi cambiamenti nell'espressione dei principali geni (MAPK-p38, ERK e Akt) che sono alla base dell'azione dei due recettori nel tratto gastrointestinale. I dati ottenuti confermano il ruolo "protettivo" del recettore CB1 e CB2 nel tessuto intestinale e che la loro espressione è necessaria per una corretta regolazione della proliferazione cellulare.

Nei grafici che seguono viene mostrata l'espressione dei recettori CB1 e CB2, sia come mRNA che come proteina, nei soggetti con e senza metastasi (**P=0.02, ***P= 0.001)

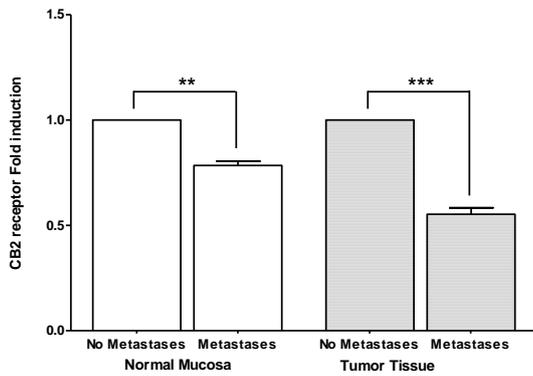
Recettore CB1 (livelli di mRNA)



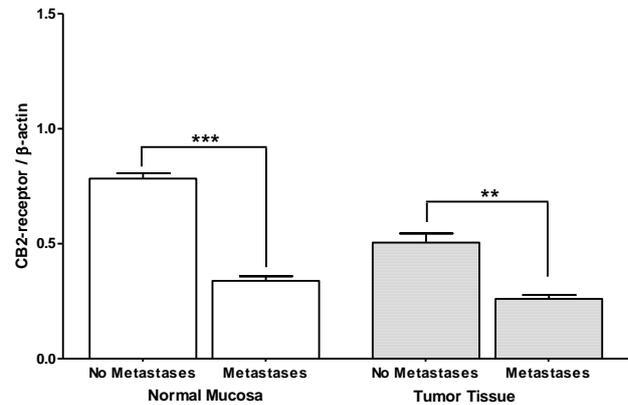
Recettore CB1 (livelli di proteina)



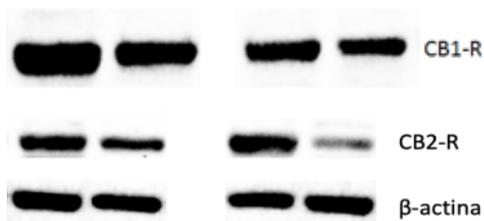
Recettore CB2 (livelli di mRNA)



Recettore CB2 (livelli di proteina)



Un rappresentativo western blotting del recettore CB1 e CB2 nei campioni studiati:



LINEA 2

MEDICINA PREVENTIVA/PREDITTIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 2 “Medicina preventiva/predittiva in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2018 sono i seguenti:

Progetto n. 9: “L’attività di SMYD3 come bersaglio terapeutico nel trattamento delle neoplasie gastroenterologiche con alterazione dei pathways RAS e TGF- β ”

Responsabile: Prof. Cristiano Simone

Partecipanti: dott. Francesco Dituri, dott.ssa Candida Fasano, dott.ssa Giovanna Forte, dott.ssa Annarita Chieti

Background:

La cancerogenesi è un processo complesso e articolato, che culmina nella trasformazione di una cellula normale in cellula neoplastica a causa dell’alterata regolazione di meccanismi genetici, epigenetici e di trasduzione dei segnali intracellulari.

Negli ultimi anni, i ricercatori oncologici di tutto il mondo sono concentrati nell’identificazione di nuove molecole nodali di pathways cancro specifici, per individuare possibili target molecolari contro cui sviluppare terapie più mirate e meno tossiche. In questo scenario assume sempre più rilievo il ruolo svolto dalla proteina SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi e di progressione tumorale.

Questa proteina, infatti, risulta overespressa in numerose forme di cancro, come quello della mammella, dello stomaco, del pancreas, del colon-retto (CCR), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC) (Luo XG, et al. 2014, Hamamoto et al., 2004, 2006; Tsuge et al., 2005; Liu et al., 2015; Mazur et al., 2014).

SMYD3 è un’istone di- e tri-metiltransferasi, appartenente alla famiglia delle “SET domain proteins”, cioè proteine caratterizzate dal dominio funzionale SET altamente conservato in tutte le istone metiltransferasi (Foreman et al., 2011). La funzione biologica più nota di questo enzima è la metilazione della lisina 4 dell’istone H3. Tuttavia, recenti saggi di legame e metilazione in vitro hanno identificato come substrato preferenziale di questa metiltransferasi, l’istone H4. Questo dato è stato validato in colture cellulari in cui il mantenimento del fenotipo tumorale dipende dalla metilazione di H4K5 catalizzata da SMYD3 (Van Aller et al., 2012).

Fino a qualche anno fa, l’effetto oncogenico di SMYD3 veniva spiegato esclusivamente sulla base della metilazione di proteine istoniche, evento scatenante l’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).

A differenza di quanto accade nelle cellule neoplastiche, nelle cellule normali SMYD3 non sembra essere indispensabile per lo sviluppo, la proliferazione e la sopravvivenza cellulare. Infatti, topi KO condizionali omozigoti per SMYD3, sia maschi che femmine, non mostrano anomalie significative dopo la piena fenotipizzazione (www.sanger.ac.uk/mouseportal/search?query=smyd3). Tuttavia, anche in cellule normali l’overespressione di SMYD3 è sufficiente ad accelerare la crescita cellulare e ad attivare dei geni di pathways coinvolti nella trasformazione delle cellule tumorali e nella loro migrazione (Cock-Rada et al., 2012; Luo et al., 2014).

Dati sperimentali più recenti hanno spostato il focus di studio sulla correlazione tra cancerogenesi e metilazione di proteine non istoniche dimostrando che l’attività oncogenica di SMYD3 è anche collegata ad interazioni funzionali con proteine non istoniche come ad esempio VEGFR1 (Recettore

1 del fattore di crescita vascolare endoteliale) ed ER (recettore degli estrogeni) che regolano la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Il coinvolgimento di SMYD3 in pathways deregolati di proteine non istoniche è un meccanismo tessuto specifico, infatti, la metilazione di VEGFR1 mediata da SMYD3, potenzia l'attività chinasi di questo recettore in tutte le cellule tumorali, ma specialmente in quelle di cancro del seno, dove VEGFR1 metilato agisce come co-attivatore di ER (Biggar and Li 2014; Kunizaki et al., 2007; Kim et al., 2009).

Anche nel cancro del colon retto (CCR) e nell'epatocarcinoma (HCC) appare evidente la centralità di SMYD3 in pathways proliferativi, come dimostrato dagli studi condotti su modelli preclinici, ovvero in topi KO per SMYD3 in cui sono stati indotti tumori gastroenterologici (del colon e del fegato). In questi modelli KO si è osservata regressione tumorale, al contrario di quanto accadeva in topi wt dove SMYD3 potenzia la trascrizione e quindi l'espressione di molti oncogeni, tra cui c-myc, β cat, stat3 e tutti i geni della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) alla base della trasformazione epatica maligna (Sarris et al. 2016).

Nonostante la correlazione esistente tra la deregolazione di SMYD3 e la tumorigenesi, i meccanismi alla base della modulazione di SMYD3, e della sua funzione attivatoria della proliferazione incontrollata delle cellule tumorali, non sono stati ancora completamente chiariti. In letteratura è stato riportato che il silenziamento di SMYD3 limita considerevolmente la proliferazione cellulare nel CCR, nell' HCC, nel fibrosarcoma e nel carcinoma alla mammella (Hamamoto et al., 2004, 2006; Cock-rada et al., 2012; Guil et al., 2012).

Queste osservazioni preliminari suggeriscono che SMYD3 sia coinvolto nella deregolazione del ciclo cellulare ovvero, in una delle fasi più critiche della carcinogenesi.

Una vasta letteratura riporta la stretta correlazione tra un'upregolazione di SMYD3 e la cancerogenesi in diversi organi. Nel CCR mutazioni dell'oncogene KRAS sono correlate con l'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 fosfoattivazione di AKT, mediante la metilazione di un residuo specifico (Yoshioka Y, et al., 2016).

Stato di avanzamento del progetto:

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

-Clonaggio e mutagenesi di costrutti di SMYD3:

I costrutti per l'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)*, delecto 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'inserito 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 da 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 di colon HT29, è stata verificata anche mediante esperimenti di overespressione delle due proteine wt, attraverso saggi di co-immunoprecipitazione, per confermare la positività dell'interazione riscontrata nell'analisi su proteine endogene ed escludere possibili aspecificità 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 tag 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 cellulari diverse, due di cancro del colon-retto (HT29, HCT116) ed una linea di cellule normali embrionali di rene, ovvero un modello cellulare di linea continua normale comunemente utilizzata in questi esperimenti per via della loro capacità di essere altamente trasfettabili (HEK293). (Figura A)

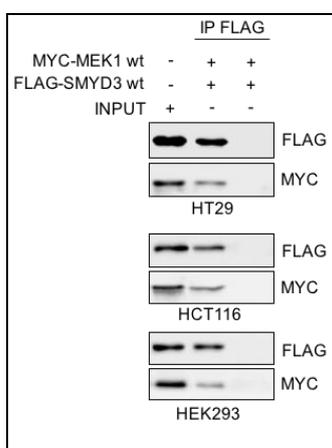


Figura A: Co-immunoprecipitazione di FLAG-SMYD3 wt e MYC-MEK1 wt in cellule HT29, HCT116 ed HEK293.

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).

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

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

-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 Glutatione-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.

Sebbene non abbiamo trovato evidenza di metilazione diretta su MEK1 da parte di SMYD3, stiamo approfondendo il meccanismo con cui l'attività di SMYD3 influenza le vie dipendenti da MEK1. A tal fine abbiamo co-trasfettato le cellule HCT116 di CCR con il costrutto FLAG-SMYD3 (intero) or FLAG-SMYD3- Δ SET (deleto, cioè privo del dominio SET) e MEK1-Myc-tag. La via MEK/ERK è stata modulata mediante aggiunta e deprivazione di siero o di EGF (noti stimoli attivatori della cascata MEK/ERK), e regolata negativamente mediante gli inibitori di MEK1.

Quindi per investigare su come SMYD3 influenza l'attività di MEK1, abbiamo analizzato mediante immunoblotting la fosfoattivazione di MEK1, ERK e le proteine a valle della loro via di segnalazione (MEK/ERK). In accordo con quanto si è osservato inibendo MEK1 con trametinib, i nostri risultati mostrano che in presenza di BCI-121 (inibitore di SMYD3) o di FLAG-SMYD3- Δ SET (enzimaticamente inattivo), anche stimolando la crescita cellulare con siero e/o EGF le cellule non sono in grado di fosfo-attivare ERK (Peserico et al., JCP). È importante sottolineare che, in accordo con i nostri risultati preliminari, la fosfo-attivazione siero e/o EGF-dipendente di MEK1 non è stata influenzata dall'aggiunta di BCI-121 (Peserico JCP) o dall'espressione della forma enzimaticamente inattiva FLAG-SMYD3- Δ SET. Questi ultimi dati nelle cellule di CCR differiscono dai dati succitati ed ottenuti da Mazur e colleghi nelle linee di cellule tumorali polmonari (A549) e pancreatiche (LKR10). Infatti, questi autori hanno dimostrato che SMYD3 potrebbe regolare l'attività MAP3K2 (una chinasi alternativa nella via RAS che può fosforilare MEK1) mediante metilazione diretta la K260, bloccando così l'associazione con il complesso fosfatasi PP2A e prevenendo la defosforilazione di MEK1.

Tuttavia, questi autori hanno anche osservato effetti diversi in una seconda linea cellulare di cancro al pancreas (CFPac1), dove l'ablazione genetica di SMYD3 ha impedito l'attivazione di ERK EGF-dipendente, ma non la fosfo-attivazione di MEK1 (Mazur et al., Nature). Presi insieme, questi dati suggeriscono che la modulazione mediata da SMYD3 della via di RAS coinvolge diversi meccanismi che operano a monte di ERK e che influenzano la regolazione del complesso di MEK1 con variabilità e specificità inter- e intra-tissutale.

RISULTATI CONSEGUITI NEL TERZO ANNO DI PROGETTO DALL'UNITÀ 1

Fase 1C-D. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo (c) e caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras (d).

In questa fase abbiamo iniziato a studiare il ruolo di SMYD3 nella via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK attraverso l'uso di tipici saggi di tumorigenesi (colony formation assay, MTT e WST) in linee cellulari di cancro del colon-retto con differente background genetico e alta espressione proteica di SMYD3. Infatti, abbiamo caratterizzato le linee di CCR secondo le caratteristiche fenotipiche di instabilità dei microsatelliti (MIN) o instabilità cromosomica (CIN), e genotipiche come lo stato mutazionale dei principali geni coinvolti nella cancerogenesi del colon-retto (KRAS, BRAF, APC, b-catenin, p53, PI3KCA). Tutte le linee cellulari sono state indotte a proliferare *in vitro* e poi trattate con l'inibitore farmacologico di SMYD3, BCI-121, oppure sono state silenziate mediante siRNA specifici per SMYD3. Dopo i trattamenti le cellule sono state analizzate sia per immunoblot, per valutare la propagazione della via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK, che per saggi di proliferazione (WST-1). La nostra analisi ha rivelato che indipendentemente dal fenotipo (CIN vs MIN) e dal genotipo (wild type o mutazioni di KRAS,

BRAF, APC, b-catenin, p53, PI3KCA) tutte le linee di CCR che overesprimono SMYD3 sono sensibili alla sua inibizione farmacologica o ablazione genetica mediante siRNA. La caratterizzazione molecolare mostra come l'inibitore farmacologico BCI-121 sia in grado di bloccare la trasmissione del segnale da MEK verso ERK, stesso effetto ottenuto con l'ablazione genetica di SMYD3 mediante siRNA specifici, infatti in tutte le linee viene impedita la fosforilazione di ERK (FIGURA B). Non solo, anche la valutazione della proliferazione ha mostrato come tutte le linee con alta espressione proteica di SMYD3 siano sensibili sia alla sua inibizione farmacologica che alla sua ablazione genetica (FIGURA B). Infatti, le linee HT29, Caco-2 e SW480 presentano instabilità cromosomica (CIN) mentre le HCT116 presentano instabilità dei microsatelliti (MIN), così come le HT29, le HCT116 e le SW480 hanno mutazioni di BRAF o di KRAS mentre le Caco-2 sono wild type per entrambi i geni. Stesso discorso vale per lo status mutazionale dei restanti geni APC, b-catenin, p53 e PI3KCA (FIGURA B). E' importante sottolineare come altre linee di CCR, sia con fenotipo CIN che MIN e status mutazionale vario, ma con bassa espressione proteica di SMYD3 non sono risultate sensibili né alla sua inibizione farmacologica né alla sua ablazione genetica (es. LS174T, DLD-1, ...).

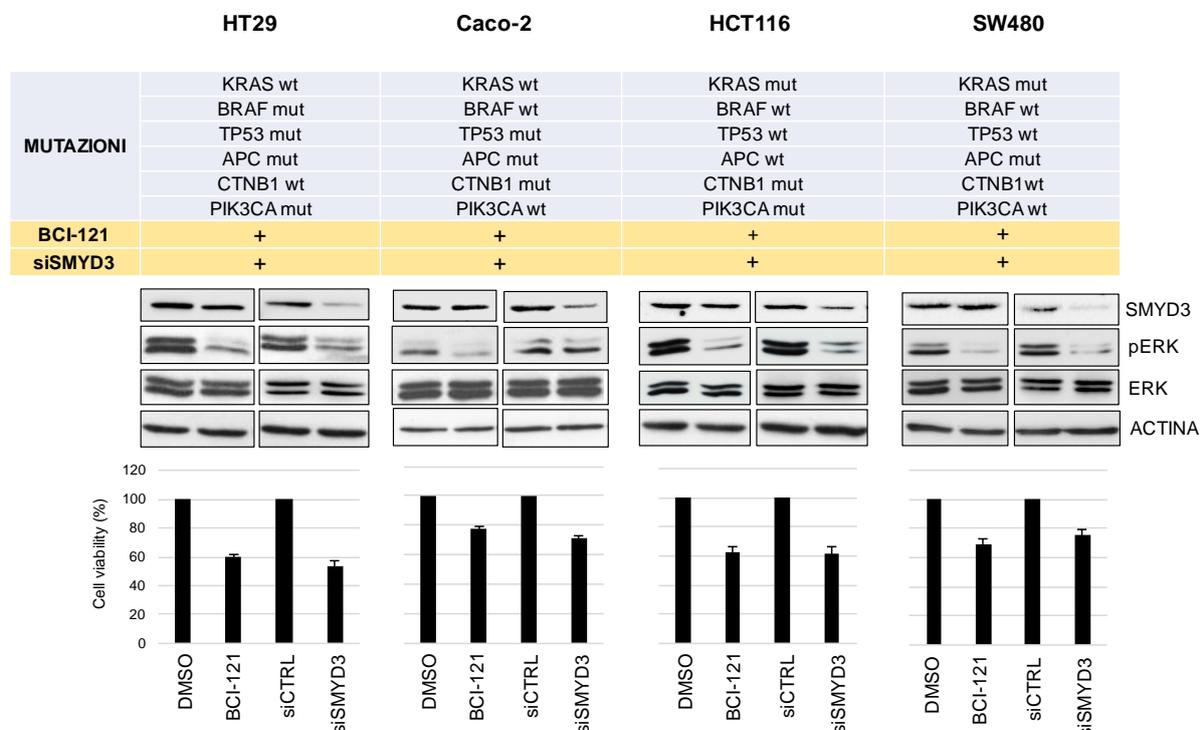


Figura B: Valutazione del ruolo di SMYD3 nella regolazione della via di segnalazione RAS/RAF/MEK/ERK in linee cellulari di cancro del colon-retto con differente background genetico. Analisi per immunoblot di SMYD3, della fosfoattivazione di ERK e saggio di vitalità WST-1 in cellule silenziate per SMYD3 o trattate con l'inibitore BCI-121.

ATTIVITÀ UNITÀ 2 (U2)

Fase 2a. Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.

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 C)

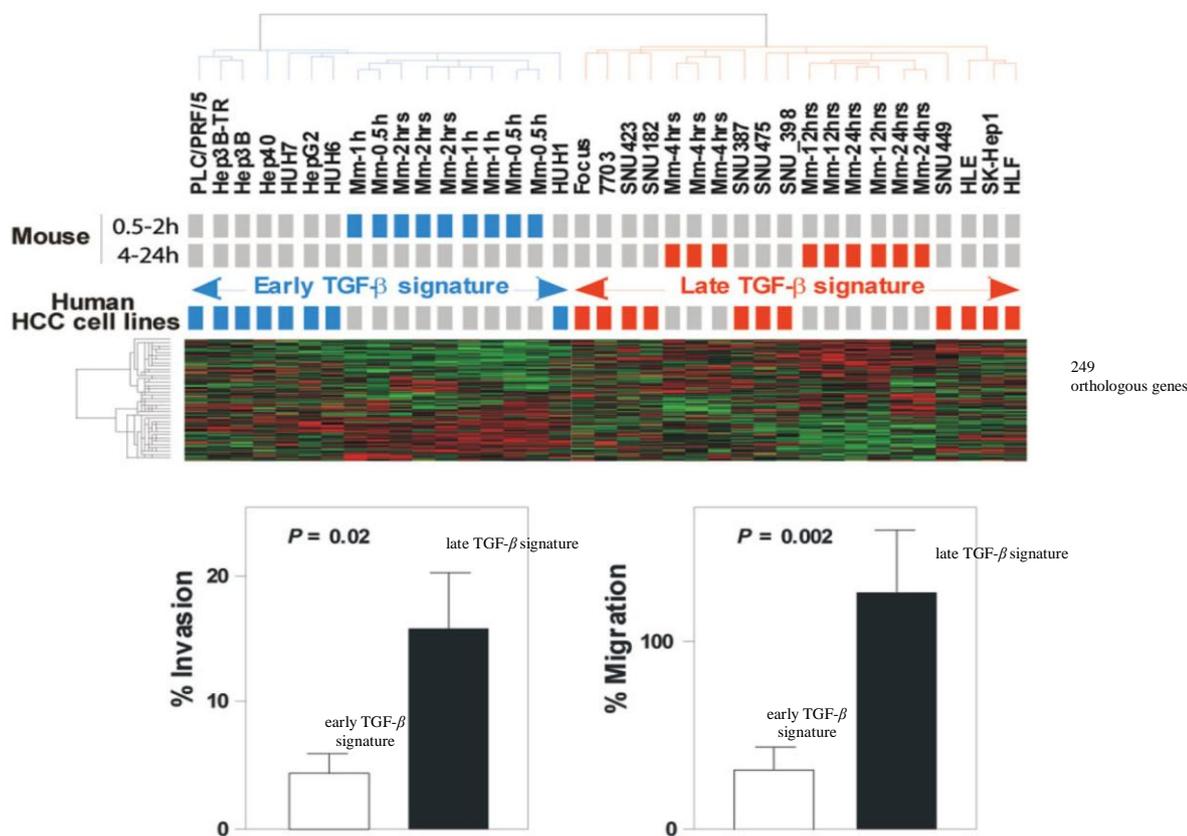


Figura C. HCC PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2 (early signature) e HLE e HLF (late signature) (Coulouarn C et al. Hepatology 2008)

Abbiamo determinato se l'attivazione del pathway del TGFβ altera l'espressione di SMYD3 in cellule HCC early e late TGFβ signature per delineare eventuali differenze nell'effetto della citochina sull'espressione di SMYD3 nei 2 fenotipi cellulari. In Figura C si osserva un'induzione in modo dose-dipendente dell'espressione di SMYD3 (a livello di mRNA e proteina) da parte dello stimolo con TGFβ per 48 ore sia in cellule early (PLC/PRF/5), che late (HLE e HLF). Abbiamo quindi valutato gli effetti del trattamento con TGFβ1 sull'espressione di SMYD3 in linee HCC early (PLC/PRF/5, Hep3B ed HepG2) e late (HLE e HLF) a tempi più lunghi (48, 72 e 96 ore) questa volta in presenza o meno dell'inibitore del recettore I del TGFβ (TGFBR1), LY2157299 (galunisertib). Il galunisertib inibisce l'espressione di SMYD3 e annulla l'effetto del TGFβ1 nelle linee PLC/PRF/5, HLE e HLF. Nelle linee Hep3B e HepG2 l'effetto della citochina e dell'inibitore risulta piuttosto controverso. (Figura D) Successivamente è stata testata la proliferazione delle stesse cellule, silenziate o non per SMYD3, in assenza o presenza di TGFβ1, galunisertib, o entrambi. Il TGFβ1 esercita un effetto complessivamente inibitorio sulla proliferazione di cellule HCC con early o late TGFβ signature (PLC/PRF/5 e HLE rispettivamente). Il silenziamento di

SMYD3 accresce l'effetto inibitorio del TGF β su cellule HLE, ma non PLC/PRF/5 (Figura D).

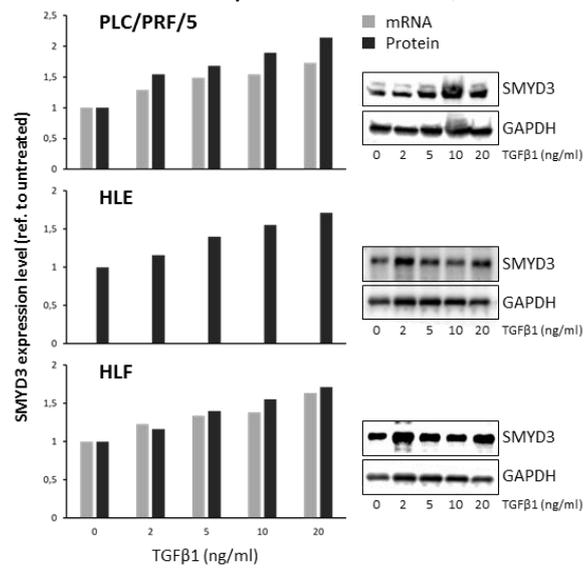


Figura D. Il TGF β accresce l'espressione di SMYD3 (a livello di mRNA e proteina) in cellule di HCC.

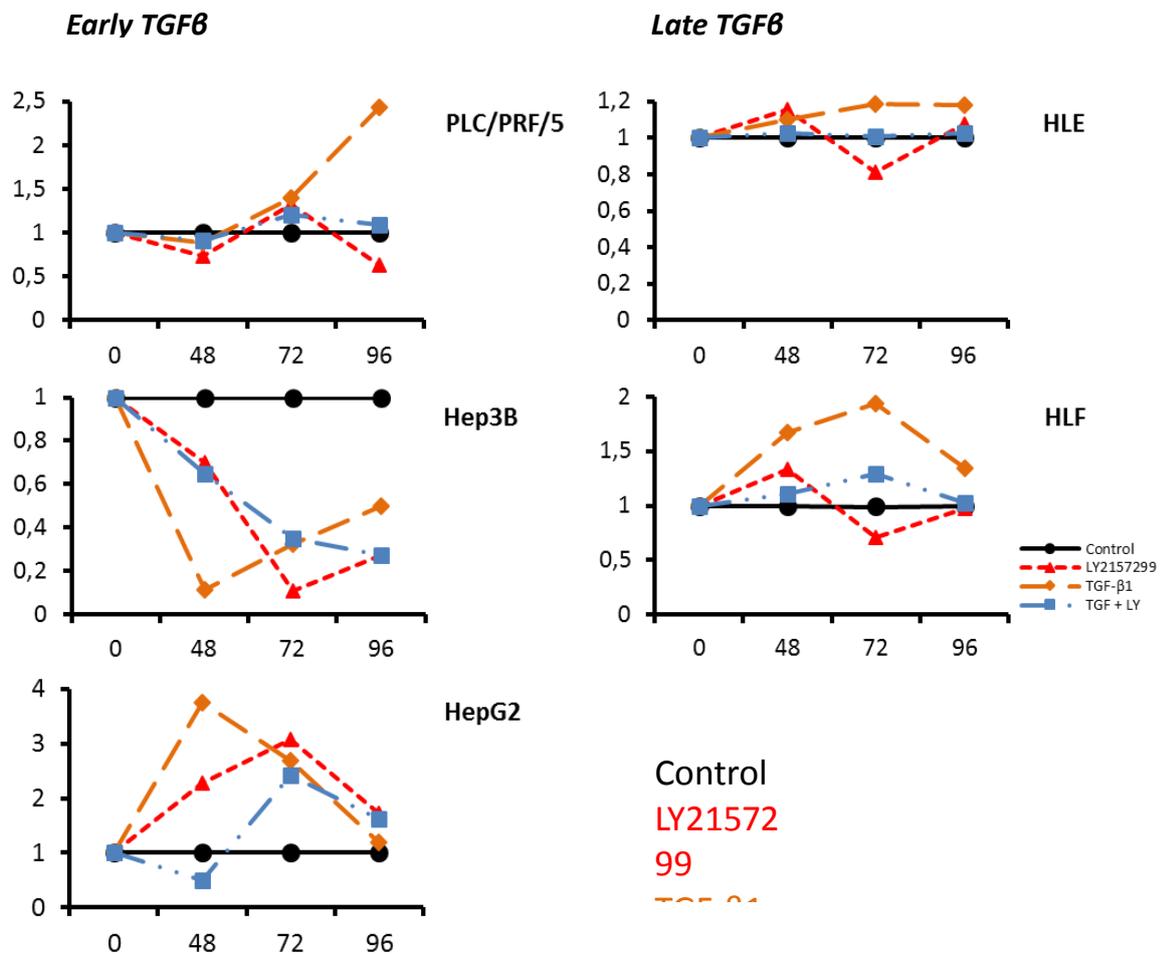


Figura E. Time course dell'espressione di SMYD3 (mRNA) in cellule HCC *early* e *late* TGFβ signature.

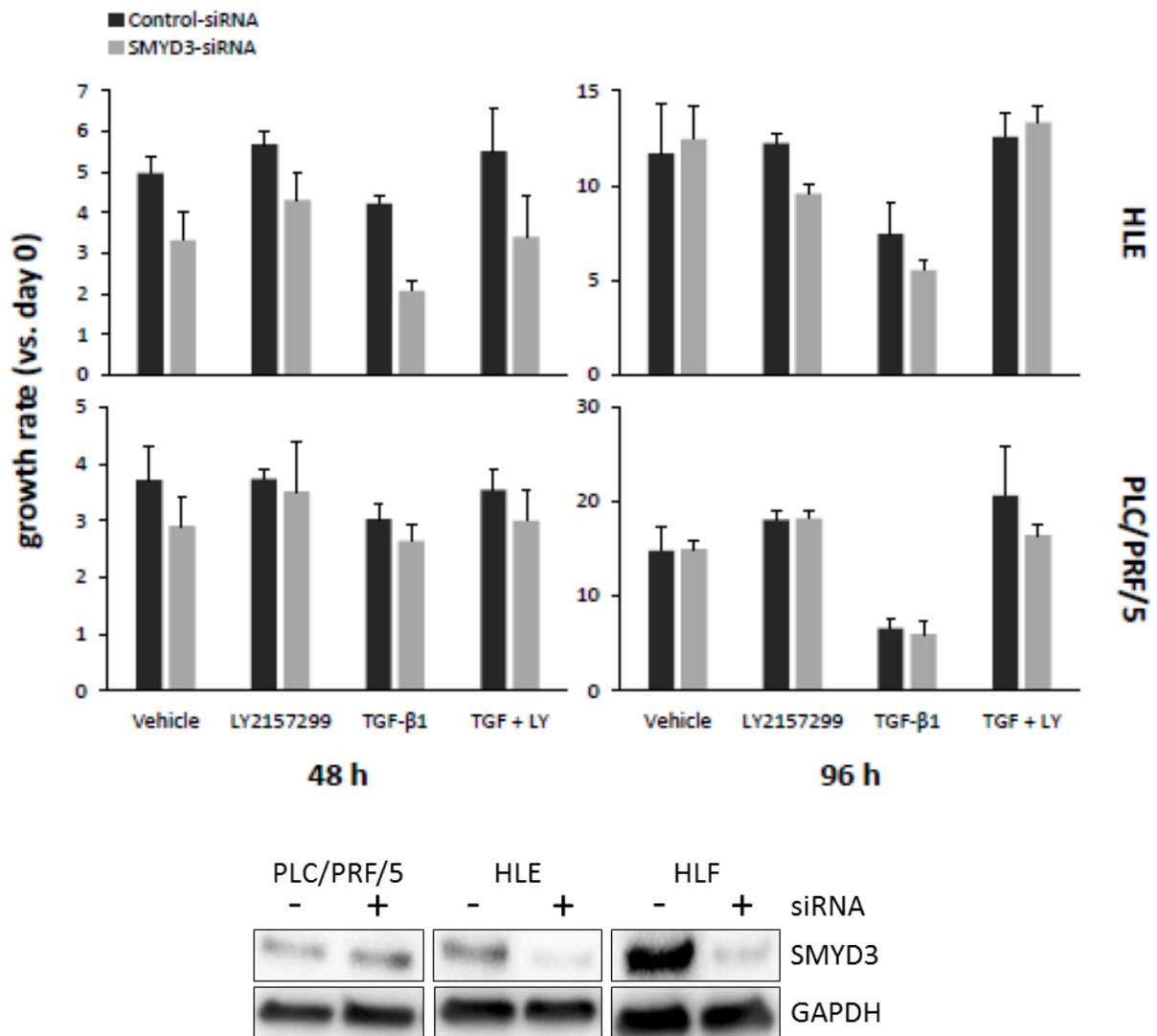


Figura F: (sopra) Saggio di proliferazione di cellule HLE (late TGFβ signature), e cellule PLC/PRF/5 (early TGFβ signature) silenziate per SMYD3, e trattate con TGF-β1 e/o LY2157299 (galunisertib); *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. (sotto) Efficienza del silenziamento di SMYD3 in cellule PLC/PRF/5, HLE e HLF (western blot).

Abbiamo determinato i livelli di espressione di SMYD3 in tessuti tumorali e peritumorali di HCC umano (Figura G). L'espressione di SMYD3 è significativamente più alta nel tumore che nel circostante tessuto peritumorale.

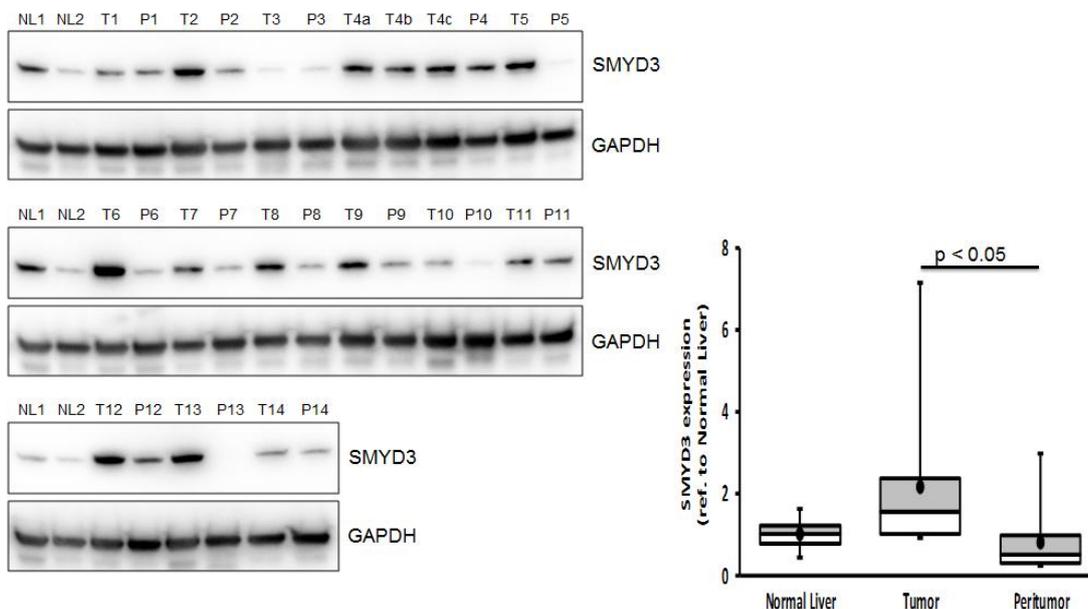


Figura G. Espressione di SMYD3 in tessuti HCC umani tumorali e peritumorali (western blot).

Poiché è stato determinato che SMYD3 occupa regioni di genoma in cui sono presenti molti promotori di oncogeni (Sarris et al., Cancer Cell 2016), è stata analizzata l'espressione trascrizionale di questi geni in cellule HCC silenziate e non per SMYD3. L'analisi ha rivelato che il silenziamento di SMYD3 in cellule PLC/PRF/5 (early TGFβ signature) e HLE e HLF (late TGFβ signature) induce una riduzione dell'espressione di un set di geni promotori di carcinogenesi, alcuni dei quali promotori della transizione epitelio-mesenchimale (EMT) (Figura H). Pertanto, la funzione di SMYD3 potrebbe essere importante per la regolazione trascrizionale di numerosi oncogeni coinvolti nella regolazione della EMT durante la carcinogenesi epatica.

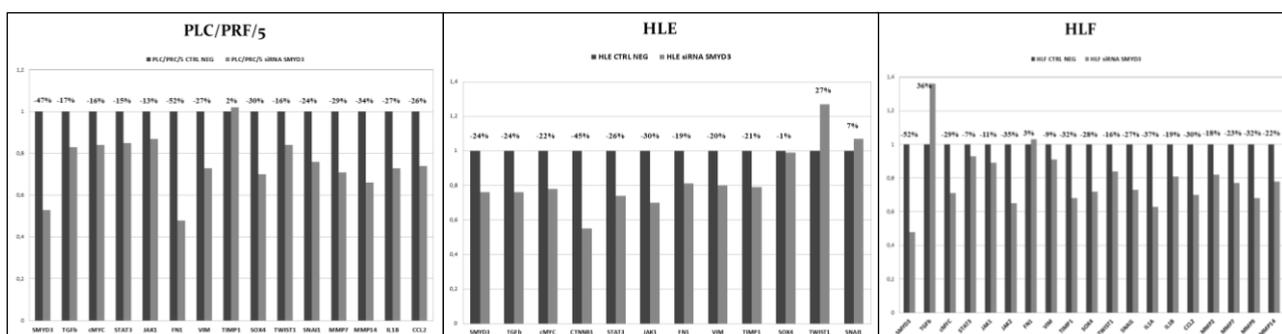


Figura H. Effetto del silenziamento di SMYD3 sull'espressione del mRNA di oncogeni/geni EMT in cellule HCC.

RISULTATI CONSEGUITI NEL TERZO ANNO DI PROGETTO DALL'UNITÀ 2

Per determinare gli effetti biologici dell'interazione tra il pathway del TGFβ e l'attività di SMYD3 sono stati testati in combinazione l'inibitore del recettore I del TGFβ (LY2157299, o galunisertib, abbrev. LY) e l'inibitore dell'attività metilasi di SMYD3 (BCI121) in saggi di proliferazione e

migrazione di cellule HCC. Il galunisertib e BCI121 non sono risultati inibire la proliferazione di cellule HLE e PLC/PRF/5 sia individualmente che in combinazione (Figura I). Tuttavia sono efficaci nell'inibire la capacità migratoria delle stesse cellule, sia basale, che potenziata dall'effetto pro-migratorio del TGF β . (Figura L)

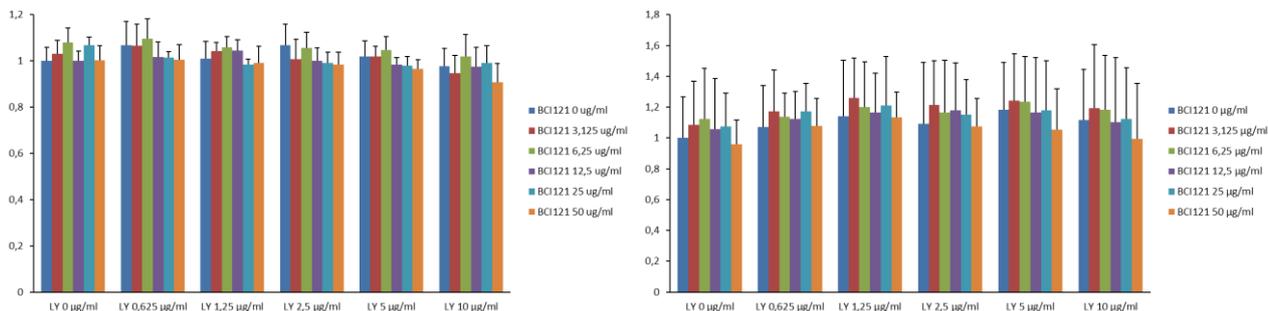


Figura I. L'inibizione combinata del TGFBR1 e di SMYD3 non ha effetti sulla proliferazione di cellule HCC HLE (sinistra) e PLC/PRF/5 (destra).

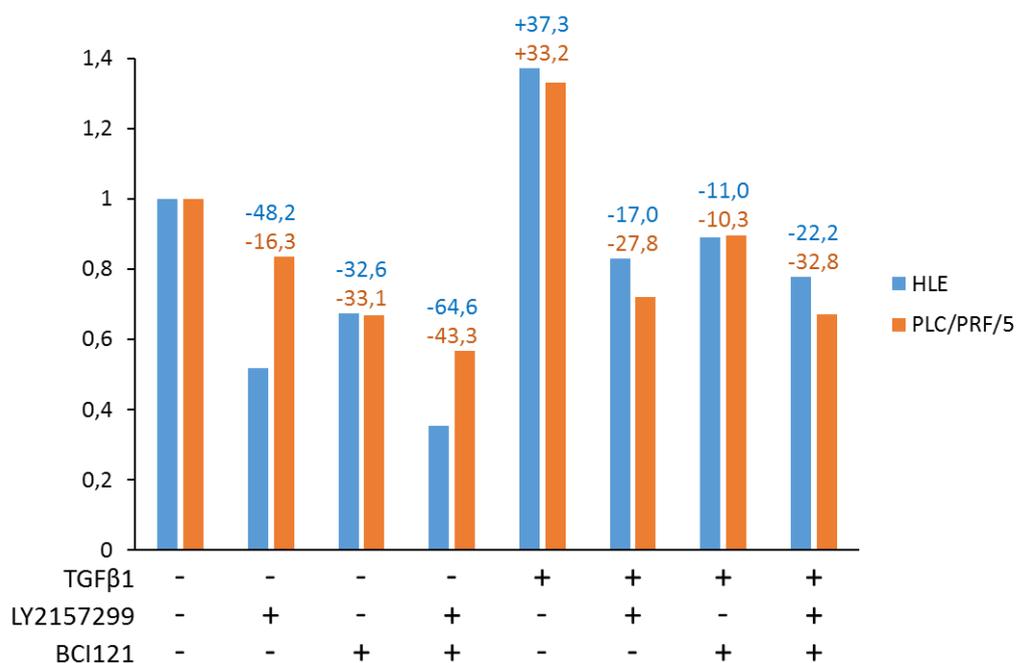


Figura L. Effetto cooperativo dell'inibizione dell'attività metilasi di SMYD3 e del pathway del TGF β sulla migrazione di cellule HCC. Le percentuali di inibizione della capacità migratoria rispetto alle cellule non trattate sono indicate.

Obiettivi specifici dello studio da programmazione iniziale:

Gli studi sopra riportati aprono la strada per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari che correlano le funzioni molecolari di SMYD3 alle proteine non istoniche, sia nel compartimento citoplasmatico che in quello nucleare.

Perseguendo questo scopo nel presente progetto ci proponiamo di analizzare in dettaglio il ruolo di SMYD3 nei pathway di RAS e TGF- β deregolati rispettivamente nel cancro del colon retto, nell'epatocarcinoma e nel colangiocarcinoma.

A tal fine, questa proposta progettuale verrà articolata in due fasi, incentrate sulla caratterizzazione dell'interazione di SMYD3 con MEK1 e con TGF- β , due proteine cruciali dei pathway cancro specifici del cancro del colon retto, nell'epatocarcinoma e nel colangiocarcinoma.

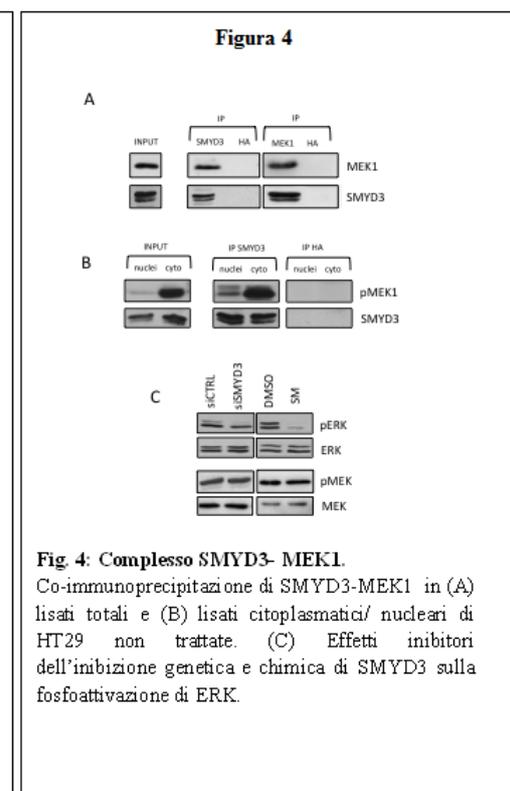
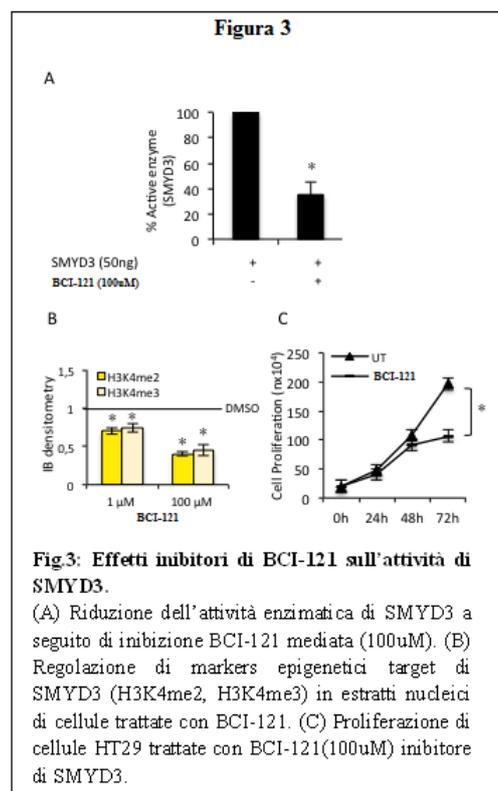
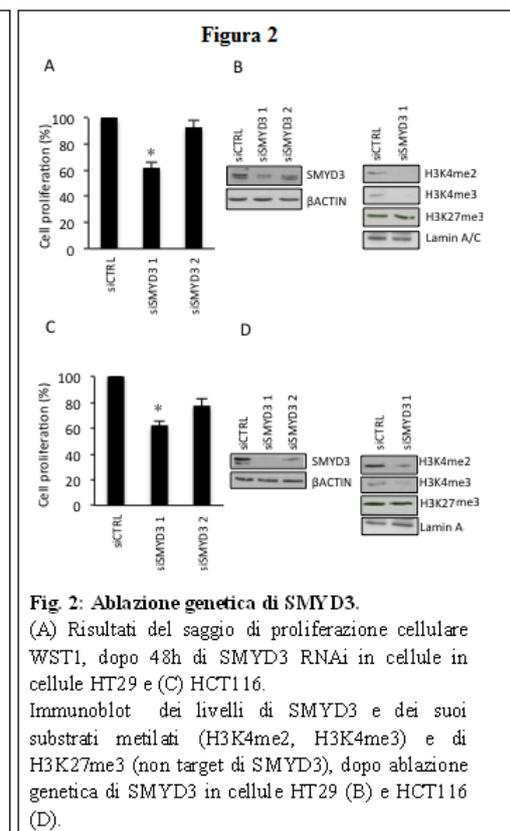
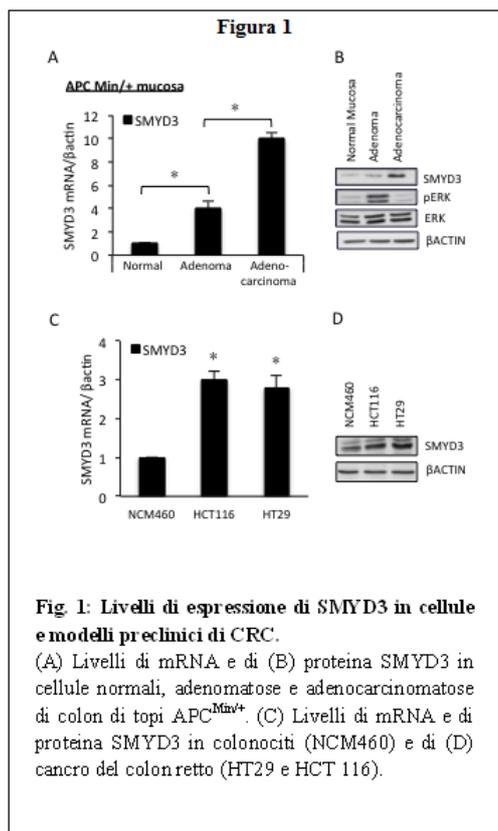
Obiettivo specifico 1: Il primo obiettivo del presente studio sperimentale, sarà caratterizzare in linee cellulari di CCR (HT29, HCT116, CaCO2, LS174T, SW80) l'interazione di SMYD3 con proteine non istoniche, e soprattutto la funzionalità biologica del complesso SMYD3/MEK1.

Obiettivo specifico 2: Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β . Il pathway TGF- β gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'Epatocarcinoma. In questi tumori, SMYD3 si accumula nella frazione nucleare durante la fase G2/M del ciclo cellulare, e la sua ablazione genetica causa una riduzione nella progressione verso la mitosi. Inoltre, recenti dati di letteratura indicano che SMYD3 correla con TGF- β in pazienti con cancro gastrico. Infine, come abbiamo precedentemente ricordato, l'ablazione genetica di SMYD3 in modelli animali riduce la formazione di tumori epatici ed intestinali oltre a contrastare l'EMT (epithelial-mesenchymal transition), fenomeno fondamentale della progressione tumorale fortemente dipendente dalla cascata del TGF- β (Giannelli et al., 2016; Fabregat et al. 2016).

Dato che SMYD3 sostiene la tumorigenesi attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, AKT), scopo della Task 2 è quello di investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione del TGF β . Per prima cosa ci proponiamo di identificare i potenziali attori responsabili di tali interazioni, in secondo luogo, investigheremo i membri del TGF- β pathway come substrato candidato alla metilazione da parte di SMYD3. Infine, studieremo l'impatto dell'attività di SMYD3 nel meccanismo di tumorigenesi dipendente da TGF- β .

Obiettivo 1:

Nei pazienti con CCR, il pathway EGF/RAS/RAF/MEK/ERK rappresenta la via fondamentale di progressione tumorale. Inoltre, l'attivazione di ERK, può indurre la tumorigenesi nelle cellule epiteliali dell'intestino nei topi APC^{Min/+}. È stato anche dimostrato che SMYD3 sostiene la proliferazione delle cellule cancerose attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, MAP2K3). I nostri risultati preliminari indicano che SMYD3 interagisce fisicamente con uno dei più importanti mediatori intracellulari della proliferazione delle cellule di CCR, ovvero la forma attiva di MEK1 (P-MEK1). Inoltre, l'inibizione di SMYD3 reprime fortemente l'attivazione di ERK senza però agire sui livelli di P-MEK1 (Dati Preliminari, Figure 1,2,3,4).



Lo scopo di questa prima fase del progetto sarà investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK. *In primis* ci proponiamo di identificare i domini responsabili di tali interazioni, *in secundis*, studieremo MEK1 come substrato candidato alla metilazione mediata da SMYD3. Infine, analizzeremo il ruolo di SMYD3 nel meccanismo di cancerogenesi dipendente da MEK1. Operativamente, il lavoro sperimentale inerente a questo primo obiettivo sarà suddiviso in 4

diverse fasi: la fase 1A che verterà sulla caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1; la fase 1b incentrata sull'analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1; la fase 1C in cui saranno analizzati gli effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo e in ultimo, la fase 1D. Caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Il principale obiettivo della prima fase sarà l'analisi delle caratteristiche biochimiche-molecolari alla base dell'interazione tra SMYD3 e MEK1. A tal fine, saranno caratterizzati i domini specifici di MEK1 coinvolti nell'interazione con SMYD3. L'obiettivo di questa subtask sarà l'identificazione di regioni e/o residui critici di MEK1 che risultino potenziali target per la metilazione mediata da SMYD3. Poiché molte delle metiltransferasi contenenti il dominio SET, inclusa SMYD3, modificano le lisine, concentreremo le nostre analisi sulle lisine nel dominio regolatorio dell'attività di MEK1. Sebbene non ci siano evidenze sperimentali che suggeriscano la presenza di motivi altamente conservati per le istone metiltransferasi (HMT), recenti studi hanno mostrato come il motivo (K/R)-(S/T/A)-K rappresenti un target preferenziale per le SET7/9, mentre i residui G-S-K sono bersaglio della metilazione SMYD3 mediata.

Il ruolo funzionale dell'interazione SMYD3/MEK1 sarà successivamente investigato in un contesto cellulare, attraverso l'utilizzo di modelli sperimentali overesprimenti mutanti di SMYD3 e di MEK1. In questi modelli, andremo ad analizzare la fosfoattivazione di ERK dipendente da MEK1, attraverso l'ablazione genetica (indotta con siRNA o shRNA) e/o trattamenti farmacologici inibitori di SMYD3 (attraverso BCI-121). Questo step permetterà di comprendere se la metilazione SMYD3 dipendente di MEK1 è un segnale necessario e/o sufficiente per un'upregolazione della via di segnalazione MEK/ERK o se in alternativa in quest'upregolazione sono coinvolti ulteriori segnali intracellulari.

Obiettivo 2:

Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nella modulazione del pathway TGF- β

Il pathway TGF- β gioca un ruolo chiave nella patogenesi dell'Epatocarcinoma. In questi tumori, SMYD3 si accumula nella frazione nucleare durante la fase G2/M del ciclo cellulare, e la sua ablazione genetica causa una riduzione nella progressione verso la mitosi. Inoltre, recenti dati di letteratura indicano che SMYD3 correla con TGF- β in pazienti con cancro gastrico. Infine, come abbiamo precedentemente ricordato, l'ablazione genetica di SMYD3 in modelli animali riduce la formazione di tumori epatici ed intestinali oltre a contrastare l'EMT (epithelial-mesenchymal transition), fenomeno fondamentale della progressione tumorale fortemente dipendente dalla cascata del TGF β (Fabregat et al. 2016).

Dato che SMYD3 sostiene la tumorigenesi attraverso la metilazione di mediatori chiave dello stimolo proliferativo (i.e. VEGFR, AKT), scopo della Task 2 è quello di investigare l'impatto dell'attività di SMYD3 sulla via di segnalazione del TGF β . Per prima cosa ci proponiamo di identificare i potenziali attori responsabili di tali interazioni, in secondo luogo, investigheremo i membri del TGF- β pathway come substrato candidato alla metilazione da parte di SMYD3. Infine, studieremo l'impatto dell'attività di SMYD3 nel meccanismo di tumorigenesi dipendente da TGF β .

2A *Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.* A tal fine verranno utilizzate differenti linee cellulari di HCC variamente responsive al TGF- β (early and Late TGF- β signature) nella proliferazione e sopravvivenza cellulare.

2B *Analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway.* Obiettivo di questa subtask è quello di valutare la possibilità che SMYD3 interagisca fisicamente e/o funzionalmente con i principali mediatori della cascata del TGF β . A tal fine verranno utilizzati approcci diversi e complementari.

2C. *Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3* sulle proteine della cascata TGF- β (TGF β R e SMADs) *e del suo effetto sulla loro attività/funzione.* L'obiettivo di questa subtask sarà quello di identificare le regioni e i residui critici per la metilazione mediata da SMYD3 (domini G-S-K).

2D Studi cellulari. Una volta identificate le interazioni proteina-proteina e gli effetti di SMYD3 sulla loro funzione, condurremo studi funzionali over-esprimendole e/o inattivandole in linee cellulari precedentemente descritte.

Dati preliminari:

Recentemente abbiamo studiato l'espressione e l'attività di SMYD3 in un modello preclinico di CCR ed abbiamo riscontrato che durante la cancerogenesi questa metil transferasi è fortemente upregolata sia a livello trascrizionale che traduzionale. I nostri risultati mostrano anche che l'ablazione genetica di SMYD3 interferisce con la proliferazione delle cellule di CCR, suggerendo che SMYD3 abbia un ruolo chiave nella regolazione del tasso di proliferazione delle cellule tumorali (Fig.2). Questi dati, oltre a evidenziare un ruolo cruciale delle lisine metiltransferasi come potenziali target per la scoperta di nuovi farmaci, ci hanno spinto ad effettuare uno screening virtuale di piccole molecole, al fine di identificare possibili inibitori farmacologici di SMYD3. In quest'analisi riportiamo come uno di questi composti (BCI-121) induca una riduzione significativa dell'attività di SMYD3 sia in vitro che in cellule di CCR, come suggerito dall'analisi dei livelli di H3K4me e H4K5me (Fig.3). È importante sottolineare come gli effetti della crescita tumorale di BCI-121 siano paragonabili a quelli osservati a seguito dell'ablazione genetica di SMYD3.

L'efficacia inibitoria di BCI-121 su SMYD3 è stata prevalentemente studiata in cellule di CCR, tuttavia, come dimostrano i nostri studi, un effetto simile è stato riscontrato anche su linee cellulari di cancro del polmone, del pancreas, della prostata e dell'ovaio (Peserico et al., 2015). Questi promettenti risultati identificano SMYD3 come potenziale bersaglio per futuri protocolli terapeutici anticancro basati su composti che, come BCI-121 inibiscono chimicamente SMYD3 arrestando, di conseguenza la sua attività oncogenica.

La FDA (Food and Drug Administration) ha recentemente approvato diversi nuovi farmaci epigenetici per il trattamento di specifici tumori umani, e gli inibitori che hanno come target EZH2, componente della famiglia delle KMT, sono attualmente in sperimentazione clinica. In questo scenario, una migliore comprensione del ruolo di SMYD3 nella tumorigenesi del tratto gastroenterico, potrebbe essere un vantaggio per futuri interventi farmacologici.

Metodologie e analisi statistiche:

Obiettivo 1

La realizzazione del primo obiettivo di studio avverrà attraverso le seguenti fasi di indagine sperimentale: 1a. Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1; 1b. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1; 1c. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in vivo; 1d. La caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Fase 1a. Caratterizzazione dell'interazione SMYD3-MEK1.

Metodi: l'interazione tra SMYD3 e MEK1 verrà prima esaminata in vitro attraverso l'immunoprecipitazione di proteine purificate taggate con GST e/o con HIS, e derivate da costrutti di SMYD3 completi e da costrutti completi e tronchi di MEK1, già disponibili nel nostro laboratorio (fig). Questi risultati saranno ampliati mediante saggi di coimmunoprecipitazione. A tale scopo, andremo a cotrasfettare cellule come le HEK293 e/o NIH3T3 con SMYD3 e con differenti regioni di MEK1 per ottenere una espressione ectopica. Le analisi dei complessi immunoprecipitati saranno completate mediante l'utilizzo di anticorpi tag specifici (anti-HIS e/o anti-MYC e/o FLAG).

Fase 1b. Analisi della metilazione operata da SMYD3 su MEK1 e il suo effetto sull'attività di MEK1.

Metodi: La caratterizzazione sperimentale di potenziali siti (K168 e K268) target della metilazione SMYD3 dipendente su MEK1, avverrà attraverso un saggio di pull down in cui utilizzando costrutti tronchi di MEK1 e costrutti enzimaticamente (in)attivi di SMYD3 (privati del dominio SET) sarà evidenziata l'interazione MEK1-SMYD3 mediante marcatura con GST e/o HIS. Successivamente, in dipendenza dei risultati ottenuti con il saggio di pull down, identificheremo *in vitro* i residui metilati di MEK1, generando dei costrutti mutati di questa proteina. La mutagenesi consisterà in sostituzioni puntiformi delle lisine putative, target di SMYD3 con alanine (e.g. K168A e K268A). La sostituzione delle lisine metilabili di MEK1 con aminoacidi non metilabili ci permetterà di confermare i siti specifici di metilazione. Infine, per caratterizzare l'effetto funzionale della metilazione di MEK1 sulla sua attività catalitica (fosfoattivazione di ERK), realizzeremo un kinase assay per MEK1 utilizzando ERK come substrato. Questi saggi saranno realizzati incubando le proteine purificate, derivanti dai costrutti completi di SMYD3, con i costrutti derivanti da MEK1 (metilabili e non) e /o incubando i plasmidi che esprimono la proteina SMYD3 privata del suo dominio SET con MEK1. Qualsiasi risultato ottenuto da questa subFase ci permetterà di chiarire la regolazione SMYD3-dipendente sull'attività di MEK1. Ovviamente, se il saggio di pull down dovesse rivelare come target di metilazione (SMYD3 mediata), diverse e/o altre lisine di MEK1, seguiremo la medesima procedura di caratterizzazione.

Fase 1c. Effetti di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK in cellulo.

Metodi: Per realizzare gli obiettivi procederemo dapprima a cotrasfettare le HEK293 e le cellule della linea NIH3T3 con i costrutti completi e tronchi sia di SMYD3 che di MEK1. L'attivazione della pathway MEK/ERK verrà ottenuta mediante diversi stimoli (deprivazione del siero, stress ossidativo, inibitori delle chinasi). Successivamente, per assicurare la stretta dipendenza da SMYD3, dell'attività di MEK1, andremo ad analizzare mediante saggi di immunoblotting la fosfoattivazione delle proteine a valle di MEK/ERK, attraverso utilizzo di farmaci e/o mediante l'ablazione genetica di SMYD3.

Fase 1d. La caratterizzazione della relazione esistente tra SMYD3 e MEK1 in cellule che abbiano mutazioni a carico di Myc/Ras.

Metodi: Proceduralmente, per prima cosa trasformeremo le cellule MEF da cellule normali in maligne, attraverso l'impiego di retrovirus esprimenti gli oncogeni c-Myc e h-Ras-V12. Successivamente, procederemo con la cotrasfezione nelle cellule di costrutti completi e tronchi, attivi e inattivi di SMYD3 e MEK1. Nella fase successiva, testeremo nel fenotipo cellulare appena trasformato, l'effetto tumorigenico di SMYD3 sulla via di segnalazione MEK/ERK attraverso l'uso di tipici saggi di tumorigenesi (Matrigel, colony, MTT e WST). In aggiunta, le linee cellulari di CCR (HT29, HCT116, CaCO2, LS174T, SW80) saranno sottoposte a diversi stimoli correlati alla carcinogenesi (starvation da siero, stress ossidativo, etc), per valutare come l'interazione funzionale di SMYD3 con MEK1 influisca sull'effetto finale di ogni stimolo (matrigel, colony, MTT, WST) e sui livelli di fosfoattivazione delle proteine a valle della via di segnalazione di MEK/ERK. Per testare la dipendenza di SMYD3, eseguiremo l'ablazione farmacologica (BCI-121) e genetica (con siRNA o shRNA) negli stessi modelli cellulari.

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

La realizzazione del secondo obiettivo di studio avverrà attraverso le seguenti fasi di indagine sperimentale: 2a. *caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.* 2b. *analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway;* 2c. *Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3 sulle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e del suo effetto sulla loro attività/funzione;* 2d. *Studi cellulari.*

Fase 2a. Caratterizzazione del ruolo di SMYD3 nel TGF- β pathway in modelli cellulari.

Metodi: Nelle suddette linee cellulari di HCC (HepG2 e HLE in rappresentanza della early e late TGF- β signature rispettivamente) verrà silenziata l'espressione di SMYD3 a livello di messaggero (RNAi), oppure inibita la sua attività enzimatica con BCI-121, al fine di valutare la risposta alla stimolazione con il ligando TGF- β . Visto che SMYD3 è in grado di regolare sia l'attivazione che l'attività di chinasi coinvolte nei meccanismi di trasduzione del segnale, che siano recettori di membrana (es. VEGFR) o intermedi citoplasmatici (es. AKT, MAP3K2), valuteremo, mediante analisi di immunoblot e/o di attività chinasi in vitro (sia con proteine purificate che immunoprecipitando le chinasi da estratti cellulari), lo stato di fosforilazione/attivazione di mediatori endogeni della via del TGF- β (TGF- β R, SMAD2-7). Utilizzeremo, inoltre, inibitori per bloccare il segnale a monte della cascata TGF- β (galunisertib), antagonisti del ligando TGF- β (anticorpi monoclonali, DC10) e silenzieremo l'espressione dei principali mediatori del pathway TGF- β (siRNA per i geni SMAD). In tutte le condizioni sperimentali descritte valuteremo anche la formazione e localizzazione subcellulare dei multicompleksi proteici costituiti dalle proteine SMAD mediante frazionamenti cellulari, co-immunoprecipitazioni e analisi di western blot oppure analisi di immunofluorescenza con microscopia confocale su cellule intatte. Infine, valuteremo l'espressione dei principali geni target del TGF- β pathway coinvolti nel processo di progressione tumorale di queste neoplasie.

Fase 2b Analisi di interazione fisica e/o funzionale di SMYD3 con i mediatori del TGF- β pathway.

Metodi: la proteina purificata GST-SMYD3 verrà impiegata in una reazione di legame con i lisati proteici ottenuti da cellule di HCC trattate o meno con il ligando TGF- β con e senza l'aggiunta di galunisertib. I complessi proteici purificati saranno analizzati per immunoblot con anticorpi specifici per le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). Un altro approccio prevede l'overespressione del costrutto SMYD3-FLAG nelle HepG2 e HLE seguita da saggi di immunoprecipitazione con anticorpo anti-FLAG e successiva analisi di immunoblot con anticorpi specifici per le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). Per confermare l'effettiva formazione dei multicompleksi proteici nel contesto cellulare, procederemo all'esecuzione di co-immunoprecipitazioni di proteine endogene grazie all'utilizzo di anticorpi in grado di riconoscere SMYD3 e le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs). L'ultimo approccio sarà utile per dimostrare l'eventuale interazione diretta fra proteine purificate con saggi di legame in vitro. In caso di interazione diretta utilizzeremo dei costrutti in grado di codificare porzioni discrete della proteina SMYD3 (N-terminale, centrale, C-terminale) e del partner identificato fra le proteine della cascata TGF- β (TGF β R e SMADs).

Fase 2c. Analisi dell'attività di metilazione di SMYD3 sulle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e del suo effetto sulla loro attività/funzione.

Metodi: andremo a testare in vitro l'abilità che possiede SMYD3 di metilare questi residui attraverso un saggio di pull down mediante GST e/o HIS, attraverso costrutti tronchi delle proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) e costrutti enzimaticamente attivi ed inattivi di SMYD3 (privati del dominio SET). Successivamente, per determinare i residui metilati, e in dipendenza dei nostri risultati, abbiamo pianificato di generare dei costrutti con mutazioni puntiformi dei substrati attraverso la sostituzione dei residui delle lisine putative target di SMYD3 con le alanine (K>A). La sostituzione con aminoacidi non metilabili sui substrati ci permetterà di confermare i siti specifici di metilazione. Qualsiasi risultato ottenuto da questa subtask ci aiuterà a chiarificare la regolazione sull'attività di TGF- β SMYD3-dipendente. Sulla base di quale fra le proteine della cascata TGF- β (TGF- β R e SMADs) sarà/saranno identificate come interattori/substrati di SMYD3, procederemo a saggi funzionali in vitro ed in cellulo per valutare l'effetto della metilazione sulle attività biologiche di detta/e proteina/e.

Fase 2d. Studi cellulari.

Metodi:

Le linee cellulari verranno transfettate con costrutti, siRNA specifici e trattate o meno con inibitori chimici e/o attivatori descritti nelle tasks precedenti al fine di poter caratterizzare dal punto di vista funzionale e meccanicistico l'effetto di SMYD3 sulla cascata del TGF- β . A tal fine le linee cellulari dopo i vari trattamenti verranno sottoposte ai classici test di valutazione di proliferazione, migrazione, invasione, apoptosi e EMT.

Risultati attesi:

Nel progetto proposto, ci aspettiamo di approfondire la nostra comprensione del ruolo di SMYD3 nella fisiopatologia e terapia del CCR. I risultati derivanti saranno determinanti per la Formulazione di nuovi protocolli terapeutici basati su BCI-121 inibitore di SMYD3 testato durante i nostri studi preliminari. La necessità di terapie antitumorali in grado di eludere l'acquisizione di farmaco-resistenza e ridurre gli effetti collaterali è stimolante la ricerca di nuovi agenti terapeutici. Negli ultimi anni, i ricercatori si sono concentrati su target molecolari tumore-specifici, con lo scopo di migliorare l'efficacia del trattamento e specificità. In questo scenario, e sulla base delle nostre promettenti risultati preliminari sugli effetti di SMYD3 su MEK1 nelle vie di segnalazione CCR specifiche, e su TGF- β nel HCC e nel CCA. Il nostro progetto è finalizzato ad individuare le cascate di segnalazione suscettibili di essere mirati per promuovere la morte cellulare. Nel dettaglio, i dati raccolti in Obiettivo 1 saranno determinanti per identificare in SMYD3 un nuovo biomarcatore bersaglio di nuove terapie con il suo inibitore BCI-121 e per identificare altri target molecolari per terapia combinate. Gli esperimenti descritti in Obiettivo 2 rappresenteranno il perseguimento dell'Obiettivo 1 e serviranno a definire il ruolo di SMYD3 anche nella deregolazione del pathway di TGF- β specifica dell'HCC e del CCA affinché si possa testare l'efficacia di BCI-121 anche per queste forme di cancro. Infine, la valutazione di p38a umano in campioni tumorali di pazienti CCR proposto Obiettivo 3 aiuterà la definizione di correlazioni con la progressione del cancro, la prognosi e risposta alla terapia nell'uomo. Nel complesso, i risultati del progetto proposto forniranno importanti informazioni sul ruolo di SMYD3 nelle cascate nell'oncogenesi di colon-retto e del fegato e verificare l'efficacia della sua inibizione farmacologica, identificando al tempo stesso, un nuovo potenziale approccio terapeutico per il trattamento di queste neoplasie maligne (CCR, HCC, e CCA)

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Basandoci sui nostri risultati preliminari, i dati mostrano l'interazione SMYD3-MEK1, così abbiamo disegnato questa fase per caratterizzare a pieno l'interazione, la potenziale metilazione di MEK1, SMYD3-dipendente e come questa relazione possa influire sulla risposta fisiologica nelle cellule di CCR. In caso contrario, se dovessimo rilevare l'assenza di alcun tipo di attività enzimatica correlante SMYD3 e MEK1, allora ci focalizzeremmo sulle possibili ragioni e conseguenze dell'interazione indipendente dall'attività metiltransferasica, cercando partners molecolari che potrebbero agire da proteine trasduttori del segnale e/o domini di lettura epigenetici (e.g. BRD4). Qualunque risultato ottenuto da questa fase permetterà di ampliare e chiarire le attuali conoscenze della comunità scientifica sulla natura e gli aspetti molecolari del cross-talk tra SMYD3 e MEK1 nelle cellule di CCR.

Innovazioni:

Le ultime previsioni epidemiologiche mondiali designano il cancro come la principale causa di morte entro la fine di questo decennio. In particolare, il cancro del colon-retto è una preoccupazione per la salute, con oltre 1.000.000 di nuovi casi e 500.000 decessi attesi in tutto il mondo ogni anno.

Le prospettive di ulteriori progressi sostanziali nella gestione del carcinoma del colon-retto risiedono in una dissezione sistematica genetica e funzionale dei percorsi molecolari coinvolti nello sviluppo del cancro e nella progressione al fine di identificare gli agenti che possono avere un impatto diretto sulla terapia del cancro. In questo scenario, il nostro progetto si integra nel percorso delineato dalla più recenti progressi nella ricerca sul cancro, che prevedono che la conoscenza delle basi molecolari della malattia porterà alla cosiddetta medicina personalizzata. Medicina personalizzata si basa sul presupposto che le malattie sono eterogenee, sia nelle loro cause e nei loro risposte ai farmaci. Con limitata comprensione della base molecolare della malattia, ci siamo basati sui segni clinici aspecifici. In futuro, le malattie cliniche saranno sostituite da classificazioni molecolari, come fenotipi clinici pensato per essere una malattia sarà sottoclassificate da una tassonomia genomico nuovo. Infatti, i progressi dell'oncologia molecolare indicano chiaramente che ogni tumore è una conseguenza di una serie di particolari eventi mutazionali è verificato in un tessuto specifico di una determinata persona. La visione globale molecolare della malattia di un singolo paziente permetterà interventi terapeutici per essere adattato al profilo molecolare di un individuo sulla base di marcatori molecolari diagnostici e prognostici.

Tuttavia, molta strada deve ancora essere fatta prima di tali trattamenti possono essere resi disponibili e il punto di partenza di questo viaggio emozionante è la spiegazione del biologico, i meccanismi genetici e molecolari che caratterizzano una specifica malattia. Per quanto riguarda la trasformazione neoplastica, l'identificazione dei meccanismi molecolari che influenzano il destino delle cellule, la proliferazione cellulare, differenziamento e morte cellulare consentirà di individuare nuovi geni coinvolti nello sviluppo e nella progressione del cancro, e di conseguenza riconoscere sensibili fattori prognostici e nuovi target per il trattamento farmacologico.

Valutazione prognostica del carcinoma del colon-retto è attualmente basata su aspetto istologico, e non ci sono marcatori molecolari internazionalmente riconosciuti come fattori predittori standard. Per diversi decenni, la terapia convenzionale per il cancro del colon-retto localmente avanzato coinvolto la chirurgia e la terapia adiuvante, che è una modalità di trattamento combinato, tra cui 5-fluorouracile (5-FU), chemioterapia e radiazioni. Quando metastasi sono associate al tumore primario, 5-FU, con o senza leucovorin definito lo standard di cura. L'aggiunta di altri agenti chemioterapici, quali cisplatino, 5-FU a ha migliorato la sopravvivenza, ma spesso a scapito di un aumento della tossicità. Nel complesso, nonostante i miglioramenti nella sopravvivenza libera da progressione e generale, circa il 50% dei pazienti muore entro 5 anni a causa di metastasi o recidive. La chemioterapia si basa essenzialmente sull' induzione di apoptosi da danno al DNA, ma compromissione di geni apoptotici e / o anti-apoptotica determina l'acquisizione di resistenza ai farmaci. Questa osservazione è stimolare un sempre maggior campo in base alla ricerca di nuovi agenti terapeutici in grado di eludere l'acquisizione di farmaco-resistenza e ridurre gli effetti collaterali. Negli ultimi anni, i ricercatori si sono concentrati su target molecolari tumore-specifici, con lo scopo di migliorare l'efficacia del trattamento e specificità. In questo contesto, e sulla base dei nostri promettenti risultati preliminari sulle correlazioni tra SMYD3 e le vie di regolazione fondamentali della cancerogenesi e della progressione del CCR, ci proponiamo di identificare e caratterizzare meglio l'interazione di SMYD3 con MEK1 nelle cascate di segnalazione del CCR, e con TGF- β nei pathways specifici dell'HCC e del CCA.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il laboratorio di Medicina Personalizzata e quello di Genetica Sperimentale perseguono da sempre l'obiettivo di individuare nuovi target molecolari contro cui rivolgere l'effetto di composti chimico-farmacologici risultati promettenti negli studi preliminari condotti in vitro ed in vivo nei due laboratori. Oltre alla condivisione di scopo, anche la piena complementazione del know-how tra i due laboratori determinerà la perfetta sinergia di competenze e conoscenze differenti. Tale sinergia è presupposto imprescindibile per il raggiungimento di grandi risultati sperimentali come quelli attesi in tale progetto. Il laboratorio di Genetica Sperimentale si occuperà di sviluppare tutte le

indagini sperimentali volte alla caratterizzazione dell'interazione SMYD3/MEK1 e relativi effetti sulla progressione del CCR, mentre la caratterizzazione del complesso SMYD3/TGF- β e relativi effetti sui pathway dell'HCCe CAC saranno indagati dal laboratorio di Medicina Personalizzata.

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.

Fabregat I, Moreno-Càceres J, Sánchez A, Dooley S, Dewidar B, Giannelli G, Ten Dijke P; IT-LIVER Consortium. TGF- β signalling and liver disease. *FEBS J.* 2016 Jun;283(12):2219-32.

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 MAP-kinase phosphatase, and SMYD3, a histone methyltransferase, in rectal carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2010 Nov; 49(11): 1024-34.

Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, Mikulits W. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2016 Oct;65(4):798-808.

Giannelli G, Mikulits W, Dooley S, Fabregat I, Moustakas A, ten Dijke P, Portincasa P, Winter P, Janssen R, Leporatti S, Herrera B, Sanchez A. The rationale for targeting TGF- β in chronic liver diseases. *Eur J Clin Invest.* 2016 Apr;46(4):349-61. doi: 10.1111/eci.12596.

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): 664-70.

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.

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.

Kim H, Heo K, An W. Requirement of histone methyltransferase SMYD3 for estrogen receptor-mediated 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, Deng J, Luo X, Pan Y, Zhang L, Zhang R, Liang H. Overexpression of SMYD3 was associated with increased STAT3 activation in gastric cancer. *Med Oncol.* 2015 Jan; 32(1): 404.
- 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
- Liu H, Liu Y, Kong F, Xin W, Li X, Liang H, Jia Y. Elevated Levels of SET and MYND Domain-Containing Protein 3 Are Correlated with Overexpression of Transforming Growth Factor- β 1 in Gastric Cancer. *J Am Coll Surg.* 2015 Aug; 221(2):579-90.
- 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.
- 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): 2447-60.
- Tsuge M, Hamamoto R, Silva FP, Ohnishi Y, Chayama K, Kamatani N, Furukawa Y, Nakamura Y. A variable number of tandem repeats polymorphism in an E2F-1 binding element in the 5' flanking region of SMYD3 is a risk factor for human cancers. *Nat Genet.* 2005 Oct; 37(10): 1104-7.
- 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.
- 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.

Progetto n. 10: “Grading e outcome clinico di GEP/NET in relazione al PDL-1 status”

Responsabile: dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: dott.ssa E. Cavalcanti, dott.ssa G. Serino, dott. S. Coletta, dott.ssa E. Stasi

Background:

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). È attesa per il 2017 la 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 terapie 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 (10).

L'ipotesi più validata è che i pazienti responder hanno una alterazione delle proteine del mismatch-repair (MMR) (11-12). Il Sistema Mis Match 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 polipoide 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).

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 i 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 e 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 del profilo di espressione dei miRNA 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 che ha sovrapposto dati di espressione di 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 rationale 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 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 stata raggiunto il primo obiettivo conclusosi 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 anche valutato l'infiltrato perineurale, la permeazione vascolare, la necrosi e i linfonodi metastatici.

Successivamente è stata messa a punto la metodica immunohistochimica 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 discriminante. Pertanto, siamo andati a saggiare due diversi 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 poiché evidenziava un più 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.

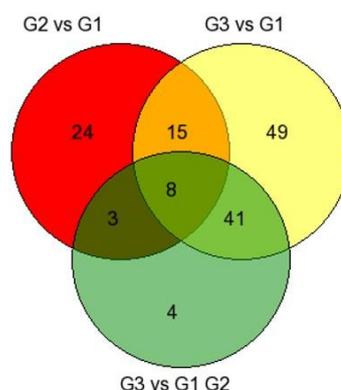
Abbiamo valutato l'espressione di membrana PD-L1 sulle cellule tumorali e/o sulle cellule immunitarie infiltrate. L'espressione del PD-L1 è assente in tutti i casi WD-NENs (G1), mentre è fortemente espresso in tutti i casi G3. L'espressione di PD-L1 è significativamente associata con il grado istopatologico. 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 può essere un discriminante nei NEN G3 ai fini terapeutici. Espressione del PD-L1 è significativamente correlata con il Ki67 index e c'è un significativo trend positivo con il Ki67 proliferation index. Successivamente abbiamo valutato l'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.

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.

Nel secondo anno di svolgimento del progetto, in collaborazione con il gruppo di ricerca della Dott.ssa Serino, è stata effettuata l'analisi del profilo di espressione dei *miRNA* nei NET ben e scarsamente differenziati. Nello specifico, sono stati utilizzati 7 casi di NEN G1, 6 casi di NEN G2 e 7 casi di NEN G3. Il profilo di espressione totale dei miRNAs è stato effettuato mediante la metodica del microarray su piattaforma Agilent. I risultati di espressione ottenuti da ciascun campione sono stati inizialmente normalizzati utilizzando il livello mediano di espressione genica. A partire dai 2549 miRNA umani rappresentati sul microarray, sono stati identificati 560 miRNA che risultano espressi nei campioni analizzati. Questi dati sono stati sottoposti a diverse analisi statistiche allo scopo di determinare quali sono i miRNA differenzialmente espressi per ciascun gruppo di pazienti. Applicando il metodo del Q-value e selezionando i miRNA modulati che hanno un fold-change di 2, sono stati identificati una lista di miRNAs deregolati specifica per ciascun grade. Nello specifico, sono state effettuate le seguenti comparazioni:

- G2 vs G1 = 50 miRNA deregolati
- G3 vs G1 = 113 miRNA deregolati
- G3 vs G1+G2 = 56 miRNA deregolati

In seguito, utilizzando un diagramma di Venn (mostrato di seguito) abbiamo selezionato tra le diverse liste di miRNA identificate, i miRNA espressi nei 3 gruppi ma con un diverso grado di espressione.

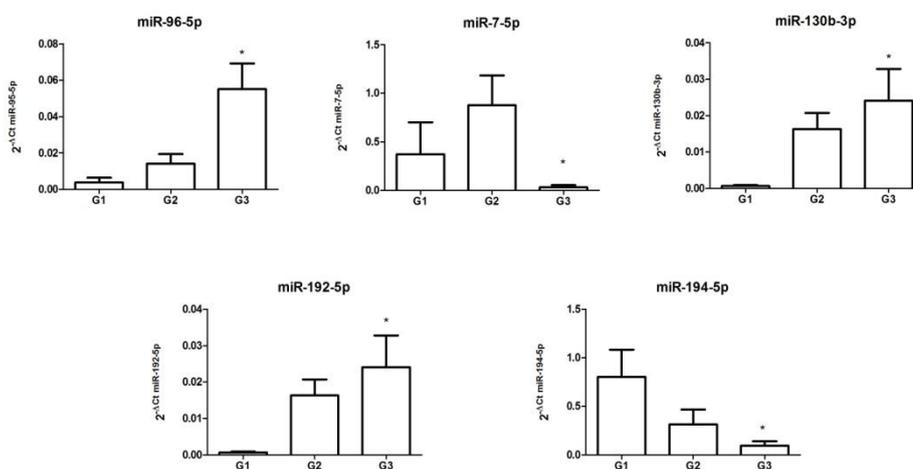


Quindi abbiamo valutato i geni target degli 8 miRNA selezionati e i processi biologici che andavano a regolare. L'analisi bioinformatica ha messo in evidenza che gli 8 miRNA regolavano le

seguenti pathways: FOXO pathway, Pathways in Cancer, TGF β Signalling Pathways, P53 signalling pathway, WNT signalling, P13K-AKT signalling pathway.

Successivamente abbiamo validato con Real-time PCR 5 degli 8 miRNA analizzati. Sono ancora in corso studi per i restanti miRNA di suddetto elenco. I dati ottenuti riportati nell'istogramma sono relativi ai seguenti miRNA: miR-96-5p: miR-7-5p: miR-130b-3p miR-192-5p miR-194-5p. I dati di Real-time PCR hanno validato i dati ottenuti da microarray. Le differenze osservate sono tutte statisticamente significative (*p<0.05).

Nel contempo in quest'anno studiando i target molecolari dei miRNA siamo stati indirizzati a valutare il significato biologico della densa rete vascolare associate a NEN di basso grado. Abbiamo valutato l'impatto dell'espressione del tessuto PDGFR α in 77 pazienti GEP / NEN, associando l'espressione di PDGFR α alla caratterizzazione morfologica nei tumori di basso grado. Dallo studio è emerso che il PDGFR α rappresenta un bersaglio efficace per un nuovo trattamento anti-angiogenico nei WD-GEP-NEN (fig.1), in particolare nei casi G2 e in G3 casi solo in presenza di un pattern misto-acetico misto. In questo contesto, è importante delineare attentamente quei tumori che potrebbero rispondere meglio a questo tipo di trattamento da solo o in combinazione.



Un'ulteriore indagine sulla relazione tra PD-L1 e PDGFR α è giustificata e può contribuire a ottimizzare l'approccio terapeutico nei pazienti con NEN GEP. **Questo studio è stato pubblicato: Cavalcanti E, Ignazzi A, De Michele F, Caruso ML. PDGFR α expression as a novel therapeutic marker in well-differentiated neuroendocrine tumors. Cancer Biol Ther. 2019;20(4):423-430.**

Attualmente è in corso la valutazione dell'espressione tissutale di FOXO1 e dei miRNA identificati e le loro correlazioni con le caratteristiche clinicopatologiche dei NEN.

Figure 1

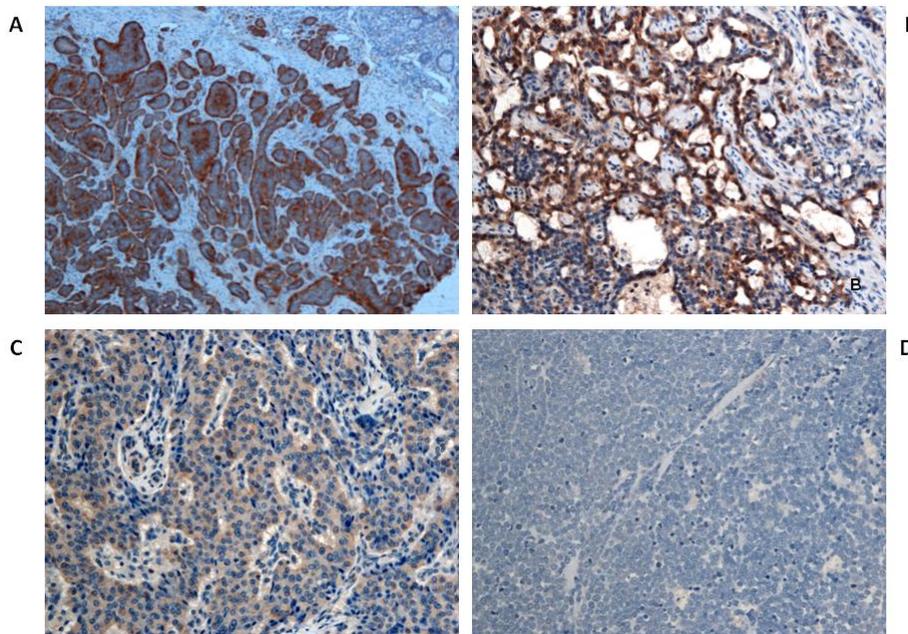


Figure 1. Representative patterns of PDGFR α in different architectural types: A) insular solid type B) acinar type C) trabecular type D) poorly-differentiated type. (magnification 20 \times).

Bibliografia:

1. Fesinmeyer MD, Austin MA, Li CI, De Roos AJ, Bowen DJ. Differences in survival by histologic type of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(7):1766–73.
2. Oberg K, Castellano D. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer Metastasis Rev* 2011;30(Suppl. 1):3–7.
3. Warner RRP. Enteroendocrine Tumors Other Than Carcinoid: A review of clinically significant advances. *Gastroenterology* 2005;128:1668-84
4. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-enteropancreatic system. *World J Gastroenterol* 2008;14:5377-84.
5. Ramage J K, Davies A H G, Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A et al; UKNETwork for Neuroendocrine Tumours. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut* 2005;54:1-16
6. Guilleminault L, Carmier D, Heuzé-Vourc'h N, Diot P, Pichon E. Immunotherapy in non-small cell lung cancer: inhibition of PD1/PDL1 pathway. *Rev Pneumol Clin*. 2015 Feb; 71(1):44-56. Epub 2015 Feb 14.
7. Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, et al. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol*. 2010; 28:3167–75.
8. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014; 515:563–7
9. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2455–65.

10. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366:2443–54.
11. Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; 100:266–73.
12. Goldstein J, Tran B, Ensor J, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H). *Ann Oncol.* 2014; 25:1032–8.
13. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138:2073–87.
14. Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. Ghimenti C, Lonobile A, Campani D, Bevilacqua G, Caligo MA. *Int J Oncol.* 1999 Aug;15(2):361-6.
15. The mismatch repair protein status of colorectal small cell neuroendocrine carcinomas. Stelow EB, Moskaluk CA, Mills SE. *Am J Surg Pathol.* 2006 Nov;30(11):1401-4.
16. Kim ST, Ha SY, Lee S, Ahn S, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Kim KM, Park YS. The Impact of PD-L1 Expression in Patients with Metastatic GEP-NETs. *J Cancer.* 2016 Feb 5;7(5):484-9.
17. La Rosa S, Marando A, Furlan D, Sahnane N, Capella C. Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. *Am J Surg Pathol* 2012;36:601-11.
18. Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes. *Gastroenterology* 2015;148:88-99.
19. Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival. *Gastroenterology* 2015;148:77-87
20. New Genetics and Genomic Data on Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Implications for Diagnosis, Treatment, and Targeted Therapies. Schmitt AM, Marinoni I, Blank A, Perren A. *Endocr Pathol.* 2016 Sep;27(3):200-4. Review
21. Schmitt AM, Marinoni I, Blank A, Perren A. New Genetics and Genomic Data on Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Implications for Diagnosis, Treatment, and Targeted Therapies. *Endocr Pathol.* 2016 Sep;27(3):200-4. Review.
22. Miller HC, Frampton AE, Malczewska A, Ottaviani S, Stronach EA, Flora R, Kaemmerer D, Schwach G, Pfragner R, Faiz O, Kos-Kudła B, Hanna GB, Stebbing J, Castellano L, Frilling A. MicroRNAs associated with small bowel neuroendocrine tumours and their metastases. *Endocr Relat Cancer.* 2016 Sep;23(9):711-26.

Progetto n. 11: “Studio di nuovi biomarcatori non invasivi per la valutazione ed il monitoraggio di soggetti con NAFLD/NASH”

Responsabile: dott. Mario Correale e dott. Alberto R Osella

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, ci concentreremo su 2 biomarcatori che sembrano avere un potenziale interesse 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. Sia il dosaggio dell'SCCA IgM (Xeptagen), che quello dell'Irisina (Adipogen) sono effettuati con metodiche immunometriche di tipo ELISA su micropiastre.

Il saggio ELISA per la determinazione della concentrazione degli immunocomplessi dell'antigene del carcinoma delle cellule squamose (SCCA-IgM) è un innovativo metodo diagnostico in-vitro, basato sulla rilevazione delle varianti SCCA circolanti sottoforma di immunocomplesso SCCA-IgM. La piastra multistrip è sensibilizzata con anticorpo oligoclonale di coniglio anti-SCCA e la concentrazione del complesso SCCA-IgM è espressa in unità arbitrarie (AU/mL) usando uno specifico calibratore come riferimento.

Il saggio ELISA per la determinazione quantitativa in-vitro dell'irisina nel siero è basato sull'utilizzo di un anticorpo policlonale sempre con metodica su micropiastre.

L'analisi statistica dei dati prevede la descrizione dei partecipanti per quanto riguarda dati socio-demografici e biochimici tramite tabelle (Tabella 1 e Tabella 2). Le variabili di tipo quantitativo verranno descritte tramite la stima della media e della deviazione standard (SD) e le variabili qualitative con le frequenze (%).

Descrizione del campione

Sono stati arruolare un gruppo di 197 soggetti ai quali è stata eseguita un'ecografia ed insieme agli esami di laboratorio previsti dal protocollo di routine, sono stati dosati l'SCCA-IgM e l'Irisina. Questi soggetti sono stati sottoposti a tre differenti regimi dietetici (Dieta di Controllo INRAN, Dieta a Basso Indice Glicemico e Dieta Mediterranea) e seguiti a T0, T1=3 mesi e T2=6 mesi con la ripetizione dei biomarcatori e degli altri esami.

Tabella 1. Descrittiva del campione

Variabili	INRAN	IG	Mediterranea
N	45	55	96
Età (anni)	59,73 (12,11)	57,76 (10,72)	58,94 (10,14)
Sesso			

M	28 (62%)	29 (53%)	61 (64%)
F	17 (38%)	26 (47%)	35 (36%)
IRISINA			
0	9,56 (5,69)	6,55 (5,06)	8,29 (5,16)
3 mesi	9,06 (5,08)	8,56 (3,67)	8,20 (3,93)
6 mesi	9,85 (3,67)	10,91 (4,41)	9,95 (4,41)
SCCAIgM			
0	84,99 (75,70)	127,48 (167,62)	130,25 (239,13)
3 mesi	100,09 (76,67)	113,56 (130,22)	130,41 (235,22)
6 mesi	71,19 (54,16)	111,76 (131,56)	134,63 (222,33)
PAS, mean (SD)			
0	137,33 (17,08)	138,64 (16,51)	137,24 (15,44)
3 mesi	130,11 (15,50)	127,91 (16,21)	127,14 (15,14)
6 mesi	127,78 (11,41)	126,16 (15,92)	125,26 (15,52)
PAD, mean (SD)			
0	83,67 (11,10)	86,09 (7,25)	86,61 (7,45)
3 mesi	76,56 (9,22)	76,64 (8,34)	77,71 (7,50)
6 mesi	76,11 (8,18)	77,45 (9,22)	75,94 (8,15)
BMI, mean (SD)			
0	33,07 (3,60)	33,86 (6,97)	33,18 (3,94)
3 mesi	31,78 (3,40)	31,91 (6,35)	31,29 (3,73)
6 mesi	31,56 (3,39)	31,59 (6,12)	31,00 (3,79)
Trigl, mean (SD)			
0	152,11 (75,31)	190,65 (91,50)	195,15 (115,79)
3 mesi	148,42 (70,76)	160,78 (103,23)	159,92 (75,38)
6 mesi	154,71 (79,49)	165,89 (91,50)	158,71 (79,59)
HDL, mean (SD)			
0	48,80 (12,98)	47,75 (9,22)	46,30 (11,49)
3 mesi	49,16 (18,69)	48,71 (11,46)	47,93 (10,77)
6 mesi	44,73 (12,32)	49,07 (8,96)	48,43 (11,05)
LDL, mean (SD)			
0	114,87 (31,83)	122,33 (34,52)	117,99 (35,49)
3 mesi	108,40 (31,33)	113,18 (39,27)	114,65 (30,92)
6 mesi	109,16 (27,70)	114,65 (36,55)	114,23 (32,62)
Coolest, mean (SD)			
0	194,13 (40,56)	208,22 (43,31)	202,72 (43,07)
3 mesi	187,24 (39,84)	194,00 (46,00)	194,55 (34,03)
6 mesi	184,87 (35,35)	196,91 (44,63)	194,72 (33,07)
Glicemia, mean (SD)			
0	112,60 (24,52)	123,73 (35,15)	120,74 (33,19)
3 mesi	105,60 (22,46)	107,47 (16,96)	109,26 (27,81)
6 mesi	103,78 (29,35)	106,42 (16,61)	107,93 (25,24)
HomalR, mean (SD)			
0	3,98 (3,48)	4,38 (2,01)	4,38 (3,48)
3 mesi	3,41 (2,71)	3,27 (1,67)	3,08 (1,89)
6 mesi	3,14 (3,09)	3,51 (3,52)	3,17 (2,31)
fruttosammina, mean (SD)			
0	59,73 (12,11)	261,38 (45,67)	269,32 (39,89)

3 mesi	242,29 (45,67)	257,91 (49,43)	253,48 (46,01)
6 mesi	254,36 (42,56)	256,47 (43,81)	258,61 (34,74)

Tabella 2. Descrizione del Campione secondo Grado di Steatosi e Tempi

Variabili	T0 n (%)	T 3 mesi n (%)	T 6 mesi n (%)
Dieta INRAN			
<i>Steatosi</i>			
No Steatosi	11 (24%)	18 (40%)	15 (33%)
Lieve	9 (20%)	9 (20%)	11 (24%)
Moderata	17 (38%)	12 (27%)	14 (31%)
Severa	8 (18%)	6 (13%)	5 (11%)
Dieta a Basso Indice Glicemico			
<i>Steatosi</i>			
No Steatosi	8 (15%)	18 (33%)	21 (38%)
Lieve	10 (18%)	15 (27%)	14 (25%)
Moderata	28 (51%)	16 (29%)	10 (18%)
Severa	9 (16%)	6 (11%)	10 (18%)
Dieta Mediterranea			
<i>Steatosi</i>			
No Steatosi	18 (40%)	31 (32%)	35 (36%)
Lieve	9 (20%)	24 (25%)	20 (21%)
Moderata	12 (27%)	31 (32%)	26 (27%)
Severa	6 (13%)	10 (10%)	15 (16%)

Analisi Statistica

Per quanto riguarda gli outcomes (livelli di SCCA-IgM ed Irisina), le differenze tra i diversi momenti (baseline e follow-up) sono stati modellati tramite un modello lineare misto in modo di prendere in considerazione qualsiasi eterogeneità non osservata dei soggetti. Seguono in Tabella 4 e 5 i risultati dell'analisi statistica con relativi grafici (Figura 1 e 2). L'analisi statistica è stata effettuata con il software statistico Stata v 15.

Tabella 3. Modello Lineare Misto: Effetto di diverse variabili sul SCCA-IgM

SCCAIgM	Coeff	Std. Err.	p
Tempi			
0	0		
3 mesi	0.146	0.041	0.000
6 mesi	0.069	0.048	0.155
Dieta			
INRAN	0		
IG	0.110	0.176	0.533
M	0.072	0.158	0.647
Steatosi			
No steatosi	0		
Lieve	0.005	0.058	0.924
Moderata	-0.021	0.066	0.752

Severa	-0.013	0.085	0.881
BMI	0.026	0.012	0.036
HDL	0.002	0.002	0.337
LDL	0.0003	0.001	0.733
Trigliceridi	0.0001	0.0003	0.510
Fruttosamina	-0.001	0.0006	0.122

Modello corretto per sesso ed età

Tabella 4. Modello Lineare Misto: Effetto di diverse variabili sull'Irisina

Irisina	Coeff	Std. Err.	p
Tempi			
0	0		
3 mesi	0.469	0.436	0.282
6 mesi	2.160	0.435	0.000
Dieta			
INRAN	0		
IG	-0.854	0.611	0.162
M	-0.680	0.546	0.213
Steatosi			
No steatosi	0		
Lieve	0.352	0.532	0.508
Moderata	0.368	0.532	0.489
Severa	0.362	0.680	0.594
BMI	-0.008	0.050	0.875
HDL	0.053	0.018	0.004
LDL	-0.004	0.006	0.525
Trigliceridi	-0.003	0.002	0.166
Fruttosamina	0.012	0.005	0.011

Modello corretto per sesso ed età

Figura 1. Valori Predetti dei Valori di SCCA-IgM secondo la Dieta e Tempi di Osservazione

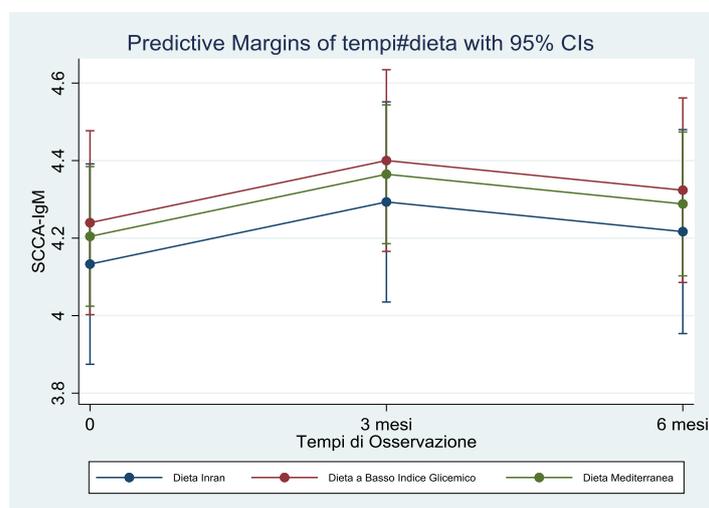
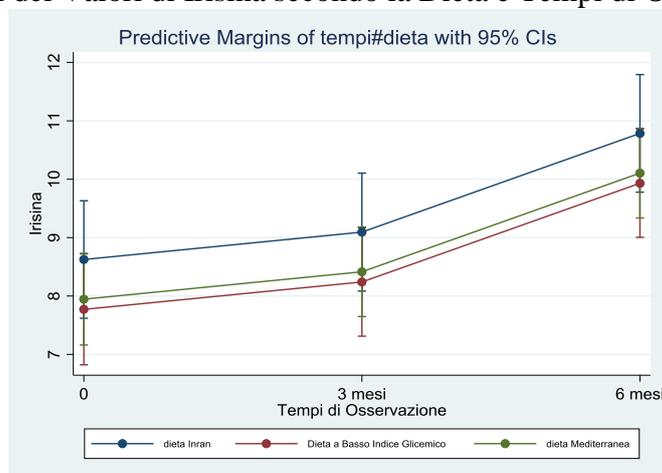


Figura 2. Valori Predetti dei Valori di Irisina secondo la Dieta e Tempi di Osservazione



Bibliografia:

- K. Panati, Y. Suneetha, V.R. Narala. Irisin/FNDC5 – An updated review. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 2016 Vol. 20 - N. 4: 689-697.
- Du XL, Jiang WX, Lv ZT. Lower Circulating Irisin Level in Patients with Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Horm Metab Res* 2016; 48(10):644-652.
- Polak K, Czyzyk A, Simoncini T, Meczekalski B. New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest* 2016 Jul 29.
- Belviranlı M, Okudan N, Çelik F. Association of Circulating Irisin with Insulin Resistance and Oxidative Stress in Obese Women. *Horm Metab Res* 2016; 48(10): 653-657.
- Rodríguez-Carmona A, Pérez Fontán M, Sangiao Alvarellos S, García Falcón T, Pena Bello ML, López Muñoz A, Cordido F. Serum levels of the adipomyokine irisin in patients with chronic kidney disease. *Nefrologia* 2016; 36(5): 496-502.
- Gianluigi Giannelli, Emilia Fransvea, Paolo Trerotoli, Michel Beaugrand, Felice Marinosci, Luigi Lupo, Gisele Nkontchou, Pietro Dentico, Salvatore Antonaci. Clinical validation of combined serological biomarkers for improved hepatocellular carcinoma diagnosis in 961 patients. *Clinica Chimica Acta*, 2007; 383: 147-152
- Martini A, Fattovich G, Guido M, Bugianesi E, Biasiolo A, Ieluzzi D, Gallotta A, Fassina G, Merkel C, Gatta A, Negro F, Pontisso P. HCV genotype 3 and squamous cell carcinoma antigen (SCCA)-IgM are independently associated with histological features of NASH in HCV-infected patients. *J Viral Hepat.* 2015; 22(10):800-8. Giannelli G, Antonaci S. New frontiers in biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis.* 2006; 38: 854-9.

Progetto n. 12: “Ricerca di nuovi biomarkes in grado di discriminare i pazienti IBD non-responder alla terapia biologica”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: dott. Marcello Chieppa, dott.ssa Maria Lucia Caruso, dott. Antonio Lippolis, dott. Mauro Mastronardi, dott.ssa Elisa Stasi, dott.ssa Margherita Curlo, dott.ssa Grazia Serino, sig. Vito Guerra.

Background:

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]. È 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 reponder 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 TNFα 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 separazione 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 dei non responder.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

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.

Utilizzando modelli animali caratterizzati da infiammazione intestinale spontanea TNF α -indipendente abbiamo individuato due target infiammatori innovativi (IL-1 β e IL-9). [16]

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 , IL-1 β ed IL-9. Attualmente abbiamo esaminato il siero di 41 pazienti dei quali 25 è risultato positivo a TNF α , 11 ad IL-1 β ed 7 ad IL-9.

In 7 casi la positività al TNF α coincideva con quella ad IL-1 β , in 8 casi la positività al TNF α coincideva con quella ad IL-9 ed in 3 casi la positività ad IL-9 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 sotto soglia diventa normale e la Proteina C reattiva, che rientra nel range di riferimento.

Il numero di pazienti è 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).

Abbiamo inoltre avviato una collaborazione con il gruppo di gastroenterologia del Policlinico Gemelli di Roma e la Case Western University di Cleveland. Abbiamo avuto la possibilità di ottenere i sieri dei pazienti responder e non-responder ai quali è associata una rigorosa valutazione morfologica.

I sieri sono stati analizzati confermando le indicazioni ottenute dalla nostra unità sul ruolo predittivo dell'IL1b nel contesto dei pazienti non-responder.

Obiettivi specifici dello studio:

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

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

Il percorso clinico dei pazienti arruolati per lo studio dovrà seguire rigidi standard di eccellenza. Verranno arruolati per lo studio solo i pazienti che non hanno ancora iniziato alcun percorso terapeutico, stimiamo di arruolare 100 nuovi casi all'anno. I nuovi pazienti con presunto IBD verranno seguiti in un percorso coordinato tra Endoscopia digestiva, Anatomia patologica e Patologia Clinica.

Il giorno dell'endoscopia i pazienti si presenteranno in ospedale per il prelievo (analisi di rutine) e consegneranno un campione di feci (valutazione del sangue occulto e calprotectina fecale) ed urine (analisi standard e dosaggio della neopterinina) raccolte prima di cominciare la preparazione per la colon e conservate nel freezer di casa.

Il materiale biologico non utilizzato per le analisi verrà conservato nella biobanca seguendo gli standard di riservatezza in uso nel nostro istituto.

I prelievi biotici verranno prelevati secondo rigidi standard numerici e qualitativi. Le biopsie, in numero uguale o superiore a due per ogni tratto compreso tra ileo e retto, dovranno avere dimensioni tali da permettere l'analisi di almeno 8 cripte parallele e della muscularis mucosae. In caso di mancato raggiungimento degli standard qualitativi richiesti, i pazienti verranno esclusi dallo studio.

I dati di ogni paziente verranno uniti in una nuova cartella clinica sperimentale coordinata con i reparti coinvolti. Tutte le informazioni ottenute saranno presenti nella cartella.

Il gruppo di ricerca si riunirà 2 volte al mese per discutere i dati raccolti e risolvere eventuali problematiche evidenziate. Tutti i pazienti seguiranno la terapia convenzionale secondo gli standard terapeutici in uso.

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

La valutazione dell'efficacia del trattamento con farmaco biologico richiede circa 3 mesi di trattamento. Ogni nuovo *non-responder* (20% circa) verrà segnalato, mentre per i responder potrebbero formarsi due sottogruppi *responder* (55% circa) e *lose responder* (25% circa).

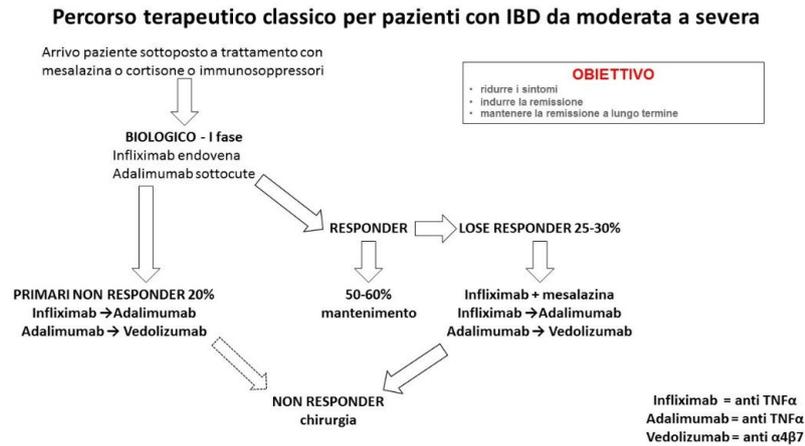
Obiettivo 3: Individuazione e validazione di biomarkers predittivi

Raggiunta una numerosità di 40 *non-responder* e 40 *responder* cominceremo analisi retrospettive sul materiale biologico conservato in biobanca per l'individuazione e la validazione dei nuovi markers.

Dati preliminari:

I dati preliminari provengono direttamente dall'osservazione clinica dei pazienti. Da un totale di 200 nuovi pazienti/anno affetti da IBD visitati dal reparto Gastro2 60 trattati con anti-TNF. Tra questi pazienti una percentuale del 60% ha sostenuto analisi presso il reparto di patologia clinica e 99% anatomia patologica. Nessuno dei pazienti fino ad oggi ricoverato ha sostenuto esami genetici per riscontrare eventuali mutazioni dei geni precedentemente descritti. La valutazione del metagenoma è stata a lungo considerata, ma fino ad oggi mai attuata.

Metodologie e analisi statistiche:



Valutazione dei microRNA circolanti: Il profilo dei miRNA verrà valutato utilizzando i sieri conservati in biobanca. Eventuali miRNA caratteristici di un sottogruppo di pazienti potrebbero essere candidati predittivi o target terapeutici.

Sequenziamento di geni selezionati: Valuteremo la presenza delle mutazioni frequentemente associate alla comparsa di IBD in tutti i pazienti arruolati nello studio. Porteremo particolare attenzione alle mutazioni del gene IL-10R.

Analisi del microbiota intestinale: il DNA batterico verrà estratto dai campioni di feci congelate. Le analisi verranno svolte mediante Next-Gen Sequencing utilizzando MiSeq dell'Illumina. La composizione batterica dei responder e non responder verrà valutata in collaborazione con la Prof.ssa De Angelis dell'Università degli studi di Bari. Queste analisi ci permetteranno di individuare disbiosi intestinali caratteristiche dei non responder, con eventuali importanti ricadute terapeutiche.

Analisi metabolomiche: Il metaboloma verrà valutato nelle urine conservate in biobanca. Paragonando il profilo metabolomico dei *responder* Vs *non-responder* potremmo individuare target metabolici esclusivi di un sottogruppo di pazienti.

Validazione mediante immunoistochimica: I possibili biomarker selezionati verranno validati mediante analisi di immunoistochimica sfruttando un archivio di campioni estremamente vasto e diversificato. In questo modo potremo valutare affidabilità e specificità dei biomarkers proposti.

Validazione su modelli animali: I biomarkers individuati verranno studiati contemporaneamente sull'archivio istochimico sia su modelli animali di colite ulcerosa spontanea. Abbiamo sviluppato modelli animali in cui la predisposizione alla colite ulcerosa si associa alla mancanza di TNF α o dei suoi recettori TNF α R1R2. Sfruttando l'approfondita conoscenza di questi modelli valideremo i biomarkers ed il loro livello di espressione durante le diverse fasi della patologia.

Single-cell RNA transcript staining: Utilizzeremo analisi citofluorimetriche per valutare l'espressione di eventuali geni selezionati durante la seconda fase del progetto alle sottopopolazioni di origine ematopoietiche purificate da sangue circolante dei pazienti.

Sperimentazione animale di terapie nutrizionali per la prevenzione/mantenimento fase asintomatica: Utilizzeremo i modelli murini di colite ulcerosa precedentemente descritti per individuare regimi nutrizionali arricchiti in composti bioattivi tali da ritardare o prevenire la comparsa della

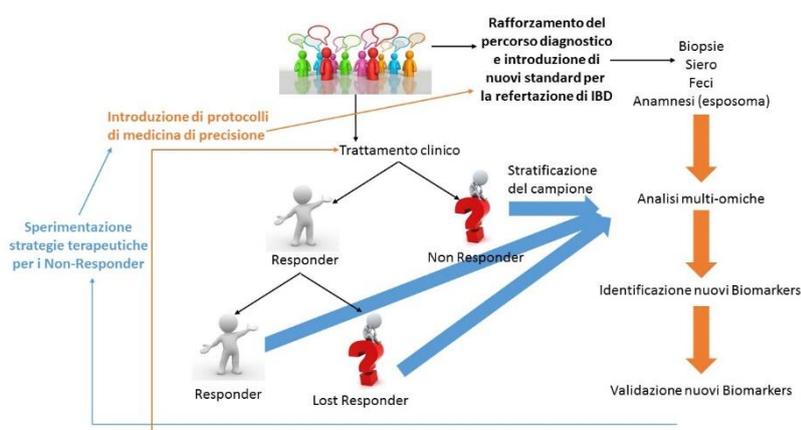
sintomatologia della colite ulcerosa. Tale strategia potrà essere traslata in fase clinica come terapia adiuvante per il mantenimento della fase di remissione.

Risultati attesi:

Dal presente progetto è possibile attendersi un miglioramento immediato dello standard clinico di valutazione del paziente. Anche se inizierà come un progetto pilota, confidiamo che il miglioramento della comunicazione tra reparti e la comunicazione costante ed efficace dei risultati aiuterà ad individuare strategie sempre più personalizzate per il trattamento dei pazienti.

Confidiamo anche di poter individuare biomarker predittivi entro la fine del secondo anno di sperimentazione. I risultati ottenuti verranno validati in cicli di sperimentazione successivi essendo la presente proposta pensata come un ciclo che ad ogni passaggio ricomincia per validare, affinare e restringere i biomarker individuati.

Per la fine del terzo anno ci attendiamo di aver individuato strategie alternative per i pazienti non responder.



Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Il progetto proposto è caratterizzato dall'enorme quantità di dati raccolti. Dal punto di vista clinico e del percorso terapeutico del paziente, sarà un sicuro innalzamento degli standard diagnostici ed un sicuro affinamento della scelta delle terapie somministrate.

Dal punto di vista scientifico e delle pubblicazioni prodotte, esiste il rischio che nonostante la numerosità delle tecniche utilizzate, la numerosità del campione sia troppo bassa per portare a risultati significativi.

Le strategie che seguiremo per minimizzare i rischi di fallimento saranno:

- comunicazione tra i reparti: useremo riunioni bisettimanali dedicate al gruppo di ricerca, durante le quali discutere i risultati ottenuti, le criticità riscontrate e le strategie per superarle. Il punto di forza del gruppo di lavoro è la multidisciplinarietà e l'esperienza del personale coinvolto
- complementarietà con altri progetti in corso: i risultati ottenuti dai progetti attualmente in corso sono complementari allo studio proposto e possono quindi contribuire ad individuare nuovi biomarkers o validare quelli individuati

- Whole genome sequencing dei pazienti: il sequenziamento del DNA dei pazienti verrà considerato come una opzione nel caso in cui sia troppo numeroso il numero dei geni da sequenziare per poter

predire la risposta terapeutica dei pazienti. Oggi è possibile sequenziare l'intero genoma umano con una spesa di 1000 euro per campione. Questa spesa è certamente inferiore a quanto speso per un trattamento farmacologico inappropriato e quindi compatibile con una analisi preventiva alla somministrazione del farmaco biologico.

Innovazioni:

La medicina personalizzata e di precisione è considerata il nuovo standard per il trattamento clinico dei pazienti. Le nuove tecnologie a nostra disposizione e l'avvento delle multi-omiche permettono analisi che pochi anni fa erano impensabili. Nel nostro ospedale i singoli gruppi hanno provato ad innalzare gli standard delle analisi preliminari sui pazienti in modo da meglio disegnare la terapia scelta sulle esigenze dei pazienti. Questo progetto unisce per la prima volta diversi reparti dell'istituto per individuare dei biomarcatori predittivi della risposta al farmaco biologico anti TNF α . Questo problema è estremamente rilevante in un IRCCS che ha come obiettivo fondamentale il trattamento dei pazienti e la ricerca di terapie e percorsi terapeutici innovativi. La spesa del nostro istituto per il trattamento dei pazienti con farmaci biologici è 2.000.000/anno. Dei circa 60 pazienti che ogni anno cominciano una nuova terapia, il 45% non risponde al farmaco o perde la risposta nel tempo.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

I gruppi di ricerca coinvolti nel presente progetto sono quasi esclusivamente parte dell'IRCCS "S.de Bellis". Le interazioni per progetti di ricerca sono state frequenti in questi anni, come dimostrano le prime pubblicazioni prodotte in collaborazione [17 - 20].

Nel percorso clinico dei pazienti sono coinvolti i reparti di Endoscopia digestiva, Anatomia patologica e Patologia clinica. La novità rappresentata dal nostro progetto è una interazione sistematica ed organizzata per far sì che i dati clinici e sperimentali confluiscono in un solo progetto che avrà rilevanza clinica e scientifica.

Formazione e attività tutoriali:

Il presente progetto comporta il miglioramento dello standard diagnostico e clinico per i pazienti affetti da IBD. Puntiamo a migliorare le performance cliniche del nostro IRCCS puntando prima di tutto sulla comunicazione e la costante interazione tra reparti. Anche solo questo aspetto costituisce un enorme passo nella formazione del personale clinico e di ricerca.

Altre iniziative per la formazione contano sull'organizzazione di un meeting per la presentazione dei risultati ottenuti presso il nostro centro congressi al termine dei primi due anni di sperimentazione.

Sono anche previste risorse per la formazione del personale coinvolto mediante la partecipazione a congressi internazionali inerenti al tema trattato.

Bibliografia:

- [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 anti-inflammatory 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] Galleggiante V, De Santis S, Cavalcanti E, Scarano A, De Benedictis M, Serino G, Caruso ML, Mastronardi M, Pinto A, Campiglia P, Kunde D, Santino A, Chieppa M. Dendritic Cells Modulate Iron Homeostasis and Inflammatory Abilities Following Quercetin Exposure. *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] 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.
- [17] Delvecchio FR, et al. Polyphenol administration impairs T-cell proliferation by imprinting a distinct dendritic cell maturational profile. *Eur J Immunol*. 2015 Sep;45(9):2638-49
- [18] Cavalcanti E, et al. Administration of reconstituted polyphenol oil bodies efficiently suppresses dendritic cell inflammatory pathways and acute intestinal inflammation. *PLoS One*. 2014 Feb 18;9(2):e88898
- [19] Liso M, De Santis S, Scarano A, Verna G, Dicarolo M, Galleggiante V, Campiglia P, Mastronardi M, Lippolis A, Vacca M, Sobolewski A, Serino G, Butelli E, De Angelis M, Martin C, Santino A, Chieppa M. A Bronze-Tomato Enriched Diet Affects the Intestinal Microbiome under Homeostatic and Inflammatory Conditions. *Nutrients*. 2018 Dec 2;10(12)
- [20] De Santis S, Cavalcanti E, Mastronardi M, Jirillo E, Chieppa M. Nutritional Keys for Intestinal Barrier Modulation. *Front Immunol*. 2015 Dec 7;6:612.

Progetto n. 13: “Ruolo dei miRNA nella patogenesi delle malattie infiammatorie croniche intestinali: dal modello murino all’uomo”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: dott.ssa Grazia Serino

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 50µm (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.

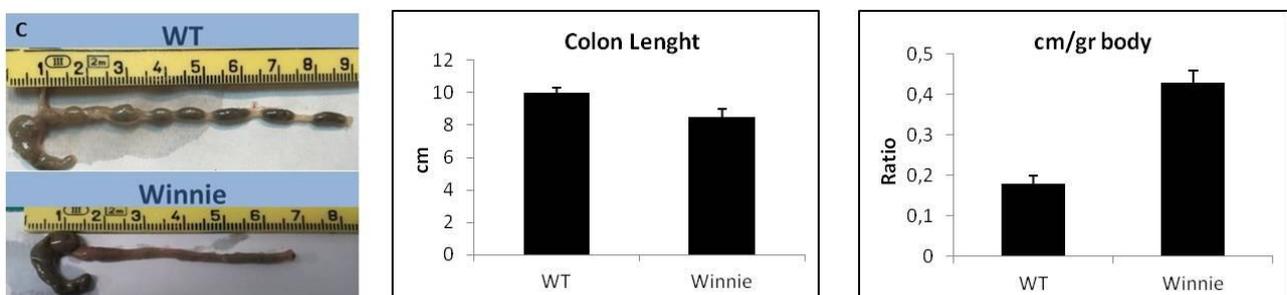
I pezzi di colon sono stati prelevati da 4 topi Winnie e 4 topi wild-type e sottoposti a digestione meccanica con il gentleMACS™ Dissociator ed enzimatica utilizzando il kit Lamina Propria Dissociation kit per topo (Miltenyi Biotec). La sospensione cellulare è stata in seguito utilizzata per selezionare 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.

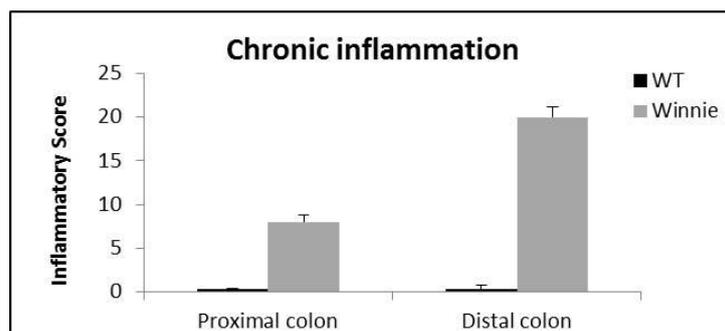
L'identificazione dei target dei miRNA è stata effettuata mediante l'utilizzo di diversi algoritmi bioinformatici tra cui miRBase 21.1 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>), TargetScan 7.1 (http://www.targetscan.org/vert_71/), miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), 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.



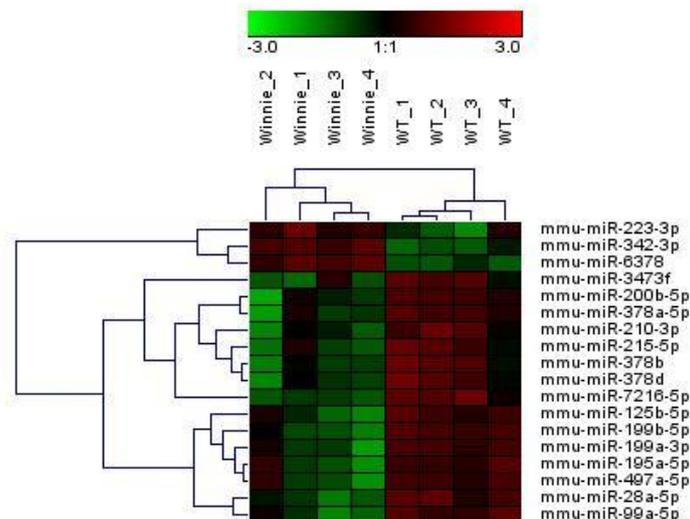
La parte prossimale e distale è stata fissata e colorata con ematossilina/eosina ed è stato valutato lo score infiammatorio. Lo score infiammatorio dei topi Winnie è più elevato rispetto anche ai wild-type sia nella porzione prossimale che distale.



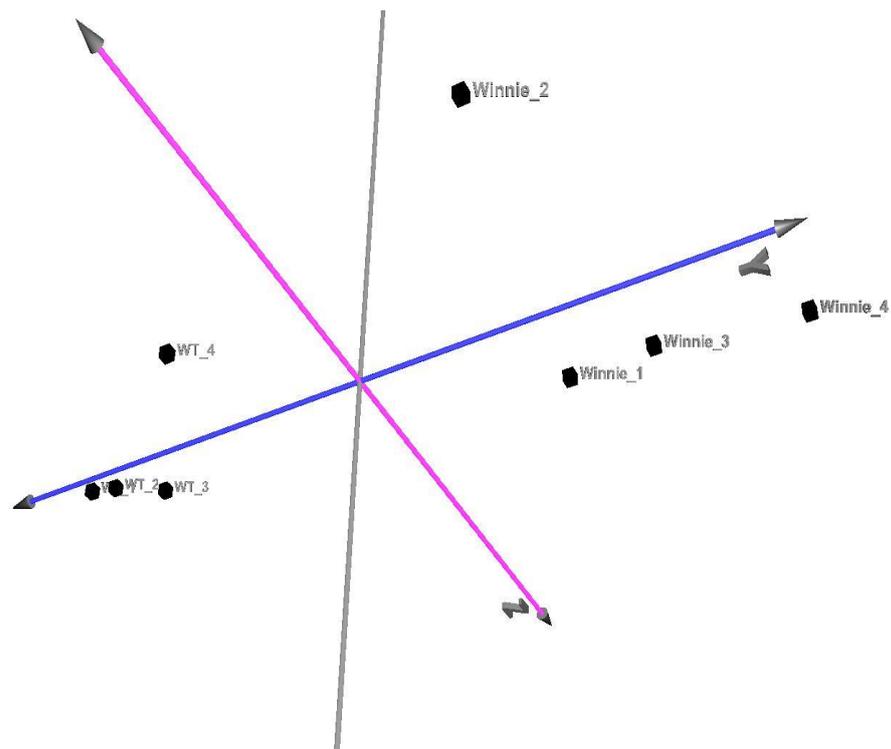
I tessuti di colon di topi Winnie e wild-type sono stati prelevati e utilizzati per l'isolamento delle cellule epiteliali da tessuto. Al fine di identificare i miRNA espressi nelle cellule epiteliali intestinali isolate da topi Winnie rispetto ai topi wild-type, è stato analizzato il loro totale profilo 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.



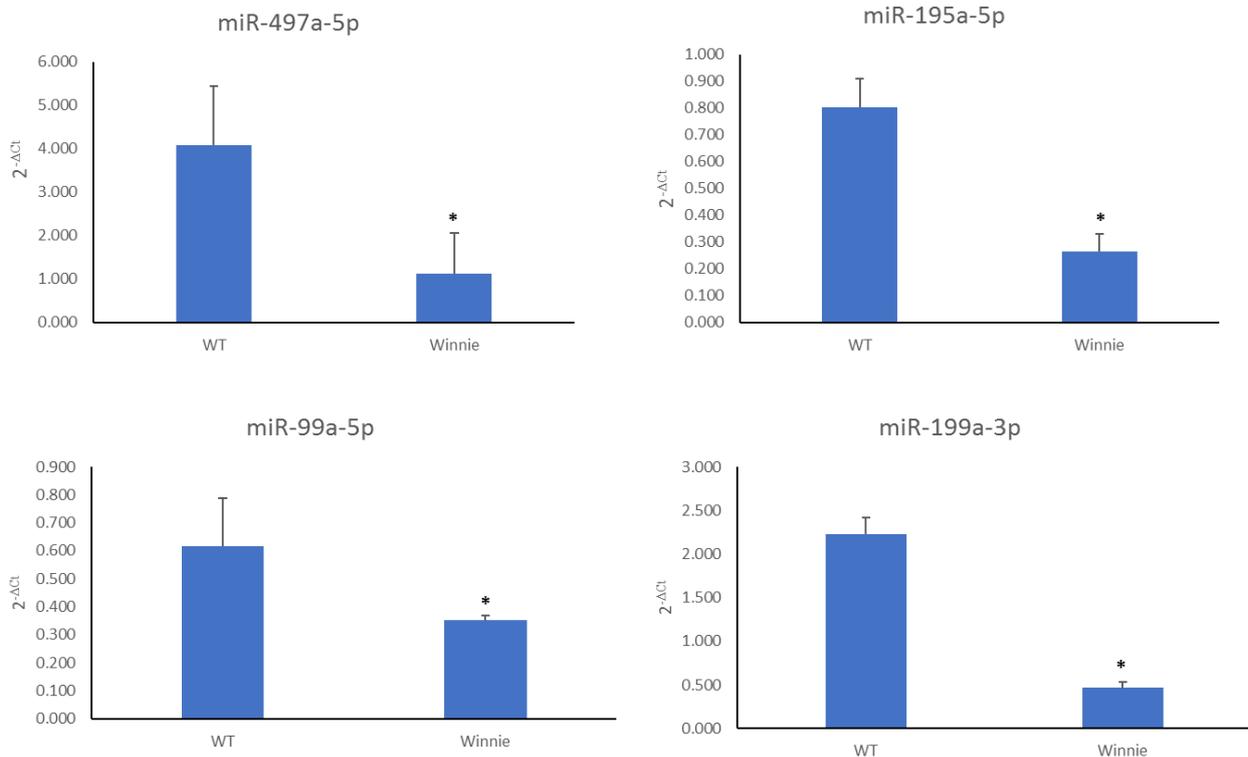
Hierarchical Clustering



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.

I dati ottenuti da microarray sono stati validati mediante l'utilizzo della Real-Time PCR su RNA estratto da cellule epiteliali intestinali di un gruppo indipendente di 4 topi Winnie e 4 topi wild-type. Tutti i miRNA analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo nell'espressione nelle cellule epiteliali isolate da topi Winnie rispetto a quelle isolate da topi wild-type, confermando i risultati del microarray (* $p < 0.01$).



Sono in corso gli studi funzionali per validare biologicamente l'interazione tra miRNA e i geni target individuati. Questi esperimenti sono rallentati dalle difficoltà nella messa in coltura delle cellule epiteliali intestinali da utilizzare per esperimenti di transfezione.

Parallelamente a questo progetto, ci siamo occupati di studiare il ruolo dei miRNA nella immunomodulazione mediata dalla quercetina.

Le cellule dendritiche sono le più potenti cellule presentanti l'antigene e svolgono un ruolo importante nella comunicazione tra la risposta immunitaria innata e la risposta immunitaria adattativa. È ormai noto il ruolo svolto dai miRNA nella regolazione dell'immunità innata. Precedenti studi hanno dimostrato che i miRNA regolano la capacità infiammatoria delle cellule dendritiche in molteplici condizioni come la differenziazione, la maturazione e la funzione delle cellule dendritiche.

Negli ultimi anni, diversi studi hanno dimostrato che alcune sostanze naturali come la quercetina possono ridurre l'attivazione delle cellule dendritiche in risposta al lipopolisaccaride (LPS). La quercetina, un flavonoide comunemente presente nei vegetali e nella frutta, possiede una vasta gamma di proprietà farmacologiche tra cui una forte azione anti-infiammatoria.

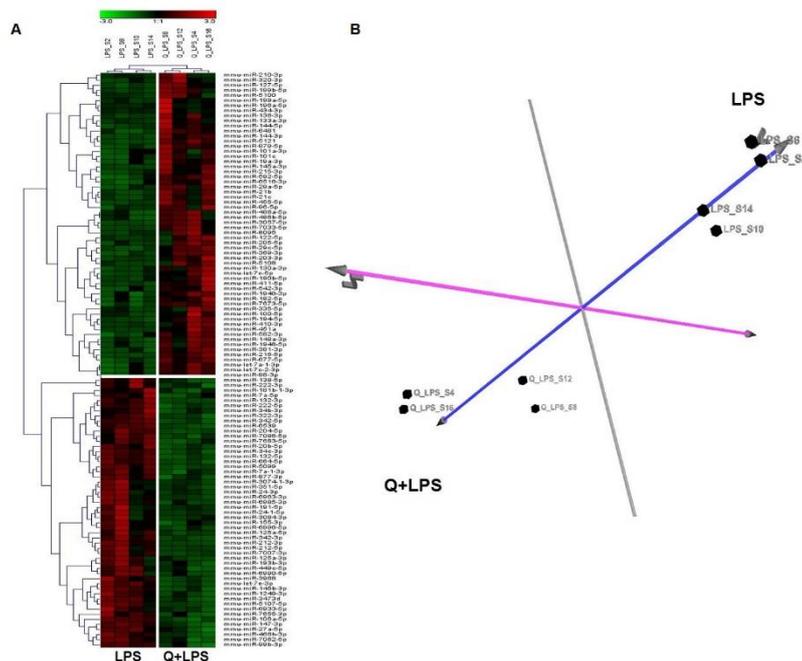
Studi recenti hanno dimostrato gli effetti immunosoppressivi della quercetina sulla funzione delle cellule dendritiche. Tuttavia, non è ancora stato chiarito il ruolo dei miRNA nella cascata di eventi che conduce all'effetto immunosoppressivo della quercetina nelle cellule dendritiche.

Pertanto, abbiamo studiato l'espressione dei miRNA in cellule dendritiche isolate da midollo osseo (BMDCs) stimulate con LPS dopo esposizione a quercetina. Per identificare i miRNA differenzialmente espressi nelle BMDC trattate con LPS ed esposte o meno alla quercetina, abbiamo analizzato il loro profilo di espressione globale mediante next generation sequencing. Le BMDC non trattate con quercetina sono state utilizzate come cellule di controllo.

Il numero di raw reads ottenute per campione varia da 19.887.893 a 28.765.373 (media = 23.470.539) con un quality score medio di 35.34. L'identificazione dei miRNA maturi è stata eseguita su tutti i campioni usando sRNAtoolbox (28). Una media di 730 miRNA maturi per ogni campione è stata riconosciuta con successo nel miRBase 21 (assembly mm9).

L'analisi dell'espressione differenziale tra le BMDC trattate con LPS esposte o meno alla quercetina ha rivelato che ci sono 113 miRNA differenzialmente espressi con $FDR \leq 0.05$ e fold change

threshold > 2). L'analisi del clustering ha generato un grafico che mostra due gruppi chiaramente separati. La separazione è stata ulteriormente confermata visualizzando le relazioni tra i pattern di espressione di miRNA utilizzando l'analisi delle componenti principali (PCA).

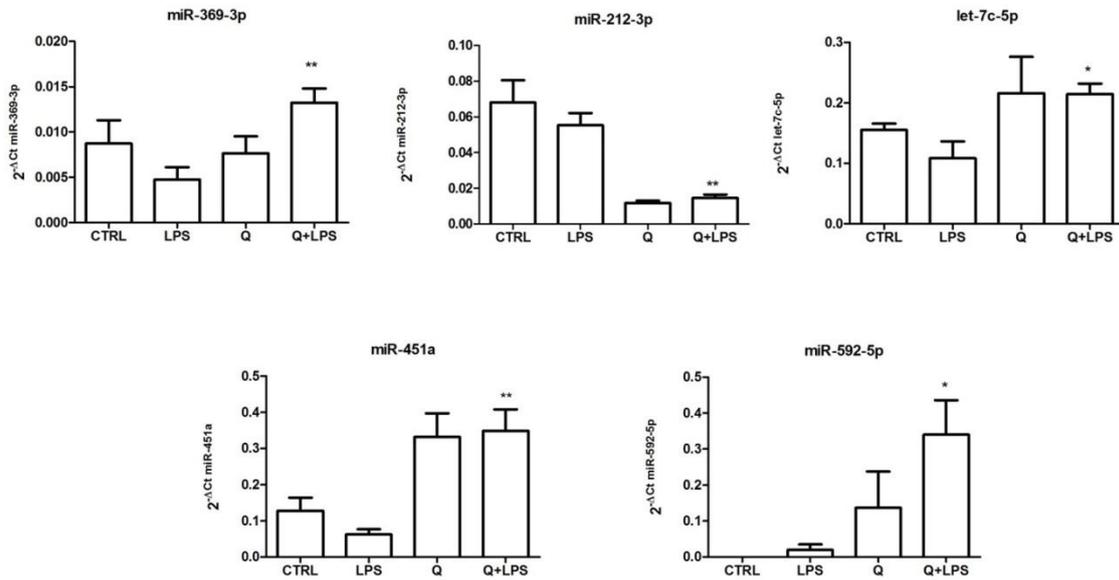


Allo scopo di studiare i meccanismi molecolari in cui sono coinvolti i miRNA differenzialmente espressi, abbiamo eseguito un'analisi bioinformatica per predire i geni bersaglio dei 113 miRNA trovati modulati. Per ridurre il numero di risultati falsi positivi, abbiamo utilizzato cinque diversi algoritmi e abbiamo elencato solo i geni putativi previsti da almeno due di essi.

Sulla base dei risultati dell'analisi bioinformatica, abbiamo identificato il miR-369-3p che potenzialmente regolava la proteina CCAAT / Enhancer β (C/EBP- β). Altri geni target del miR-369-3p erano geni del Fattore di Necrosi Tumorale (Tnf), Glicogeno Sintasi Chinasi 3 Beta (Gsk3b) e Sirtuin 1 (Sirt1).

L'analisi delle pathway regolate dai miRNA individuati ha generato una lista di 30 pathway con i geni più significativi in cui i 113 miRNA potrebbero essere coinvolti. Le pathway più significative erano quelle delle MAPK, Wnt, TGF-beta, dei recettori delle cellule T e delle chemochine. In particolare, all'interno di questi pathway, sono stati predetti più miRNA per gli stessi geni target e un singolo miRNA potrebbe colpire diversi geni cruciali. Ad esempio, miR-212-3p regola Hmgb1, let-7c-5p regola Il6 e Casp3, miR-451a regola Mif, c-Myc e Akt, miR-592-5p regola Osm.

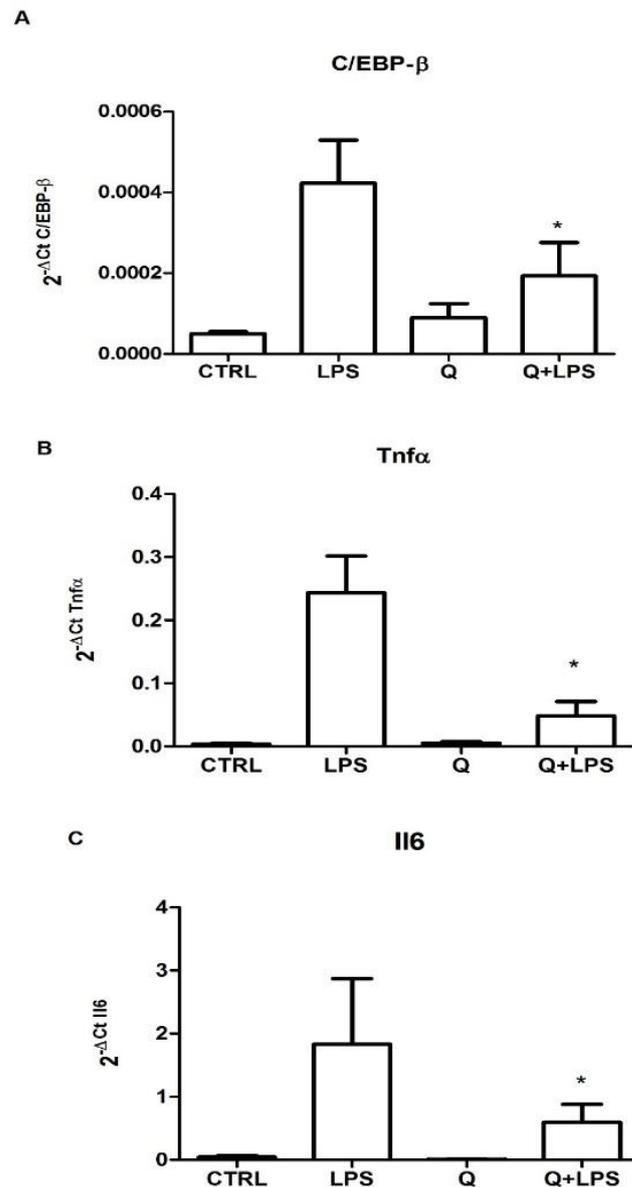
I risultati del sequenziamento sono stati validati con real-time PCR (q-RT-PCR) per miR-369-3p, miR-212-3p, let-7c-5p, miR-451a e miR-592-5p su miRNA isolati da BMDCs da un gruppo indipendente di 4 topi wild-type, esposti o meno alla quercetina e trattati con 1 μ g / mL di LPS. Tutti i miRNA analizzati hanno mostrato un cambiamento significativo dell'espressione nelle BMDCs stimolate con LPS dopo il trattamento con quercetina, confermando i risultati del sequenziamento.



Molti studi hanno dimostrato che la trascrizione del gene C/EBP- β è attivata da stimoli infiammatori, quali citochine e LPS batterico. I siti di legame C/EBP- β sono principalmente presenti nelle sequenze regolatorie di geni coinvolti nella risposta infiammatoria quali Il6, TNF α , Il1 β , Il12 e Mip1 α e lo stress del reticolo endoplasmatico.

L'analisi in silico ha mostrato che l'aumento del miR-369-3p, in seguito all'esposizione con quercetina, potrebbe causare una diminuzione di C/EBP- β e una conseguente riduzione del rilascio di citochine infiammatorie. Infatti, l'allineamento di sequenza del miR-369-3p murino (Chr12: 109,741,418-109,745,496) con la regione 3'-non tradotta (UTR) del C/EBP- β ha identificato un sito di legame (nucleotidi 381-388 nel topo C/EBP- β) che è ben conservato tra le diverse specie.

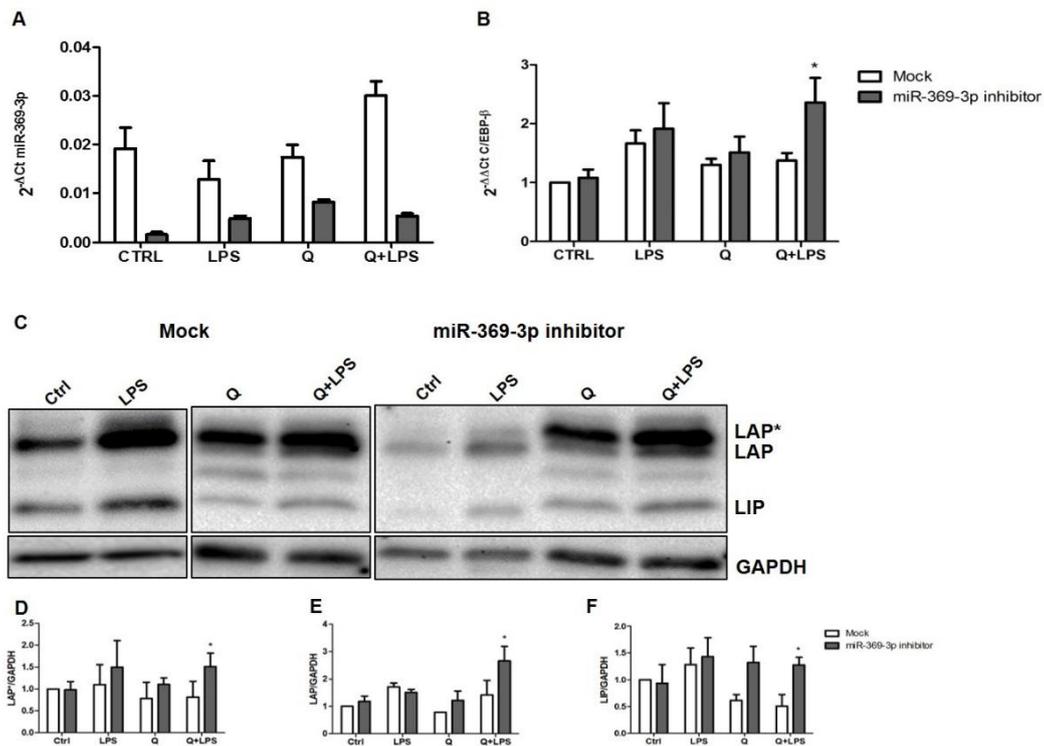
Successivamente abbiamo valutato i livelli di espressione di mRNA di C/EBP- β mediante qRT-PCR nello stesso set di campioni di RNA usati negli esperimenti di validazione. Abbiamo trovato che i livelli di C/EBP- β erano significativamente inferiori nelle BMDCs stimolate con LPS dopo il trattamento con quercetina ($p < 0.03$, Figura S2A). Allo stesso modo, abbiamo studiato due geni bersaglio regolati da C/EBP- β , il TNF α e Il6. Anche questi geni, come C/EBP- β , erano significativamente più bassi dopo trattamento con quercetina.



Il legame tra funzione della quercetina e miR-369-3p non è mai stato caratterizzato dal punto di vista funzionale; per valutare se il miR-369-3p fosse in grado di modulare realmente l'espressione del gene C/EBP- β abbiamo eseguito esperimenti di transfezione transiente usando BMDCs isolate da un gruppo indipendente di quattro topi wild-type, trattate per 4 giorni con quercetina e successivamente stimulate con LPS.

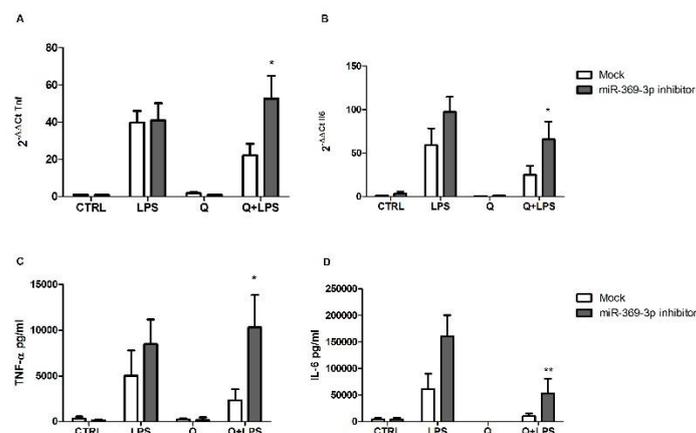
Abbiamo inibito l'attività di miR-369-3p con un miRNA inhibitor sintetico in BMDCs stimulate con LPS esposte o meno alla quercetina, come mostrato nella Figura A. La trasfezione delle BMDCs con 75 nM di inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento statisticamente significativo dei livelli di mRNA di C/EBP- β endogeno rispetto ai controlli (mock) ($p = 0,03$, Figura B).

Inoltre, abbiamo valutato se anche l'espressione della proteina C/EBP- β fosse controllata dal miR-369-3p. Le BMDC stimulate con LPS, esposte o meno alla quercetina, sono state transfettate in maniera transiente con 75 nM di inibitore miR-369-3p, le proteine sono state estratte e analizzate mediante analisi Western blot utilizzando un anticorpo C/EBP-Beta specifico C-terminale che riconosce tutte e tre le isoforme della proteina. La transfezione transitoria con l'inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento statisticamente significativo della proteina C/EBP- β (Figura C) e di tutte e tre le isoforme (Figura D-E-F).



L'attività antinfiammatoria della quercetina nelle BMDC è stata descritta precedentemente. Diversi studi hanno dimostrato che la quercetina è un potente agente immunosoppressore in grado di sopprimere la risposta infiammatoria nelle BMDC. In effetti, è stato dimostrato che la quercetina inibisce la produzione di una varietà di citochine pro-infiammatorie e chemochine prodotte dalle BMDC stimulate con LPS.

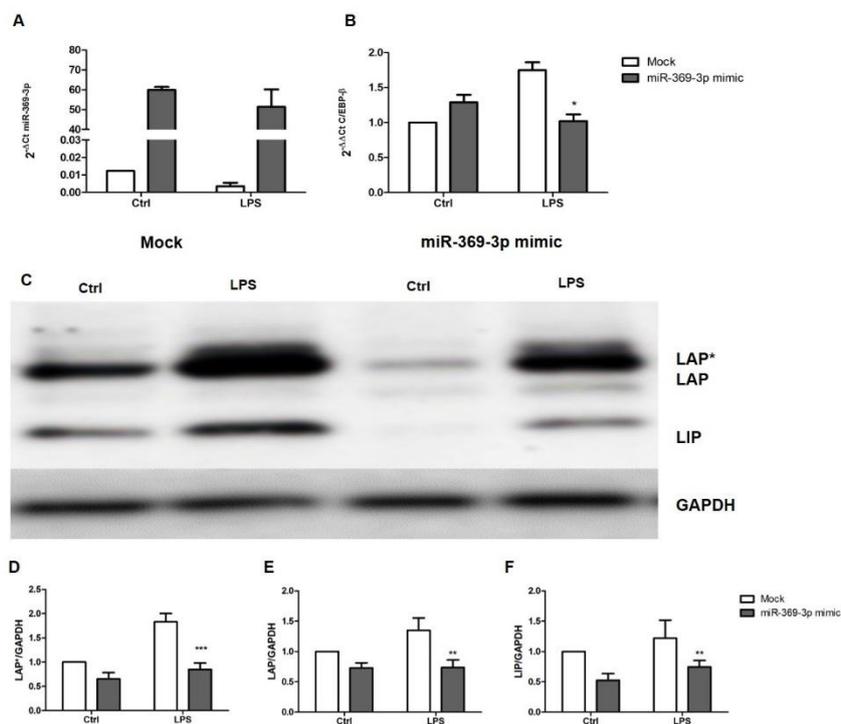
Per confermare ulteriormente il legame tra l'espressione mediata dalla quercetina del miR-369-3p e le proprietà anti-infiammatorie della quercetina stessa, abbiamo testato se l'inibizione di miR-369-3p influenzasse il rilascio di citochine infiammatorie anche dopo trattamento con quercetina. La trasfezione delle BMDC con 75 nM di inibitore miR-369-3p ha determinato un aumento dell'espressione di mRNA di TNF α e Il6 ($p < 0.05$, Figura A-B). Di conseguenza, dopo il trattamento con la quercetina, le BMDC transfettate con l'inibitore miR-369-3p hanno maggiormente prodotto le citochine infiammatorie, TNF α e IL6 nel surnatante ($p < 0.05$, Figura C-D).



Per confermare ulteriormente il ruolo del miR-369-3p come mediatore dell'attività anti-infiammatoria della quercetina, abbiamo eseguito un ulteriore esperimento di trasfezione transiente

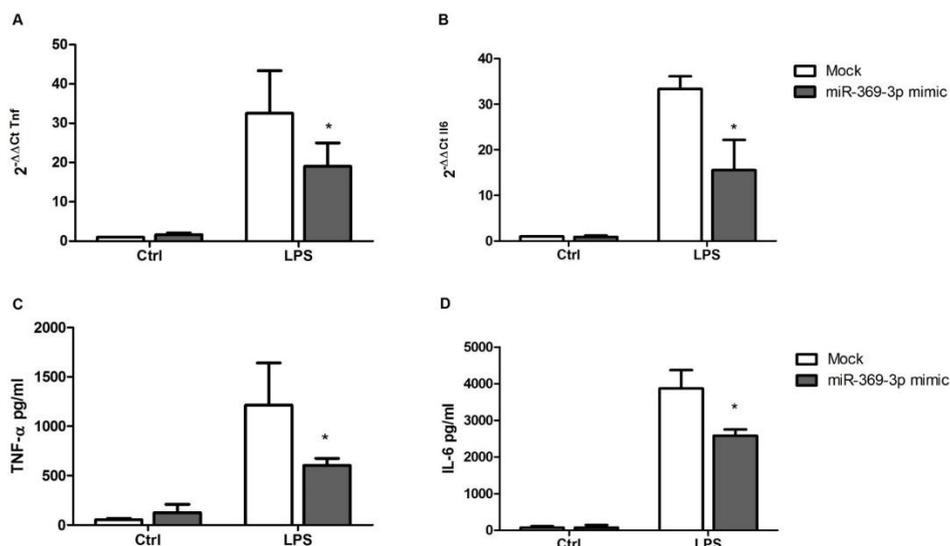
in cui è stata utilizzata una sequenza di RNA breve in grado di mimare l'azione di miR-369-3p. Le BMDCs isolate da un gruppo indipendente di quattro topi wild-type e stimulate con LPS sono state transfettate con 50 nM del mimic miR-369-3p. Come mostrato nella Figura A, dopo la trasfezione, i livelli di miR-369-3p erano aumentati in tutte le condizioni.

In particolare, l'espressione del gene target del miR-369-3p di C/EBP- β era significativamente ridotta nelle BMDCs stimulate con LPS dopo trasfezione con miR-369-3p mimic rispetto al controllo (mock) ($p < 0,01$, Figura B). Inoltre, abbiamo confermato l'espressione della proteina C/EBP- β nelle BMDCs isolate da altri quattro topi wild-type e transfettate con miR-369-3p mimic. L'aumento transitorio dei livelli di miR-369-3p nelle BMDC ha determinato una notevole riduzione dell'espressione della proteina C/EBP- β in tutte e tre le isoforme come rivelato da Western blot (Figura C-D-E-F).



Per verificare l'ipotesi che la upregolazione del miR-369-3p inibisca la produzione di citochine di fase acuta come TNF α e IL6, abbiamo transfettato in maniera transiente le BMDCs stimulate con LPS con 50 nM di miR-369-3p mimic. L'espressione di mRNA di TNF α e di IL6 risultava essere significativamente ridotta dopo la trasfezione rispetto al controllo (mock) ($p < 0.05$, Figura A-B). Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dai dati ELISA sul surnatante ottenuto dalle BMDCs stimulate con LPS dopo trasfezione con mimic. Infatti, a livelli di miR-369-3p più elevati, il rilascio di TNF α e IL6 era ridotto ($p < 0.05$, Figura C-D).

Complessivamente, i nostri risultati dimostrano che la up-regolazione del miR-369-3p dopo l'esposizione alla quercetina è responsabile della riduzione di C/EBP- β e quindi del rilascio delle citochine TNF α e IL6.



I risultati di questa parte del progetto sono oggetto di un paper sottomesso alla rivista *Molecular Nutrition & Food Research*. Inoltre, è stato depositato un brevetto italiano dal titolo “Composizione farmaceutica comprendente come ingrediente attivo il miR-369-3p per il trattamento delle patologie infiammatorie croniche” e siamo in attesa del parere preliminare di brevettabilità da parte dei revisori.

Sono in corso altri studi funzionali in vivo per dimostrare che il miR-369-3p è il mediatore della risposta infiammatoria cronica anche a livello intestinale.

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.

Progetto n. 14: “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”

Responsabile: dott.ssa Alba Panarese

Partecipanti: dott.ssa Maria Principia Scavo

REPORT:

Il carcinoma del colon retto è una delle più comuni cause di morte al mondo relative alle malattie oncologiche in entrambi i sessi, mentre il carcinoma gastrico, sta aumentando nella popolazione dell'emisfero occidentale, quindi anche in Italia, per questo motivo abbiamo preso in analisi entrambe le patologie oncologiche. Lo sviluppo di nuovi metodi di screening per la diagnosi precoce è fondamentale per ridurre la mortalità e per rendere efficace la prevenzione e i trattamenti prima della progressione della malattia. In questa prospettiva abbiamo lavorato per cercare biomarkers relativi a questa patologia nei fluidi biologici, soprattutto plasma. In diversi studi si è analizzato il potenziale di trasferimento del messaggio neoplastico di alcune vescicole (EVs) presenti nei fluidi biologici, rappresentato da mRNA, DNA e proteine, che vengono studiate per il rilascio da parte delle cellule tumorali e che potrebbero essere usate nella diagnostica per la determinazione precoce della malattia. In questo lavoro abbiamo focalizzato la nostra attenzione nell'utilizzo della Frizzled-10 (FZD-10) presente nelle EVs isolate dal plasma dei pazienti affetti da Carcinoma del colon e il carcinoma gastrico sporadici a differenti stages con differente eziologia e progressione, e con differenti trattamenti chirurgici e farmacologici. Le proteine Frizzled (FZD) sono una famiglia di proteine di membrana che giocano un ruolo fondamentale come recettori nella cascata del segnale regolato dal Wnt. Numerosi studi hanno dimostrato un ruolo delle FZDs nella progressione maligna di vari carcinomi umani. In questo progetto le EVs isolate dal plasma di soggetti sani e oncologici, sono stati ampiamente caratterizzati in termini di grandezza, morfologia e carica elettrica di membrana, mediante TEM, SEM e DLS. Successivamente abbiamo accertato la presenza di FZD-10 e i livelli di questa proteina nelle EVs mediante un'analisi semi quantitativa densitometrica, associandola anche all'analisi delle proteine tipiche delle EVs quali HSP-70, ALIX e CD-63. I risultati ottenuti mediante Western Blotting dall'isolamento della proteina da EVs

provenienti da soggetti sani e pazienti affetti da Carcinoma coloretale o carcinoma gastrico, indicano che in tutti i casi investigati i livelli di FZD-10 risultavano essere più alti nei pazienti rispetto ai soggetti sani, indicando una chiara condizione patologica. Interessante è stato notare come nei pazienti dichiarati esenti da malattia, previo intervento chirurgico e terapia oncologica, i valori di FZD-10 estratto dalle EVs plasmatiche risultava essere paragonabile ai soggetti sani. Inoltre, in questo nostro progetto abbiamo dimostrato che la quantità di proteina FZD-10 trovata nelle EVs rappresenta tutta la quantità della stessa proteina che si potrebbe estrarre dal plasma intero. Quindi i risultati dimostrano che i livelli di proteina plasmatica di FZD-10 rappresentano un potenziale biomarker con un ruolo di valutazione prognostica per la diagnosi precoce del carcinoma del colon retto e il monitoraggio della risposta ai trattamenti.

MATERIALI E METODI:

Pazienti: Abbiamo arruolato per il Carcinoma del colon retto in totale 22 pazienti, 8 donne e 14 maschi, rispondenti tutti ai criteri di inclusione (Tabella 1), 8 pazienti con carcinoma gastrico, 5 maschi e 3 femmine e 12 donatori sani 10 maschi e 2 femmine che hanno firmato tutti il consenso informato.

COLORECTAL CANCER	AGE	SEX	DIAGNOSIS	STAGE TNM	STAGE AJC	GRADING	LIVER METASTASIS
1	71	m	CRC	pT1N0M0	I	G1	N
2	90	f	CRC	pT1N0M0	I	G1	N
3	59	m	CRC	pT2N0M0	I	G1	N
4	90	f	CRC	pT2N0M0	I	G2	N
5	71	f	CRC	pT2N0M0	I	G2	N
6	73	m	CRC	pT2N0M0	I	G2	N
7	49	m	CRC	pT2N1bM0	IIIA	G3	N
8	68	f	CRC	pT2N1bM0	IIA	G2	N
9	78	f	CRC	pT2N0M0	I	G2	N
10	72	m	CRC	pT3N0M0	IIA	G2	N
11	63	m	CRC	pT3N2aM1	IVA	G3	Y
12	77	m	CRC	pT3N0M0	IIA	G2	N
13	82	m	CRC	pT3N1bM0	IIIB	G2	N
14	72	m	CRC	pT3N2aM1	IVA	G2	Y
15	66	m	CRC	pT3N0M0	IIA	G2	N
16	70	f	CRC	pT3N0M1	IIA	G2	N
17	59	m	CRC	pT4aN2aM1	IVA	G2	Y
18	72	m	CRC	pT4aN2aM1	IVA	G2	Y
19	71	m	CRC	pT4aN2bM1	IVA	G2	Y
20	79	f	CRC	pT4bN2bM0	IIIC	G2	N
21	69	m	CRC	pT4aN1aM1	IVA	G2	Y
22	67	f	CRC	pT4bN1bM0	IIIB	G2	N
GASTRIC CANCER							
1	72	m	GC	pT4aN0M0	IIIB	G2	N
2	73	m	GC	pT4bcN3M1	IV	G3	Y
3	76	m	GC	pT4aN1M1	IV	G2	Y
4	65	f	GC	pT3N0M0	II	G2	N
5	67	f	GC	pT4aN1aM1	IV	G2	Y
6	54	m	GC	pT4aN2aM1	IV	G2	Y
7	63	m	GC	pT4aN1M1	IV	G2	Y
8	71	f	GC	pT4aN1bM1	IV	G2	Y

Tabella: Caratteristiche dei pazienti arruolati

Estrazione delle vescicole extracellulari (EVs)

Il plasma di ogni soggetto è stato processato per ottenere le EVs. Brevemente: Il sangue raccolto in tubi con EDTA dei soggetti campioni, è stato centrifugato e il sovrantante rappresentante il plasma processato con ultracentrifugazione a 100000 g per ottenere il pellet, rappresentato dalle EVs, che sono state immediatamente caratterizzate al DLS per le dimensioni e il potenziale di membrana. Successivamente sono state congelate a -80° fino all'estrazione e caratterizzazione delle proteine.

DYNAMIC LIGHT SCATTERING (DLS) E POTENZIALE-Z

La valutazione delle dimensioni delle EVs, della stabilità del diametro idrodinamico è stata effettuata diluendo le EVs in una soluzione acquosa di KCl (1mM), con strumentazione Zetasizer Nano ZS, Malvern Instrument Ltd.

Estrazione delle proteine e quantificazione da plasma delle vescicole extracellulari.

Dopo l'isolamento le EVs sono state omogenate con RIPA buffer contenente inibitore di proteasi e la concentrazione delle proteine ottenute è stata misurata mediante la soluzione di Bradford. Successivamente, le proteine sono state quantificate mediante Immuno-Blotting, utilizzando i seguenti anticorpi: anticorpo policlonale anti-FZD-10 (abcam), anti-HSP-70 (abcam), anti-ALIX (abcam), Anti -GAPDH (Santa Cruz), e le proteine sono state rilevate mediante reazione con corrispondente anticorpo coniugato con HRP e rilevato con strumentazione Bio-rad Chemidoc XRS.

Analisi al Microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

Le EVs sono state caratterizzate morfologicamente utilizzando il TEM Jeol JEM-1011, lavorando ad un voltaggio accelerato di 100 kV. Le immagini sono state acquisite con Olympus Quemesa Camera (11 Mpx). Ogni campione è stato preparato utilizzando acido fosfotungstenico per 5 secondi e dopo lavaggio in acqua ultra-pura, deposte in griglie e stoccate sotto vuoto fino all'osservazione.

Analisi al microscopio a scansione (FE-SEM).

La sospensione acquosa di EVs è stata depositata su chip in silicone e processata per le procedure di fissazione con una soluzione di 2,5% di glutaraldeide in PBS e successivamente il campione è stato disidratato con concentrazioni scalari di etanolo. Dopo, si è proceduto ad una copertura di Oro di pochi nanometri, usando una pompa turbomolecolare SC/7620 Mini Sputter/Glow Discharge System of Quorum Technologies, per garantire una limitazione degli artefatti e il danno precoce delle vescicole durante l'analisi al FE-SEM, effettuata con microscopio Zeiss Sigma, lavorando con tensione elettronica alta (EHT) a 0,5-20kV.

RISULTATI:

Caratterizzazione delle vescicole

In figura 1 riportiamo le immagini del TEM e del SEM, che ci portano ad osservare una differenza significativa in termini di dimensioni ($p > 0,05$), fra i campioni dei pazienti con Carcinoma rispetto al normale. Le nanostrutture ottenute, dimostrano oltre che le dimensioni anche la forma delle EVs, che appaiono rotondeggianti con una membrana a doppia struttura fosfolipidica.

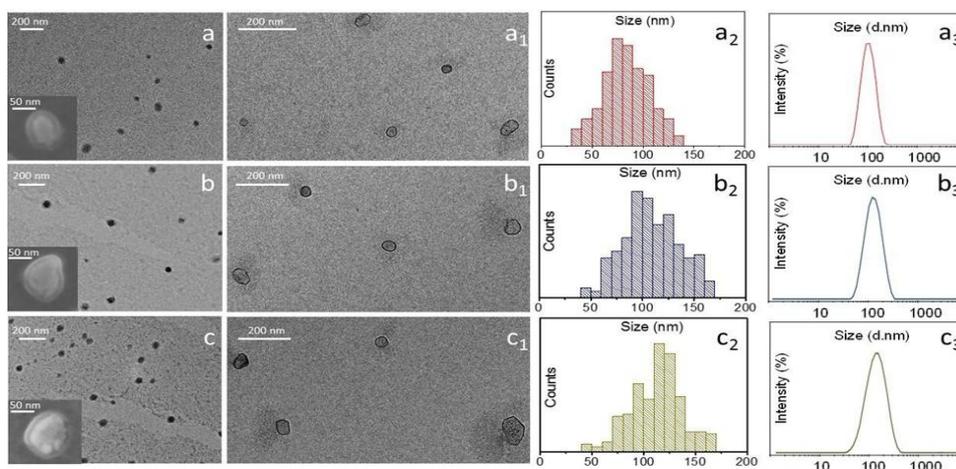


Figura 1 Analisi TEM, SEM e DLS delle EVs da soggetti sani e oncologici.

Dosaggio delle proteine mediante Western Blotting

In figura 2 osserviamo i livelli di FZD-10 sia nei pazienti oncologici che nei soggetti sani.

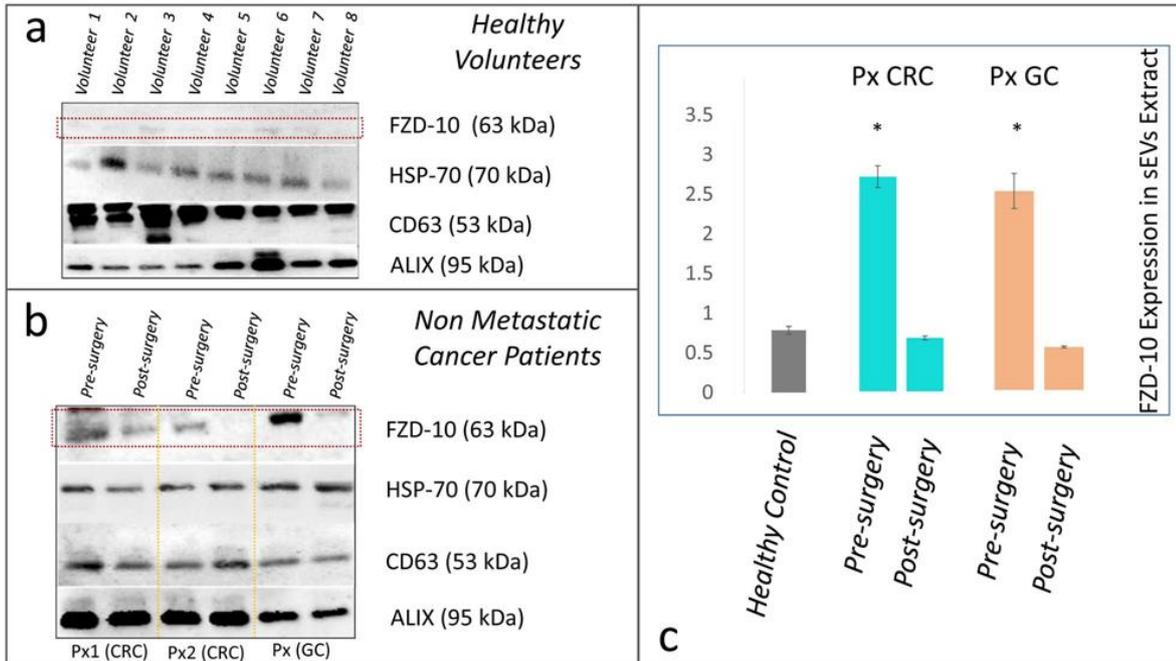


Figura 2: livelli di FZD-10 normalizzati per HSP-70 nei soggetti sani e affetti da carcinoma del colon retto non metastatico prima e dopo intervento chirurgico.

Quello che osserviamo nei livelli di espressione della proteina nei soggetti sani è una quasi totale assenza nei soggetti sani, che si incrementa nei pazienti prima dell'intervento, e che ritorna ai livelli normali di espressione nei pazienti ormai esenti da malattia, durante la rivalutazione al 30° giorno sia per il carcinoma gastrico che per il carcinoma coloretale.

Nei pazienti metastatici, sottoposti ad intervento chirurgico si osserva una diminuzione dell'espressione della proteina, che però rimane superiore ai valori normali, e che dopo il primo ciclo di chemioterapia rientra nei valori normali sia nel Carcinoma coloretale che nel carcinoma gastrico.

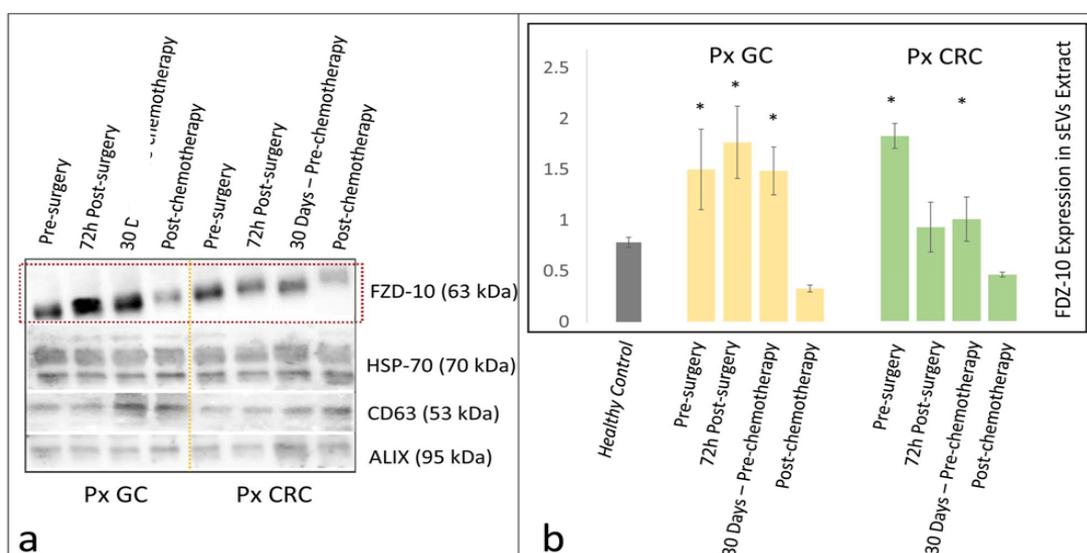


Figura 3: livelli di FZD-10 normalizzati per HSP-70 nei soggetti affetti da carcinoma del colon retto metastatico prima e dopo intervento chirurgico e prima e dopo il primo ciclo di chemioterapia.

Abbiamo valutato la presenza della proteina FZD-10 nel plasma intero sia dei volontari sani che dei soggetti oncologici, ed in contemporanea abbiamo valutato la presenza della proteina anche nel plasma deprivato di EVs. Abbiamo riscontrato la completa assenza della proteina, nel plasma che non conteneva più EVs per tutti i soggetti, mentre nel plasma intero di tutti i soggetti malati, la proteina era presente (Figura 4), nella stessa misura in cui la contenevano gli EVs.

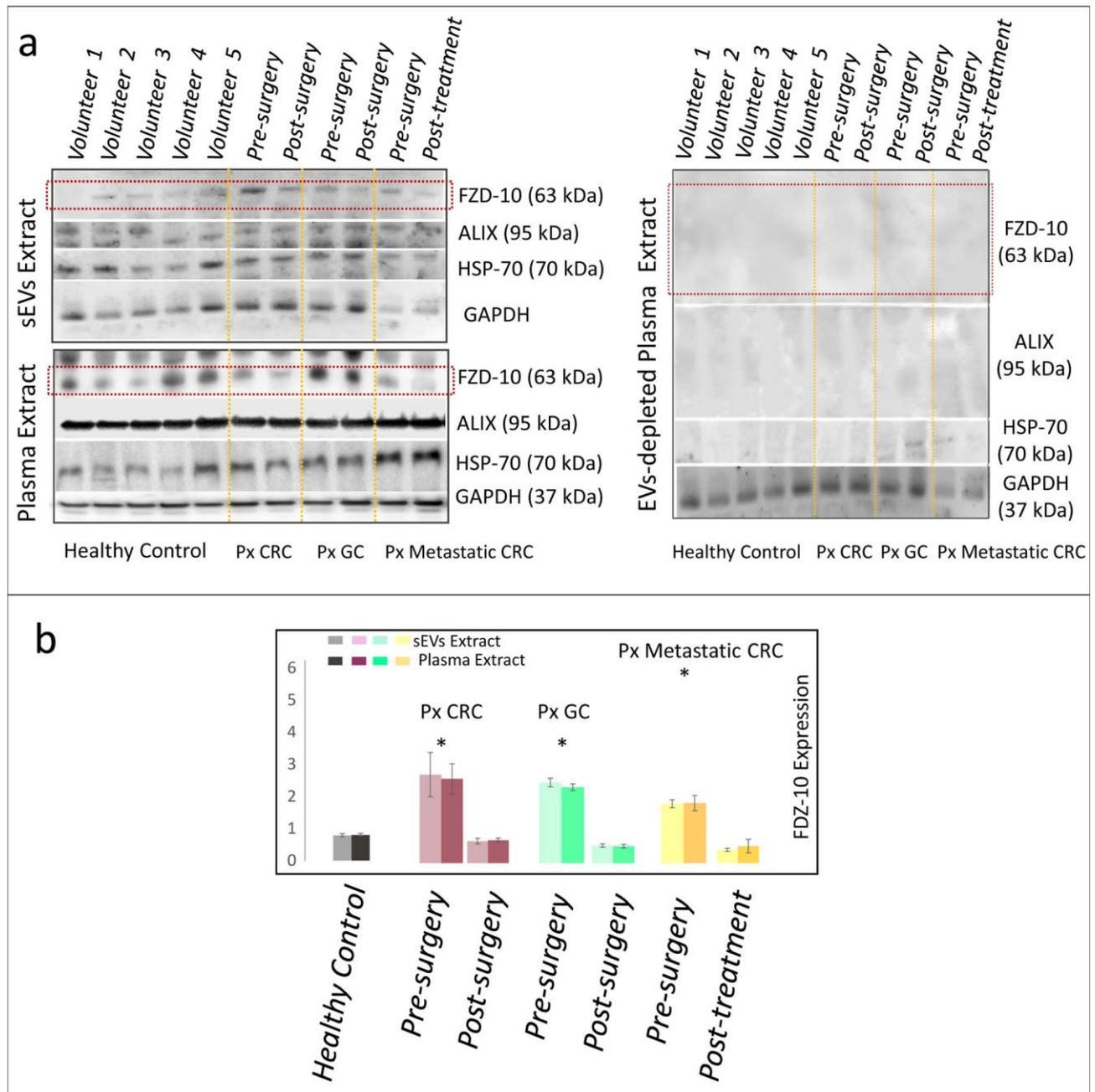


Figura 4: espressione della proteina FZD-10 nelle EVs, nel plasma intero e nel plasma deprivato di EVs, sia nei soggetti sani, sia nei patologici con tumore primario sia nei pazienti metastatici.

Discussione

Il progetto che abbiamo fin qui descritto possiamo considerarlo rilevante al fine di spiegare le proprietà in termini di espressione della proteina FZD-10, morfologia e carica di superficie nelle

EVs del plasma che si diversificano fra i pazienti e i soggetti sani. La grandezza delle Evs così come riportato in letteratura, anche nei nostri campioni varia, in base alla presenza o meno della malattia, inoltre anche la forma sferoidale, con una doppia membrana fosfolipidica, è ascrivibile a nanostrutture chiamate con più precisione esosomi.

Molto interessanti da un punto di vista diagnostico, sono i risultati ottenuti mediante l'analisi di Western blotting sulle EVs isolate da soggetti sani e patologici, indicanti che i livelli di FZD-10 nei pazienti oncologici sono molto più alti rispetto ai livelli dei soggetti sani, indicando che i livelli della proteina sono un chiaro indicatore delle condizioni patologiche. Abbiamo inoltre dimostrato come anche nell'ambito dello stato patologico ci possono essere delle variazioni di espressione che dipendono dallo stadio della malattia, dall'intervento ricevuto dal paziente e dalla terapia farmacologica messa in atto. Considerando quanto detto, la proteina FZD-10 rispetto a questi dati preliminari può essere considerata una proteina indicatrice dello stato della malattia, e favorevolmente considerata come una nuova proteina utile nel monitoraggio e nel follow-up dei pazienti considerati esenti da patologia, dopo intervento chirurgico. Questo studio ha portato ad ottenere una pubblicazione scientifica su **Journal Of Oncology**, (accettata per la pubblicazione in data 31/03/2019 dal titolo: **FRIZZLED-10 EXTRACELLULAR VESICLES PLASMA CONCENTRATION ARE ASSOCIATED WITH TUMORAL PROGRESSION IN PATIENTS WITH COLORECTAL AND GASTRIC CANCER. Autori:** Scavo Maria Principia, Cigliano Antonio, Depalo Nicoletta, Fanizza Elisabetta, Bianco Maria Grazia Denora Nunzio, Laquintana Valentino, Curri Maria Lucia, Lorusso Dionigi, Lotesoriere Claudio, Panarese Alba and Giannelli Gianluigi). Per gli studi futuri, si vorrà ampliare la coorte di pazienti, validando le considerazioni fin qui ottenute, ed eventualmente ampliando la possibilità di applicare il metodo ad altri tipi di cancro, quali, il carcinoma pancreatico, l'epatocarcinoma e il colangiocarcinoma.

Progetto n. 15: “Effetto dei composti naturali sull’ infiammazione e carcinogenesi sperimentale in modelli animali di CAC e CRC”

Responsabile: Dott. Mauro Mastronardi

Partecipanti: dott.ssa Angela Tafaro

BACKGROUND

Numerosi studi clinici, hanno recentemente evidenziato che un corretto stile di vita associato ad una sana alimentazione è di fondamentale importanza nel prevenire l'insorgenza di diverse malattie.

Il Cancro del colon-retto è un tumore maligno riconosciuto come il terzo tumore più comune in tutto il mondo con alta morbilità e mortalità (Haggar e Boushey, 2009).

Il presente progetto si propone di testare per la prima volta gli effetti benefici di estratti polifenolici isolati dalle foglie d'ulivo, che non vengono utilizzate nei processi produttivi andando a costituire normalmente scarti di potatura. La scelta di questi estratti oltre a presentare un'opportunità clinica interessante risulta rilevante ed ecosostenibile e finalizzata a valorizzare cultivar locali particolarmente ricche di polifenoli (es. Coratina). Il presente studio consentirà di definire non solo gli effetti antiinfiammatori, antiossidanti e anti tumorali di questi estratti ma la loro efficacia in combinazione ad un altro composto di origine naturale: la curcuma. Lo studio consentirà di delineare nuove strategie alimentari, tese a migliorare lo stato di salute e ridurre la probabilità di insorgenza del tumore al colon retto e proporre, eventualmente una dieta mirata a mitigare i danni molecolari e cellulari che si manifestano quando la malattia è già presente.

OBIETTIVI

Nel secondo anno di attività sperimentale per tale progetto di ricerca abbiamo avuto necessità di estendere *l'obiettivo specifico 1* per approfondire le indagini *in vitro* dell'effetto dei composti naturali. Avendo avuto buoni risultati nell'anno precedente con le cellule Caco-2, era necessario valutare la risposta della esposizione alla *Curcuma longa* in altre linee cellulari. In quanto la decisione comune del gruppo di lavoro è stata di dedicare una pubblicazione con i dati ottenuti *in vitro*, con successiva pubblicazione dei dati *in vivo*. A tale scopo, come modello sperimentale sono state utilizzate le cellule tumorali umane di adenocarcinoma colon-rettale quali: le DLD-1, le HT-29 e le SW480.

Anche per queste cellule, come per le Caco-2, è stato necessario valutare la dose di curcuma con la maggiore risposta antiproliferativa ed apoptotica *in vitro*.

La prima indagine è stata effettuata con il test dell'MTT, abbiamo sperimentato diversi tempi di incubazione a 24h e 48h. Nello specifico, le cellule DLD-1, HT-29, sono state incubate con quattro diverse concentrazioni di curcumina (10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M) come mostrato nei grafici di figura n.1.

Poiché il gap di risposta tra la concentrazione 20 μ M e 50 μ M era notevole, abbiamo preferito ripetere la sperimentazione con una concentrazione intermedia di curcuma, ovvero a 30 μ M, come mostrato nei grafici di figura n.2.

FIG:1

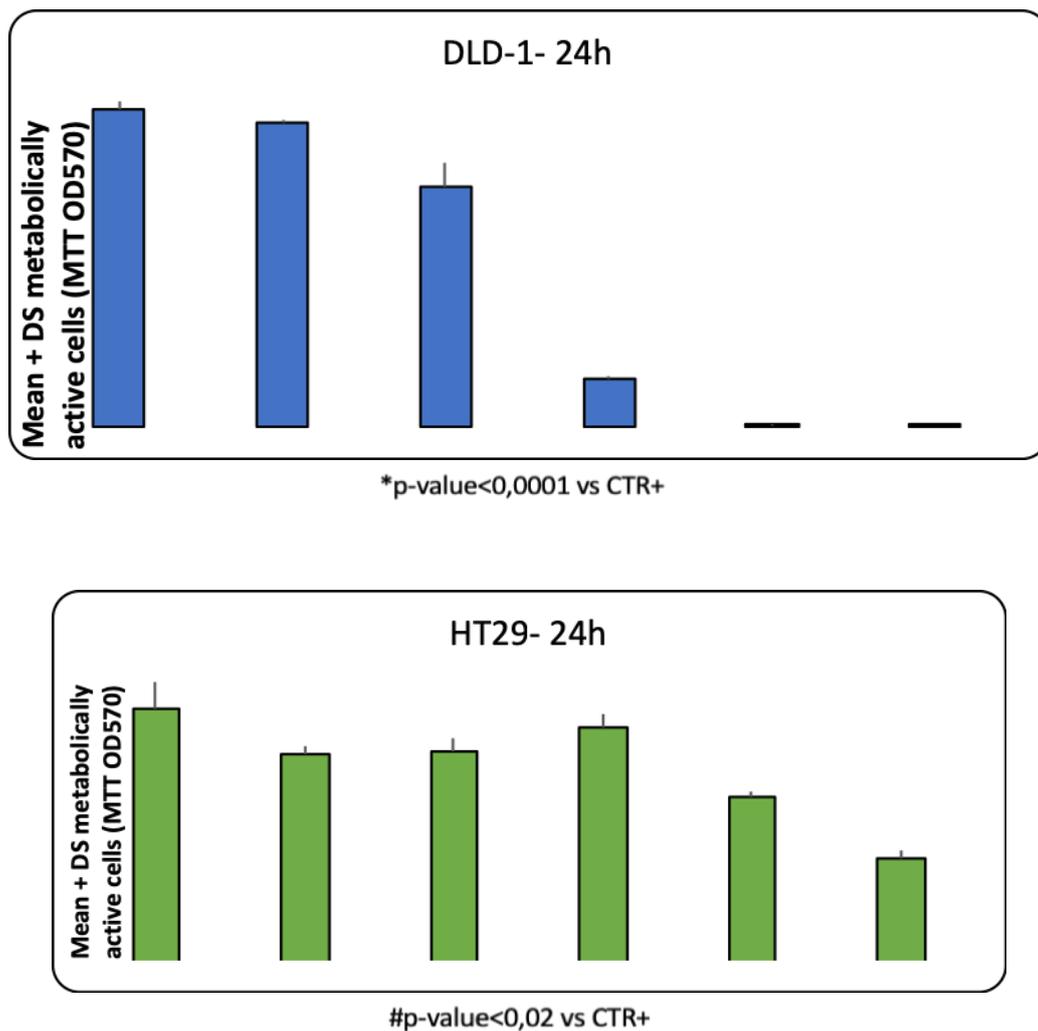


FIG.2

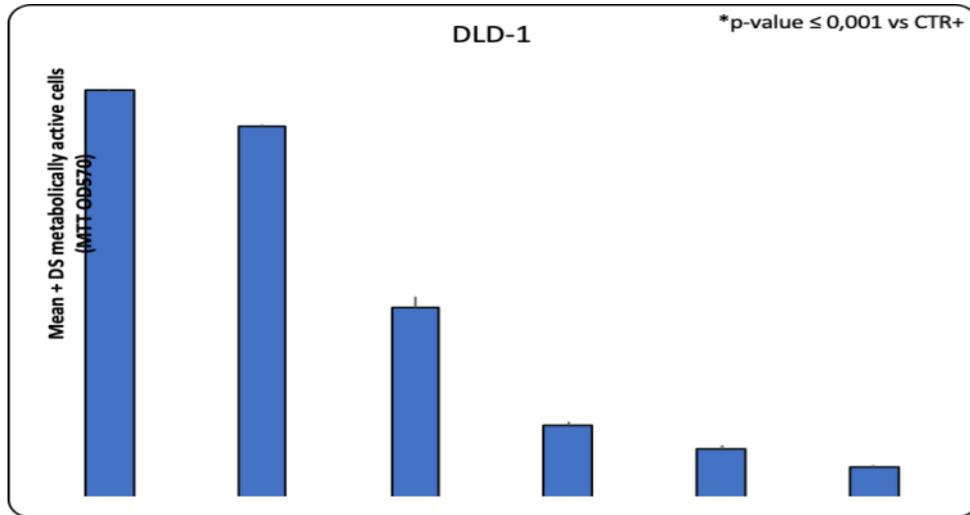
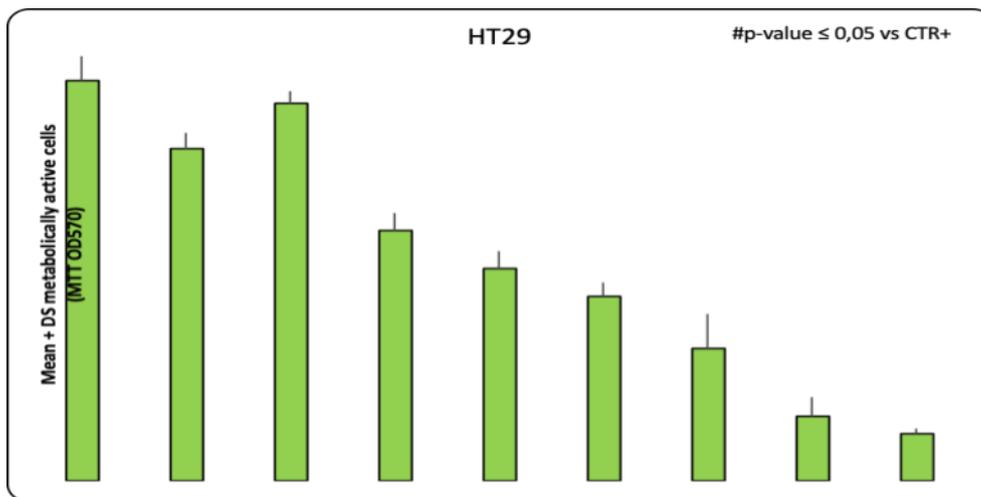
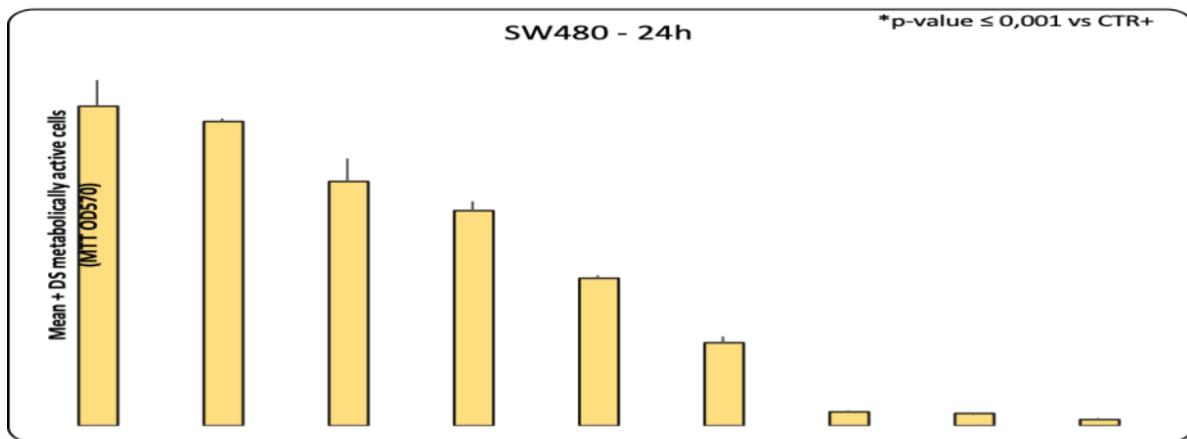


FIG.3



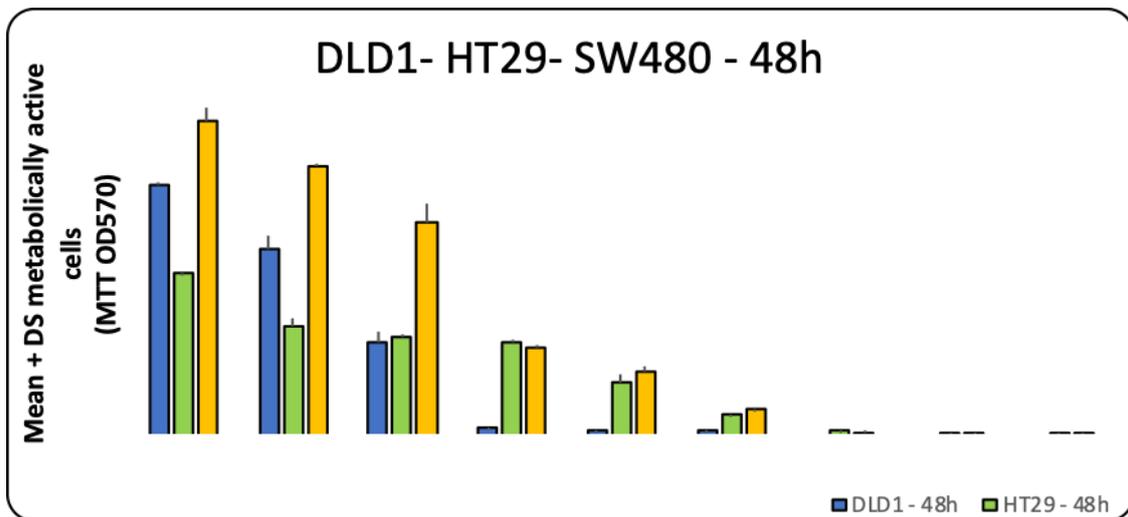
Dai risultati si evince che la concentrazione opportuna di curcuma da utilizzare per i prossimi studi in vitro, che effettueremo in combinazione con l'estratto ottenuto dalle foglie dell'ulivo della cultivar Coratina, è proprio quella di 30 μ M .

Anche per le cellule SW480 i risultati mostrati in figura 3 confermano i dati ottenuti con le precedenti linee cellulari.



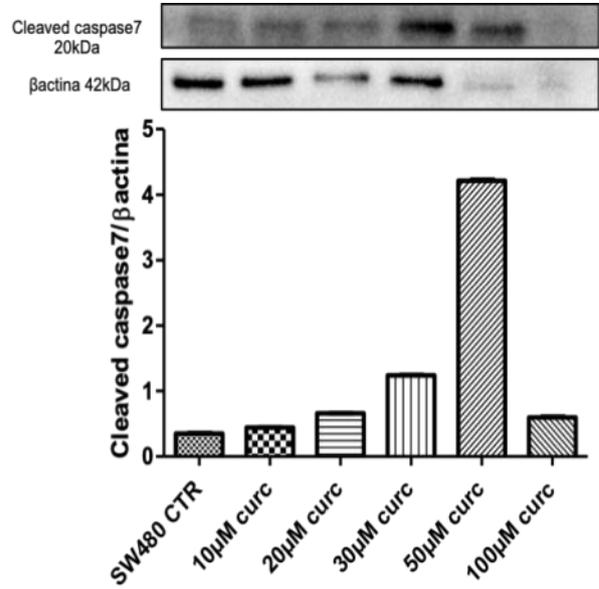
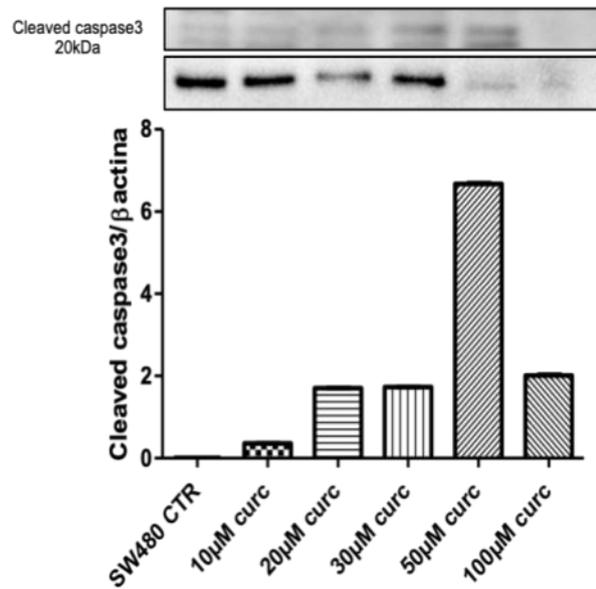
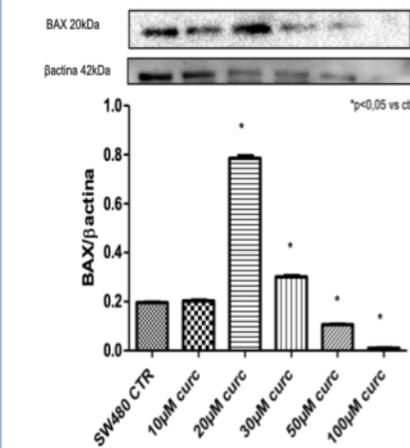
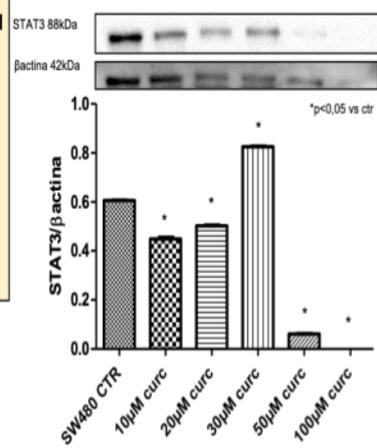
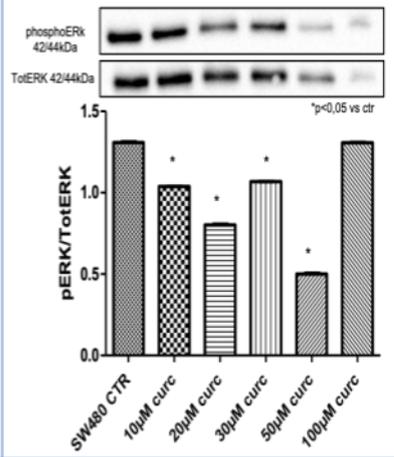
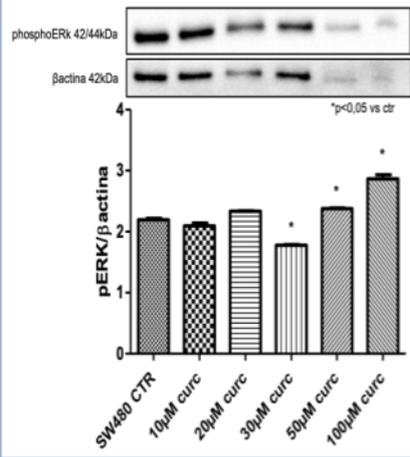
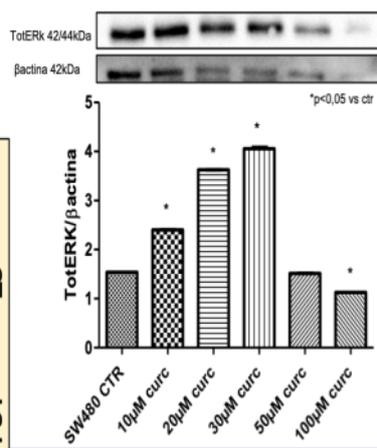
Dalle indagini fatte con una incubazione di 48h (fig.4: DLD1(in blu), HT29 (in verde), SW480 (in arancione)) si evince che il tempo ottimale per valutare l'effetto in vitro della curcumina è di 24h.

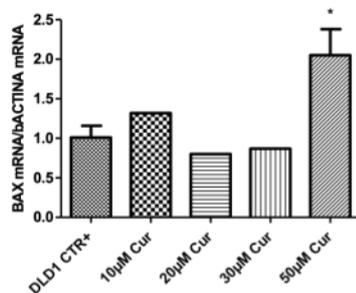
FIG.4



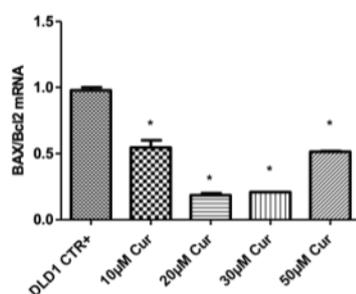
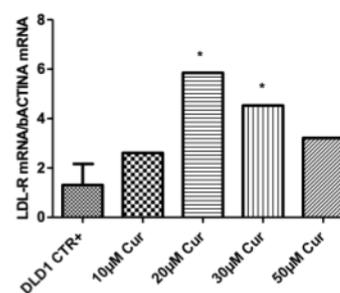
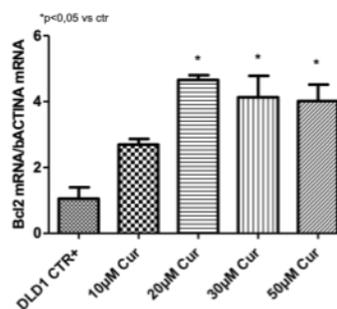
Successivamente sono stati allestiti dei test di biologia molecolare dei markers β -actina, pERK, STAT3, BAX; Caspasi 7 e Caspasi 3.

SW480 WB 24.07.18_50µg proteine_gel 4-15%





DLD-1 Real time PCR 18.07.18



Per quanto riguarda invece le cellule HT29 i dati di wester blot non sono risultati significativi; questo ci porterà ad escluderle nelle sperimentazioni successive.

In conclusione, dall'analisi integrata di tutte le condizioni si evince che la *curcuma longa* dell'Indena ha un effetto apoptotico sulle cellule DLD1 e SW480, che funziona meglio a basse concentrazioni.

Abbiamo raccolto e campionato tutti i sovranatanti delle colture cellulari delle tre linee cellulari per il dosaggio del pattern di citochine infiammatorie (GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, and TNF- α), con il MACSPlex Cytokine 12 Kit con utilizzo del citofluorimetro. Queste CK potrebbero quindi svolgere un ruolo nella modulazione della fisiopatologia delle CAC indotta da CUR+OLE.

Delle citochine analizzate non ci sono variazioni significative eccetto che IL-6, la cui produzione risulta aumentata nei sovranatanti delle cellule trattate con l'OLE.

Risultati in vivo attesi:

Il prossimo anno sarà fondamentale per effettuare studi "in vivo" traslazionali (Obiettivo specifico 2 e 3) su modelli animali, per testare l'effetto anti-infiammatorio e antiossidante di una dieta arricchita in curcuma, ed estratti fenolici isolati dalle foglie dell'ulivo e del loro effetto combinato, in modelli murini che mimano le CAC (colits-associated carcinogenesis).

Progetto n. 16: “Valore prognostico dei p-ANCA nei soggetti con colangite sclerosante primitiva”

Responsabile: dott. Vitantonio Guglielmi

Partecipanti: dott. Mario Correale, dott. Massimo Tutino, dott. Vito Guerra, dott. Pietro Giorgio

Background:

La colangite sclerosante primitiva (CSP) è una malattia autoimmune epatica, caratterizzata da colestasi. È facile l'insorgenza in questi pazienti di colangiocarcinoma e carcinoma della colecisti. Nei $\frac{3}{4}$ dei casi circa è presente l'anticorpo peri-nuclear anti neutrophil cytoplasmatic (p-ANCA). Quando i soggetti sono p-ANCA positivi hanno un'alta probabilità di associarsi a malattie infiammatorie croniche dell'intestino (MICI) e in particolare alla retto colite ulcerosa (RCU), con facile insorgenza di un terzo tipo di neoplasia: il carcinoma del colon. Inoltre, nei pazienti con RCU la presenza dei p-ANCA predice una risposta scarsa agli anti TNF alfa e lo sviluppo di pouchite cronica dopo anastomosi ileale pouch-anale.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Al momento abbiamo visionato le cartelle cliniche di 28 pazienti con diagnosi di CSP. Solo 12 di questi pazienti hanno eseguito la colonscopia e in 9 la diagnosi è stata di RCU, in 1 di ca colon senza IBD, 1 di IBD indeterminata, 1 ndp. In uno dei 9 pazienti con diagnosi di RCU è stato anche riscontrato ca del colon. I p-ANCA sono stati eseguiti in 4 pazienti: 2 sono positivi: 1 con RCU e 1 con RCU +ca colon.

Nel 2018 sono stati studiati 10 pazienti con CSP (6 maschi e 4 femmine): tutti sono stati sottoposti a colonscopia. 4 hanno IBD con positività ANCA (3 RCU, 1 m. di Crohn) e 6 non hanno né IBD né positività ANCA. In particolare, una paziente ANCA positiva è affetta da ileocolite di Crohn resistente ai biologici e già sottoposta a resezione ileocolica e con stenosi della anastomosi che richiede nuovo intervento chirurgico.

Obiettivi specifici dello studio:

Lo studio è composto da 2 parti. Una parte retrospettiva: verificare dal 2010 a oggi quanti casi di CSP sono stati ricoverati presso il nostro IRCCS, in quanti è stato chiesto il p-ANCA, e in quanti si è verificata l'associazione con le MICI e con quale significato clinico.

La parte prospettica valuterà tutti i nuovi casi di CSP che verranno a ricoverarsi nei prossimi 2 anni nel nostro IRCCS, ricercando in tutti i pazienti i p-ANCA e il loro significato prognostico.

Obiettivo specifico 1: Prevalenza dei p-ANCA nei pazienti con CSP.

Obiettivo specifico 2: Significato clinico

Obiettivo specifico 3: Valore prognostico

Obiettivo 1:

Quanti pazienti con CSP hanno positività per p-ANCA.

Obiettivo 2:

Quelli positivi hanno più probabilità di avere una MICI?

Obiettivo 3:

I pazienti con RCU e positività ai p-ANCA rispondono meno agli anti TNF alfa? In quanti viene diagnosticato il carcinoma del colon?

Risultati attesi:

Dovremmo trovare il 60-90 % dei soggetti con CSP positivi ai p-ANCA

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

I soggetti con CSP e p-ANCA vanno seguiti più attentamente per la facile coesistenza delle MICI con il rischio elevato di insorgenza di carcinoma del colon.

Bibliografia:

- 1) Di Sabatino A, Biagi F, Lenzi M, Frulloni L, Lenti MV, Giuffrida P, Corazza GR. Clinical usefulness of serum antibodies as biomarker of gastrointestinal and liver diseases. *Dig Liv Dis* 2017; 49: 947-956.
- 2) Hov JR, Boberg KM, Karlsen TH. Autoantibodies in primary sclerosing cholangitis. *World J Gastroenterol* 2008; 14:3781-91.
- 3) Seibold F, Weber P, Klein R, et al. Clinical significance of antiantibodies against neutrophils in patients with inflammatory bowel disease and primary sclerosing cholangitis. *Gut* 1992; 33: 657-62.
- 4) Jurgens M, Laubender RP, Hartl F, et al. Disease activity, ANCA, and IL23R genotype status determine early response to infliximab in patients with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:1811-9.
- 5) Singh S, Sharma PK, Loftus Jr EV, et al. Meta-analysis: serological markers and the risk of acute and chronic pouchitis. *Alim Pharmacol Ther* 2013; 37:867-75.

LINEA 3

MEDICINA PARTECIPATIVA IN GASTROENTEROLOGIA

Per la linea di ricerca n. 3 “Medicina Partecipativa in Gastroenterologia”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2018 sono i seguenti:

Progetto n. 17: “Malattia di Gaucher causa di epatopatia cronica”

Responsabile: dott. Vitantonio Guglielmi

Partecipanti: dott. Mario Correale, dott. Gioacchino Leandro

La malattia di Gaucher (MG) è una malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva in cui è deficitario l’enzima beta-glucocerebrosidasi. Quindi l’attività enzimatica ridotta causa l’accumulo di glucocerebrosidi nelle cellule del sistema monocito-macrofagico in tutti gli organi, ma principalmente nella milza, fegato e midollo osseo. Ci sono 3 forme cliniche. Il tipo uno (non neuronopatico) è il più frequente (90%): c’è interessamento scheletrico e viscerale. Il tipo 2 è chiamato infantile: il paziente muore prima dell’età di 4 anni perché c’è una grave compromissione del sistema nervoso. Il tipo 3 è stato definito giovanile: i segni e i sintomi neurologici sono meno gravi con diversi gradi di coinvolgimento viscerale. Il coinvolgimento del fegato nella GD è comune e specialmente nei pazienti splenectomizzati. Nella popolazione mondiale il tipo I della malattia di Gaucher ha una prevalenza di 1:40.000, ma negli ebrei di Ashkenazil è 1:800. Attualmente esistono 2 tipi di terapia: una è la sostituzione enzimatica (ERT) che viene somministrata ogni 2 settimane per via endovenosa. L’altro è l’eliglustat che viene somministrato per via orale, con efficacia paragonabile al primo. Eliglustat è un analogo del glucocerebroside e, quindi, inibisce parzialmente l’enzima glucocerebroside sintetasi, riducendo così la produzione di glucocerebroside

In 24 mesi, abbiamo testato 75 pazienti con malattia di fegato cronica sine causa (30 donne e 45 uomini, età media 55 anni, range da 15 a 77). Tutti presentavano test di funzionalità epatica alterati (ipertransaminasemia da almeno 6 mesi). 30 pazienti hanno anche mostrato un aumento degli enzimi di colestasi. Due pazienti sono obesi e 3 in sovrappeso.

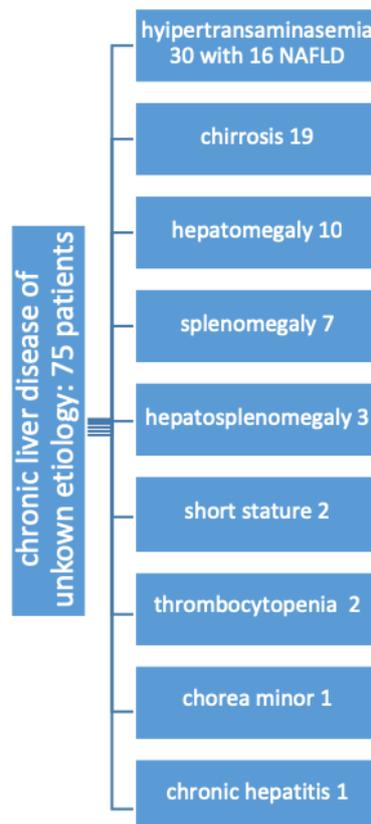
I pazienti arruolati sono stati sottoposti a esami ematici di screening: HAV, HBV, HCV, HIV, EBV, Herpes Simplex 1 e 2, CMV, assetto lipidico, glicemia, HOMA test, antitransglutaminasi IgG e IgA, ceruloplasmina, alfa 1 anti tripsina, ferritina, TIBC (capacità totale di legare il ferro), autoanticorpi: anti-muscolo liscio, anti-mitocondrio, anti-neutrofilo citoplasmatico, anti-nucleare, anti-DNA, anti-fegato/rene microsomiale, TSH. Infine, è stato escluso il danno epatico da droghe e/o alcol. Tutti sono stati sottoposti a ecografia addominale. Una volta che tutti gli esami ematici e l’ecografia hanno escluso una possibile eziologia della malattia del fegato, abbiamo cercato la MD. Essi sono stati sottoposti a prelievo venoso (previo consenso scritto) che è stato inviato al laboratorio di Centogene in Germania. Qui, l’enzima è stato dosato con un metodo di spettrometria di massa tandem. Nel caso di deficit, si è proceduto con la conferma genetico-molecolare, sequenziando il gene secondo il metodo di Sanger.

Il test è risultato dubbio in 4 pazienti. In 3 è stato ripetuto con risultato negativo, in una paziente non è stato possibile ripeterlo perché non si è presentata al controllo, nonostante numerosi inviti. Tutti gli altri erano negativi. In 30 è stata fatta diagnosi solo di ipertransaminasemia di natura sconosciuta e in 16 di questi l’ecografia addominale ha dimostrato una steatosi diffusa: NAFLD: malattia del fegato grasso non alcolica. In 19 pazienti è stata fatta diagnosi di cirrosi epatica (in 5 la

diagnosi è istologica e in 14 clinica, in 4 ci sono varici esofagee). In 10 di epatomegalia definita come massa di fegato > 1,25 volte il volume normale stimato. In 7 di splenomegalia (1500-3000 cc in dimensioni, rispetto a 50-200 cc nell'adulto medio), in 3 di epatosplenomegalia, in 2 di bassa statura, in 2 di trombocitopenia, in 1 di corea minore e in 1 di epatite cronica di eziologia sconosciuta (vedi tabella). Anche la figlia di una paziente messicana che era affetta da MG è risultata negativa. In sei pazienti è stata eseguita la biopsia epatica: in 5 la diagnosi è stata di cirrosi epatica e in 1 di fibrosi epatica (Metavir 2). In nessun caso l'istologia suggerisce un'eziologia. A nessuno è stato diagnosticato un carcinoma epatocellulare Sono state riscontrate le seguenti patologie associate: diabete mellito (8 pazienti), ipertensione arteriosa (7 pazienti), obesità (2 pazienti) e poi un caso ciascuno di morbo di Parkinson, celiachia in dieta priva di glutine, oligofrenia, trombosi portale idiopatica, sclerosi multipla, insufficienza renale cronica.

Questo lavoro, pur nei limiti del numero limitato di casi, dimostra quanto sia difficile trovare la MD in pazienti con malattia epatica cronica di natura indeterminata: 1 solo caso dubbio che non è tornato al controllo per ripetere il test nonostante i numerosi richiami su 75 pazienti. Molto probabilmente la MG è più facile che venga diagnosticata in quei pazienti che, al di là della malattia cronica del fegato, mostrano segni e sintomi di coinvolgimento di altri organi o sistemi: sistema nervoso, midollo osseo, tessuto osseo. Tuttavia, dobbiamo pensare alla MG di fronte a un paziente con una malattia epatica cronica di natura indeterminata perché, oltre alla diagnosi, possiamo eseguire una adeguata ed efficace terapia. Dobbiamo anche considerare che ancora molti pazienti con malattia epatica cronica rimangono senza eziologia. È probabile che siano presenti altri virus epatotropici, altre malattie metaboliche o altre malattie genetiche che possono causare malattie croniche del fegato. Crediamo che il paziente con malattia epatica cronica senza alcuna eziologia difficilmente possa essere affetto da MG. Sicuramente sarebbe necessario un numero maggiore di pazienti per poter trarre conclusioni più precise.

Tabella



Progetto n. 18: “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”

Responsabile: dott. Giuseppe Riezzo

Partecipanti: dott. Francesco Russo e dott.ssa Antonella Orlando

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità): progetto chiuso

Il Laboratorio si interessa da tempo delle problematiche diagnostiche e terapeutiche legate alla celiachia e in genere ai disturbi glutine correlati. Nel soggetto celiaco gli anticorpi anti-transglutaminasi (anti-tTG) vengono prodotti in maniera dipendente dall'assunzione di glutine esclusivamente da parte dei linfociti residenti nella mucosa intestinale. La loro presenza nel siero ad alto titolo consente sostanzialmente la diagnosi della malattia ma può succedere che in presenza o meno di segni clinici conclamati, questi anticorpi non siano presenti nel siero pur essendo la loro produzione (e quindi la malattia) già iniziata senza che ancora si sia determinato il danno istologico. Quindi mettere a punto un test capace di dimostrare la presenza di anticorpi anti-tTG a livello della mucosa intestinale può essere molto utile per la diagnosi di celiachia nei casi dubbi in presenza o assenza di sintomatologia clinica conclamata.

Sono stati reclutati 78 pazienti afferenti alla Endoscopia digestiva. Sono stati raccolti i dati relativi alla sintomatologia GI con questionario validato (GSRS), sono stati inoltre raccolti i referti endoscopici e, quando disponibili, quelli istologici. Abbiamo infine effettuato il dosaggio delle antitransglutaminasi e antiendomiosio sieriche. Per quanto riguarda la parte sperimentale / innovativa è stata messa a punto la coltura delle biopsie duodenali e il dosaggio degli anticorpi anti transglutaminasi su sovrinatante stata effettuata mettendo a punto la metodica della coltura “in batch” e dosaggio immunoenzimatico ELISA. I risultati sono espressi come A_{450nm} , con un valore di cut-off pari a un livello di anticorpale uguale a 0.3.

Attualmente abbiamo inserito i dati antropometrici, clinici e strumentali nel database. A questi sono stati aggiunti i risultati sperimentali e i dati saranno sottoposti ad analisi statistica. Un interessante approccio è rappresentato dallo studio della reale validità e applicazione di tale dosaggio in quanto gli anticorpi anti-tTG a livello mucosale sono stati individuati anche in pazienti non celiaci, ponendo il quesito se la presenza di tali marcatori sia effettivamente associata alla alterazione immunologica al glutine, come riportato in letteratura, oppure il segno di una infiammazione aspecifica. Un recente lavoro di un gruppo italiano (*Maglio et al, 2017*) pone l'accento proprio su una serie di patologie GI quali la esofagite eosinofila, il reflusso gastro-esofageo, o l'infezione da *Helicobacter pylori* per fare un esempio, in cui la produzione di anticorpi anti-tTG non è conosciuta o poco esplorata.

Progetto n. 19: “Epidemiologia e farmacovigilanza delle infezioni da *Helicobacter pylori*”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: dott.ssa Valeria Palmitessa

Background

L'eradicazione dell'infezione da *H. pylori* è importante per prevenire manifestazioni cliniche più gravi quali ulcera peptica, carcinoma gastrico e MALTlinfoma, pertanto la strategia “*test and treat*” è molto efficace per raggiungere lo scopo (1, 2). La *first line therapy* si avvale di un inibitore della pompa protonica più claritromicina e amoxicillina o levofloxacina più amoxicillina (3, 4). L'inefficacia della terapia è determinata in oltre il 20% dei casi principalmente per l'incremento delle resistenze agli antibiotici in *H. pylori* (5) nonché dalla scarsa *compliance* del paziente e anche, come recentemente riportato in letteratura, da altri fattori come la produzione di biofilm da parte del batterio, che riduce la penetrazione degli antibiotici (6). La ricerca è volta alla conoscenza dell'epidemiologia dell'infezione da *H. pylori* nel bacino di utenza dell'IRCCS, alla valutazione della diffusione dell'antibiotico-resistenza, e dei caratteri di virulenza.

Obiettivi

Scopo principale del progetto di ricerca è la precisa definizione fenotipica, mediante tecniche colturali (e-test) e genotipica, mediante tecniche molecolari (PCR, sequenziamento), delle antibiotico-resistenze primarie ed indotte che caratterizzano i ceppi di *H. pylori*. Altro obiettivo del progetto è quello della caratterizzazione genotipica, mediante *Next Generation Sequencing*, dei fattori di virulenza dei ceppi di *H. pylori* al fine di studiare le associazioni tra determinanti genotipici di virulenza e resistenza antibiotica.

Attività

Dal primo dicembre 2017 al 31 Novembre 2018 sono stati arruolati previo consenso informato 224 pazienti afferenti all'U.O.C. di Endoscopia Digestiva (età media 48.6, ratio M/F 0.68) seguendo i criteri di inclusività riportati nel protocollo di ricerca approvato dal Comitato Etico con delibera 231/13/11/2017) quali età compresa tra i 17 e i 65 anni, con indicazione di esofago-gastro-duodenoscopia (EGDS) con sintomatologia variabile.

Tre biopsie di ciascun paziente, provenienti rispettivamente da *angulus*, corpo ed antro, sono stati processati mediante tecniche colturali specifiche al fine di effettuare l'isolamento di *H. pylori*. Sono stati isolati 92 ceppi costituenti attualmente una ceppoteca istituita presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'U.O.C di Patologia Clinica di questo Istituto. L'isolamento di *H. pylori* è avvenuto sia da pazienti che non avevano avuto precedenti esposizioni terapeutiche a terapie eradicanti specifiche per *H. pylori*, pertanto definiti “naïve”, da cui è stato possibile ricavare dati circa le farmacoresistenze primarie presenti sia da pazienti precedentemente sottoposti a terapie eradicanti nei confronti dell'*H. pylori*. Dal momento che i trattamenti con terapie eradicanti esercitano una pressione selettiva che seleziona ceppi resistenti in questo studio sono stati valutati separatamente i ceppi provenienti da pazienti sottoposti a specifiche terapie eradicanti.

La prevalenza misurata nel bacino di utenza dell'Istituto dell'infezione da *H. pylori* è risultata del 40%. Questo dato è sovrapponibile con quelli più recenti che riportano che circa un terzo della popolazione europea risulta colonizzata (7, 8).

Stratificando la popolazione in funzione delle classi di età, si osserva che il maggior numero di ceppi di *H. pylori* è isolato da pazienti più anziani (Grafico 1).

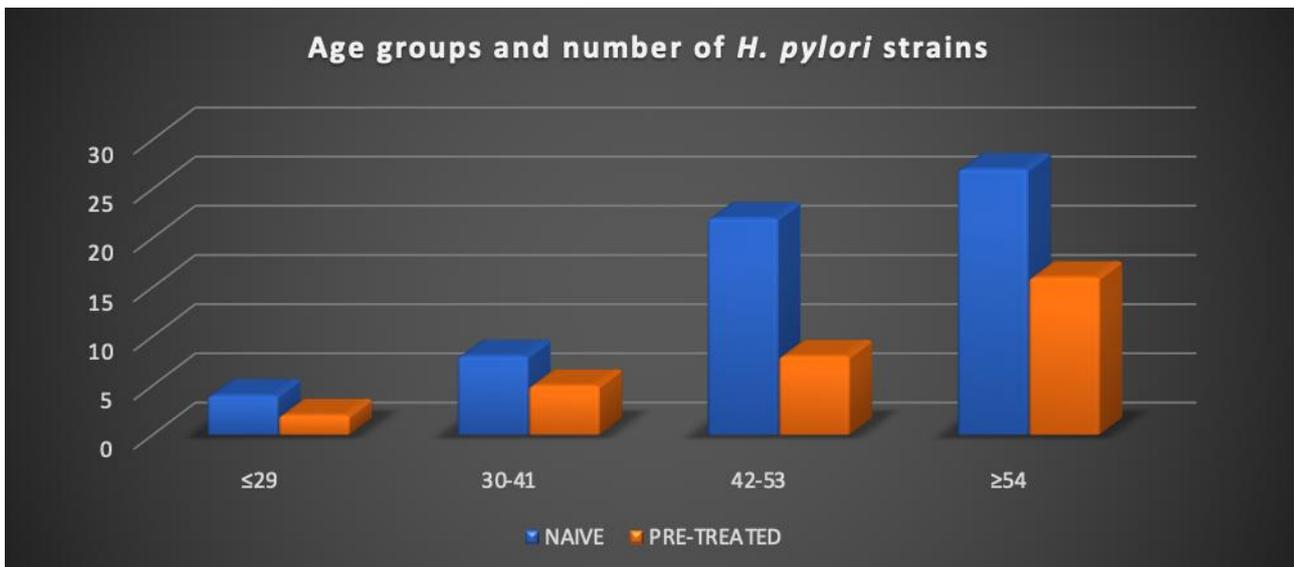


Grafico 1. Classi di età e isolamento di *H. pylori*.

La popolazione afferente allo studio, risultata positiva per l'isolamento del patogeno è stata stratificata oltre che per classe di età e precedente trattamento eradicante anche per sintomatologia e scoperte endoscopiche. Da questa analisi è emerso che sia per pazienti naïve che già trattati il sintomo principale era rappresentato principalmente dall'epigastralgia e dolore retrosternale, mentre l'endoscopia metteva in luce che i pazienti positivi per colonizzazione da *H. pylori* mostravano principalmente gastrite eritematosa (Grafico 2).

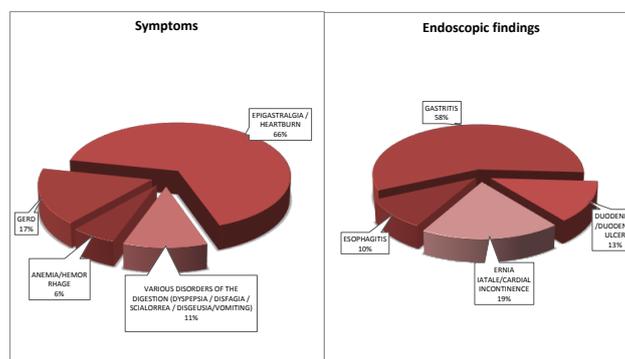


Grafico 2. Sintomi e scoperte endoscopiche associate a infezione da *H. pylori*.

Per ogni ceppo isolato sono stati effettuati test di sensibilità fenotipica verso sei antibiotici (claritromicina, levofloxacina, amoxicillina, tetraciclina, rifampicina e metronidazolo). La classificazione come fenotipo resistente (o sensibile) per ogni specifico antibiotico utilizzato è stata effettuata sulla base degli specifici breakpoint indicati nel documento EUCAST 2018. Il primo dato emerso da queste analisi è stato la differenza dei pattern di sensibilità riscontrati tra ceppi isolati da pazienti mai trattati rispetto ai ceppi isolati da pazienti già trattati: in particolare la resistenza ha mostrato percentuali maggiori per questo secondo gruppo nel quali si riscontra anche un maggiore tasso di resistenze multiple rispetto che nel primo. Un altro dato emerso è la l'ampio grado di sensibilità che i ceppi isolati mostrano nei confronti dell'amoxicillina della tetraciclina e della rifampicina. Questo dato dimostra come nell'area italiana e nello specifico nel bacino di utenza dell'IRCCS la resistenza a questi farmaci sia ancora quasi inesistente anche nei ceppi sottoposti a pressione selettiva esercitata dalle terapie antibiotiche fallimentari (Grafico 3).

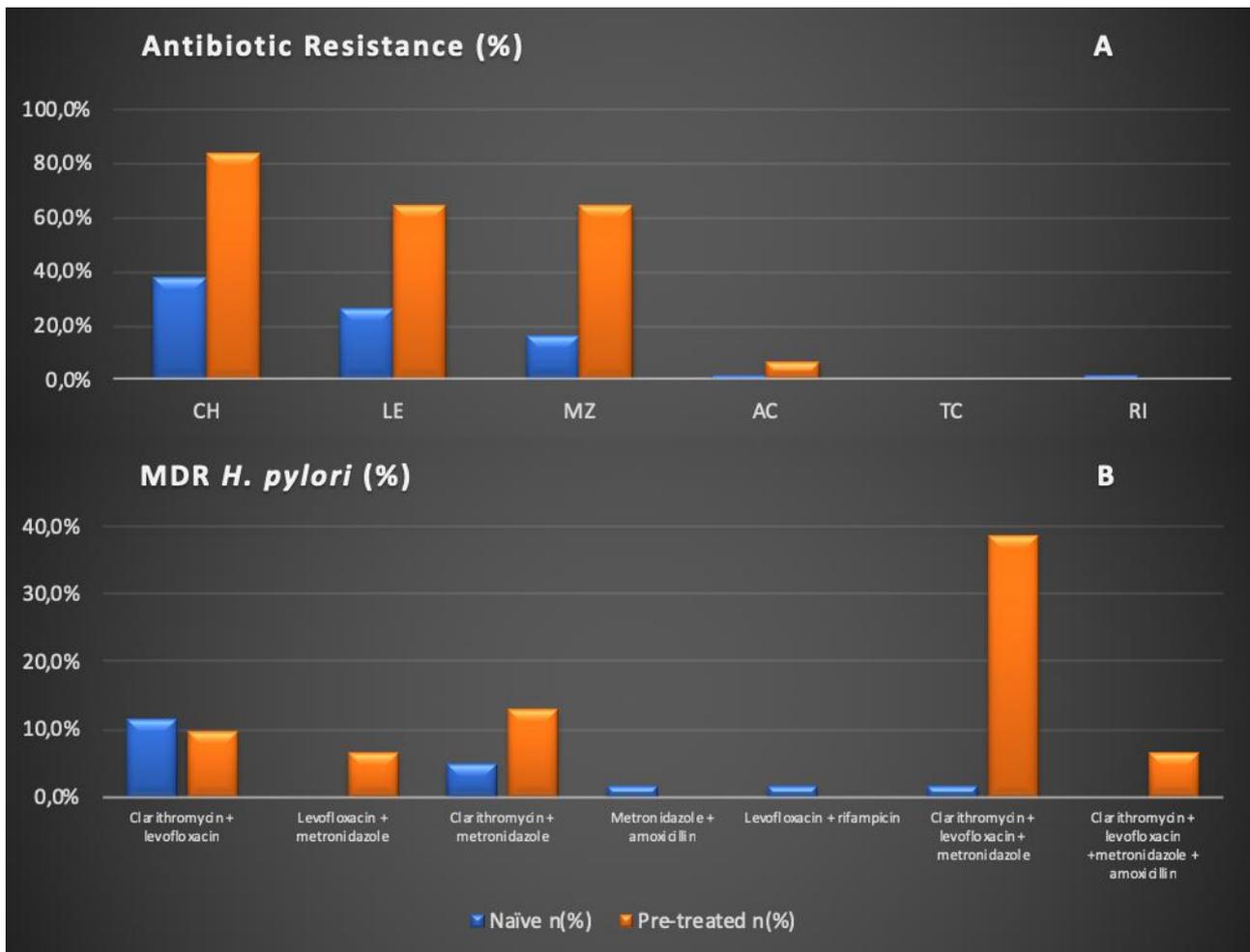


Grafico 3. A pattern di resistenza fenotipica ai principali antibiotici utilizzati in terapie eradicanti, B multi-resistenza in *H. pylori* isolati da pazienti naïve e precedentemente trattati.

Da questi dati emerge che quasi il 40% dei ceppi isolati da pazienti naïve e più dell'80% dei ceppi isolati da pazienti pre-treated è resistente alla claritromicina. Inoltre, la prevalenza dei ceppi resistenti al metronidazolo e alla levofloxacina è risultata elevata. È 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 in letteratura per il fenotipo claritromicina-resistente una prevalenza del 20% circa) (9), il metronidazolo costituisce una delle componenti delle medicazioni di ultima generazione utilizzata nell'eradicazione dell'infezione da *H. pylori*. Questi dati 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'*H. pylori* imputabili in parte all'uso estensivo del metronidazolo per la cura di infezioni del tratto genitale (10).

Osservando i fenomeni di resistenza antibiotica un altro interessante dato è la correlazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) osservata tra sesso femminile e resistenza alla claritromicina (grafico 4 A) e la correlazione ($p < 0.05$) tra età superiore ai 41 anni e resistenza alla levofloxacina tra nei pazienti pre-treated (grafico 4 B).

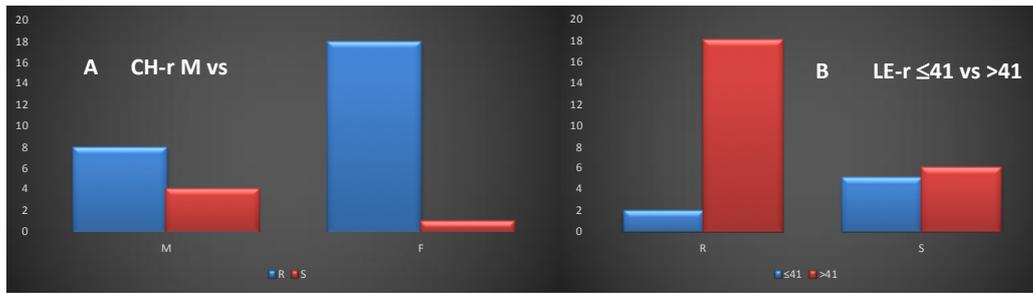


Grafico 4. **A** resistenza alla claritromicina e sesso, **B** resistenza alla levofloxacin ed età, nei ceppi isolati da pazienti precedentemente trattati

Eseguendo la stratificazione in funzione della classe di età ed in funzione alla resistenza a tre specifici antibiotici quali claritromicina, levofloxacin e metronidazolo è emerso che i ceppi isolati da pazienti più giovani sono più frequentemente resistenti alla claritromicina mentre al contrario i ceppi isolati da pazienti più anziani sono più spesso resistenti alla levofloxacin. La resistenza al metronidazolo sembra invece essere ubiquitariamente distribuita tra le classi di età (grafico 5).

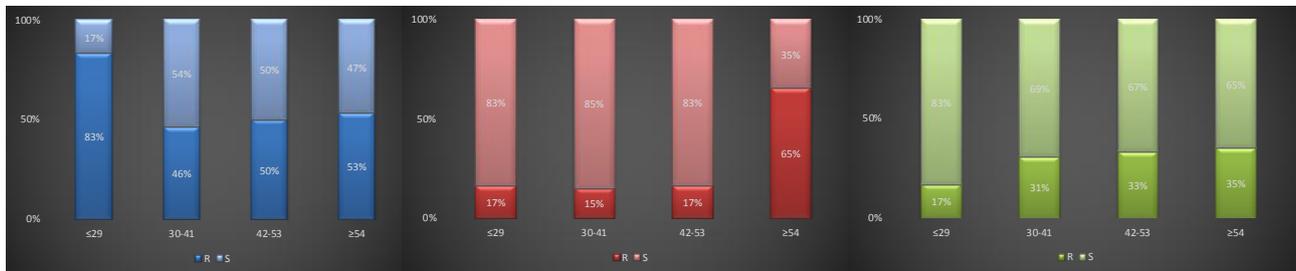


Grafico 5. Resistenza a claritromicina, levofloxacin e metronidazolo e classi di età

Per ogni antibiotico testato sono stati individuati i valori della MIC₅₀ (minima concentrazione inibente il 50% dei ceppi) e della MIC₉₀ (minima concentrazione inibente il 90% dei ceppi) al fine di osservare eventuali correlazioni per i valori più alti delle MIC.

<i>Antibiotic</i>	<i>Total</i>		<i>Naïve</i>		<i>Pre-treated</i>	
	<i>MIC</i> ₅₀ mg/L	<i>MIC</i> ₉₀ mg/L	<i>MIC</i> ₅₀ mg/L	<i>MIC</i> ₉₀ mg/L	<i>MIC</i> ₅₀ mg/L	<i>MIC</i> ₉₀ mg/L
<i>Clarithromycin</i>	2	256	0.032	256	8	256
<i>Levofloxacin</i>	0.25	32	0.19	32	8	32
<i>Metronidazole</i>	0.75	256	0.5	192	256	256
<i>Amoxicillin</i>	0.016	0.094	0.016	0.064	0.016	0.125
<i>Rifampicin</i>	0.38	1.0	0.38	1.0	0.38	1.0
<i>Tetracycline</i>	0.032	0.094	0.032	0.094	0.032	0.25

Tabella 1. MIC₅₀ e MIC₉₀

Indagini di tipo molecolare costituenti la seconda parte del progetto di ricerca ad aventi come scopo la caratterizzazione genotipica dei fenotipi farmacoresistenti sono state altresì condotte.

La resistenza alla claritromicina 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 principali mutazioni (A2142C, A2142G e A2143G) (11).

I dati raccolti hanno messo in luce che mentre tra i ceppi isolati da pazienti naïve la resistenza fenotipica alla claritromicina ha una base genotipicamente eterogenea, tra i ceppi sottoposti a pressione selettiva la principale causa di resistenza è dovuta alla mutazione A2143G (Grafico 6).

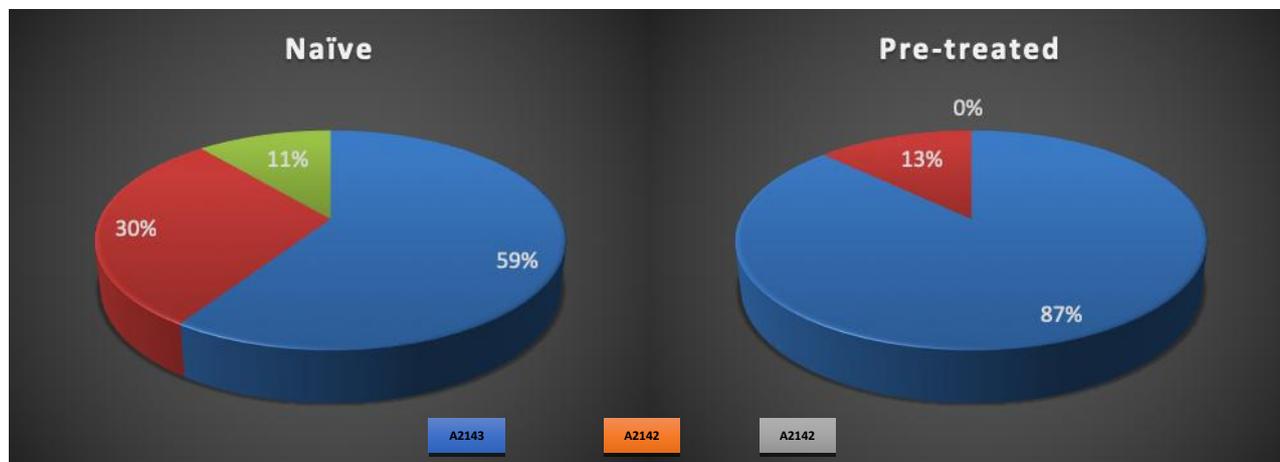


Grafico 6. Mutazioni nel gene *rrl* associate a resistenza alla claritromicina in ceppi *H. pylori* isolati da pazienti naïve e pre-treated.

Dei 92 ceppi isolati è stata determinata quindi la presenza delle tre principali mutazioni nel gene *rrl* associate a resistenza alla claritromicina. Anche in questo caso sono stati misurati i valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ al fine di valutare una eventuale correlazione tra le MIC e mutazione. I dati raccolti indicano che la mutazione principalmente riscontrata correla con più bassi valori di MIC₅₀ mentre le mutazioni 2142 sono associate a valori estremamente alti di MIC₅₀ (Tabella 2).

Mutation	N strains	MIC ₅₀	MIC ₉₀
A2143G	37	16	256
A2142G	6	256	256
A2142C	1	256	256

Tabella 2. Mutazioni del gene *rrl* associate a resistenza alla claritromicina e MIC.

La resistenza ai fluorochinoloni in *H. pylori* è stata associata a mutazioni nella regione QRDR (la regione che determina la resistenza ai chinoloni). Per il codone 87 inoltre diversi polimorfismi come Asn (N) / Thr (T) sono associati a un fenotipo sensibile. In particolare, il polimorfismo N87 comprende due genotipi contenenti le triplette AAC e AAT associate a un fenotipo sensibile ed il polimorfismo T87 comprende due genotipi con triplette, rispettivamente ACC e ACT, anch'essi associati al fenotipo sensibile. Tuttavia, le mutazioni puntiformi che conferiscono resistenza riguardano sia il codone 87 e 91 che sono inclusi nella regione indicata come QRDR. Le mutazioni che conferiscono resistenza ai fluorochinoloni sono diverse, una mutazione puntiforme del codone 87, indicata come N87K è quella riportata come più frequente, insieme a T87I; inoltre, una



sostituzione da GCA a GCG nel codone 88 è stata associata ad un fenotipo resistente. A livello del codone 91, le mutazioni più frequentemente riportate sono D91N, D91G e D91Y (11).

Nessuno dei ceppi analizzati ha mostrato la presenza della banda associata al polimorfismo del T87. Si può concludere che la popolazione in questo specifico bacino di utenza costituito dall'IRCCS alberga solo esclusivamente una specifica sottopopolazione caratterizzata dalla variante N87. 42 ceppi mostrano un profilo wild-type del gene *gyrA* associato alla sensibilità dei fluorochinoloni. Al fine di classificare i ceppi isolati come genotipo resistente o sensibile ai fluorochinoloni per ogni ceppo di *H. pylori*, è stata valutata sia la presenza di mutazioni a livello del codone 87 che a livello del codone 91. Il test genotipico ha permesso di valutare la predominanza delle varianti polimorfiche del codone 87 associate a fenotipo sensibile. In letteratura sono riportati quattro isoforme wild type del codone 87 sebbene nella popolazione ne siano state individuate due solamente che compaiono circa con la stessa frequenza. Per quanto riguarda le mutazioni associate al fenotipo levofloxacin resistente, Nella popolazione di *H. pylori* isolati e analizzati la principale responsabile della resistenza ai fluorochinoloni è una mutazione del codone 87 (N→K) (Grafico 7).

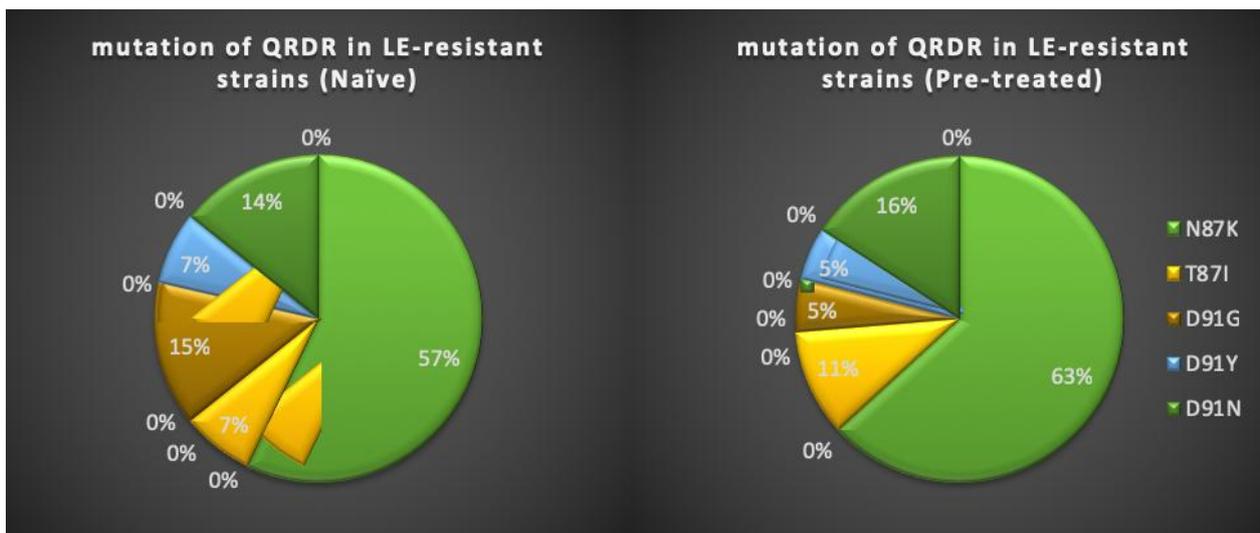


Grafico 7. A polimorfismo del codone 87, B e C frequenza delle mutazioni nella regione QRDR associate a resistenza alla levofloxacin in *H. pylori* isolati da pazienti naïve e pre-treated.

Anche in questo caso sono stati misurati i valori di MIC₅₀ e MIC₉₀ al fine di valutare una eventuale correlazione tra MIC e mutazioni. Stratificando le mutazioni in funzione del codone coinvolto si può osservare che la mentre le mutazioni che riguardano il codone 87 sono associate ad elevati valori di MIC₅₀ quelle che riguardano il codone 91 correlano con più bassi valori (Tabella 3).

Mutation	N strains	MIC ₅₀	MIC ₉₀
<i>codon 87</i>	22	32	32
<i>codon 91</i>	10	6	32

Tabella 3. Mutazioni del gene nella regione QRDR e MIC.

Per quanto riguarda la resistenza al metronidazolo in *H. pylori* attualmente poco si conosce circa i meccanismi molecolari che sottendo alla resistenza a questo nitroimidazolo (12). Dal momento che questa classe di antibiotici è costituita da *pro-drugs* è necessario che nelle cellule batteriche affinché si espliciti la sua azione battericida, nitro-reduttasi batteriche siano in grado di ridurre la forma ossidata della molecola. Attualmente si pensa che mutazioni dei geni che codificano per ossido-reduttasi che danno luogo a isoforme enzimatiche non funzionali o con minore affinità per la molecola, siano la principale causa di resistenza anche in *H. pylori* al metronidazolo. Tuttavia, recentemente è stato anche riportato che l'alterazione di differenti pathways possa influenzare indirettamente il processo (mediante alterazione del potenziale di membrana per esempio) di ossido-riduzione portando all'inattivazione funzionale di questa classe di antibiotici (13).

Allo scopo sono stati analizzate le sequenze di differenti loci genici. L'analisi è stata condotta in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico della Puglia e della Basilicata ed ha riguardato circa un terzo dei ceppi isolati sebbene questa analisi verrà estesa a tutti i ceppi catalogati.

In particolare, sulla base degli esigui dati riportati in Letteratura sono state analizzate le sequenze ottenute mediante sequenziamento relative ai geni *frxA*, *rdxA* (che codificano per due enzimi coinvolti nell'ossidoriduzione del metronidazolo, rispettivamente una flavinreduttasi e una NADPH-nitroreduttasi), *fdxA*, *fdxB* (che codificano per redoxine coinvolte nella via di trasferimento elettronico nella riduzione dei nitromidazoli), *dppA*, *dppB* (deptide ABC transporter periplasmic dipeptide-binding protein (*dppA*) e permease protein (*dppB*) che funzionano quali drug efflux pump, *dapF* (una diaminopimelate epimerase) e *trxI* (una tioredoxina) con il fine di caratterizzare genotipicamente la resistenza per questa classe di antibiotici in *H. pylori* (13, 14).

Bibliografia

1. Kandulski A, Selgrad M, Malfertheiner P. Helicobacter pylori infection: a clinical overview. Dig Liver Dis. 2008;40(8):619-26.
2. Lee YC, Liou JM, Wu Ms, Wu CY, Lin JT. Eradication of Helicobacter pylori to prevent gastroduodenal disease: hitting more than one bird with the same stone. Therap adv Gastroenterol 2008; 1: 111-20.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, Bazzoli F, El-Omar E, Graham D, Hunt R, Rokkas T, Vakil N, Kuipers EJ. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht III Consensus Report. Gut. 2007;56(6):772-81.
4. Molina-Infante J, Perez-Gallardo B, Fernandez-Bermejo M, Hernandez-Alonso M, Vinagre G, Dueñas C, Mateos-Rodriguez JM, Gonzalez-Garcia G, Abadia EG, Gisbert JP. Clinical trial: clarithromycin vs. levofloxacin in first-line triple and sequential regimens for Helicobacter pylori eradication. Aliment Pharmacol Ther. 2010 ;31(10):1077-84.
5. Katelaris PH. Helicobacter pylori: antibiotic resistance and treatment options. J Gastroenterol Hepatol. 2009;24(7):1155-7.
6. Cammarota G, Sanguinetti M, Gallo A, Posteraro B. Review article: biofilm formation by Helicobacter pylori as a target for eradication of resistant infection. Aliment Pharmacol Ther. 2012;36(3):222-30
7. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of Helicobacter pylori Infection Helicobacter. 2014 Sep;19 Suppl 1:1-5.
8. Di Ciaula A, Scaccianoce G, Venerito M, Zullo A, Bonfrate L, Rokkas T, Portincasa P. Eradication rates in Italian subjects heterogeneously managed for Helicobacter pylori infection. Time to abandon empiric treatments in Southern Europe. J Gastrointestin Liver Dis. 2017 Jun;26(2):129-137.
9. 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.
10. 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.
11. 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. Clarithromycin resistance and Helicobacter pylori genotypes in Italy. J Microbiol. 2006 Dec;44(6):660-4.
12. Binh TT, Suzuki R, Trang TT, Kwon DH, Yamaoka Y. Search for novel candidate mutations for metronidazole resistance in Helicobacter pylori using next-generation sequencing. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr;59(4):2343-8
13. Weinberg MV, Maier RJ. Peptide transport in Helicobacter pylori: roles of dpp and opp systems and evidence for additional peptide transporters. J Bacteriol. 2007 May;189(9):3392-402.
14. Marques B, Donato MM, Cardoso O, Luxo C, Martinho A, Almeida N. Study of rdxA and frxA genes mutations in metronidazole resistant and susceptible Helicobacter pylori clinical isolates from the central region of Portugal J Glob Antimicrob Resist. 2019 Jan 15. pii: S2213-7165(19)30015-3. doi: 10.1016/j.jgar.2019.01.008. [Epub ahead of print]

Progetto n. 20: “Diete, microbiota intestinale e metabolomica: valutazione di possibili sinergie”

Responsabile: dott. Gioacchino Leandro

Partecipanti: dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott. Kieran Michael Tuohy, dott.ssa Ornella Rotolo, dott.ssa Maria Notarnicola

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, sono già noti 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 "Saverio 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.

Stato di avanzamento del progetto (2° anno) - Attività svolta:

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.

A causa di problemi tecnico-amministrativi non si è conclusa la collaborazione con il laboratorio di Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche dell'IRCCS Ospedale Galeazzi e sono stati effettuati nuovi accordi di collaborazione con la Fondazione Edmund Mach - Istituto Agrario San Michele All'Adige.

Sono stati arruolati in totale 26 soggetti sani (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) di cui 8 hanno seguito la dieta mediterranea, 9 la dieta proteica e 9 la dieta vegetariana. 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.

Il campione fecale prelevato è stato opportunamente aliquotato e conservato per le successive analisi.

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, disconfort 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* ha 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.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

L'Ambulatorio di Nutrizione Clinica vanta di un ampio bacino d'utenza che permetterebbe 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 centro ricerca e innovazione della Fondazione Edmund Mach è in grado di sviluppare il progetto di ricerca grazie sia alle professionalità che vi lavorano, sia al personale borsista dedicato al progetto.

Timeline / Prodotti finali:

Primo anno del progetto:

Nel primo anno sono stati avviati accordi di collaborazione con l'IRCCS Ospedale Galeazzi, Università di Milano.

È stato effettuato uno studio bromatologico e di composizione dei 3 tipi di diete oggetto di studio e successivamente sono state elaborate secondo i principi stabiliti.

Si è poi proceduto con il reclutamento dei primi 6 soggetti.

È stato realizzato un form per la gestione immediata e completa dei dati reperiti durante il reclutamento.

Secondo anno del progetto:

A causa di problemi tecnico-amministrativi non si è conclusa la collaborazione con l'IRCCS Ospedale Galeazzi perciò è stata avviata una nuova collaborazione con la Fondazione Edmund Mach per l'analisi dei campioni.

A gennaio sono stati inviati presso la Fondazione Edmund Mach i primi campioni relativi al T0 e T2 dei soggetti che hanno concluso lo studio.

Sono stati arruolati in totale 26 soggetti.

Terzo anno del progetto:

Si concluderà l'arruolamento dei 60 soggetti e si procederà con l'analisi di sequenziamento genico dei campioni prelevati all'inizio e alla fine della terapia dietetica.

Infine, sarà effettuata l'elaborazione dei risultati con successiva pubblicazione di articoli.

Risultati conseguiti:

Su 26 soggetti arruolati, 22 hanno concluso i due mesi di dieta e 4 hanno abbandonato il piano alimentare per difficoltà nella gestione/programmazione dei pasti o per assunzione di antibiotici.

In tutti i soggetti si è verificato:

- un calo ponderale del peso;
- una riduzione delle circonferenze corporee;
- una ricomposizione corporea rilevata mediante bioimpedenziometria;
- un cambiamento dei sintomi gastro-intestinali collegati alla fermentazione di substrati diversi (fibre alimentari o proteine di origine animale);

(**Tabella 1 e 2** in allegato riportano rispettivamente i risultati dei parametri antropometrici e della bioimpedenziometria relativa ai 26 pazienti in studio)

L'analisi dei campioni fecali mediante tecniche di sequenziamento dei tre gruppi di soggetti non è stata ancora conclusa.

Proposta di budget totale

A causa di problemi tecnico-amministrativi non è stato possibile avviare la collaborazione con l'IRCCS Ospedale Galeazzi per l'analisi dei campioni biologici pertanto si è richiesto un rinnovo del budget assegnato per l'anno 2017 (29.100 €) (DDG n.864 del 19/12/2017) di cui è stata utilizzata solo una quota pari a 12.000 € per contratto di borsa di studio.

Tabella 1

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	PESO	ALTEZZA	BMI	CIRC. VITA	CIRC. FIANCHI	VITA/FIANCHI
T0	1	VEGETARIANA	79	1,63	29,7339	93,5	114	0,820175439
T15	1	VEGETARIANA	75,1	1,63	28,26602	93	111,5	0,834080717
T30	1	VEGETARIANA	73,8	1,63	27,77673	91	110	0,827272727
T45	1	VEGETARIANA	72,3	1,63	27,21216	89,8	108	0,831481481
T60	1	VEGETARIANA	70,4	1,63	26,49705	88,5	105,6	0,838068182
T0	2	PROTEICA	77,5	1,6	30,27344	107,5	110,5	0,972850679
T15	2	PROTEICA	74,8	1,6	29,21875	105	109,5	0,95890411
T30	2	PROTEICA	73,8	1,6	28,82813	104	108	0,962962963
T45	2	PROTEICA	70,8	1,6	27,65625	103	106,5	0,96713615
T60	2	PROTEICA	70,5	1,6	27,53906	101,8	105,5	0,96492891
T0	3	MEDITERRANEA	81,4	1,54	34,32282	104,5	113,5	0,920704846

T15	3	MEDITERRANEA	80,4	1,54	33,90116	104,5	114,5	0,912663755
T30	3	MEDITERRANEA		1,54	0			#DIV/0!
T45	3	MEDITERRANEA		1,54	0			#DIV/0!
T60	3	MEDITERRANEA		1,54	0			#DIV/0!
T0	4	PROTEICA	64	1,405	32,42107	96,5	108	0,893518519
T15	4	PROTEICA		1,405	0			#DIV/0!
T30	4	PROTEICA		1,405	0			#DIV/0!
T45	4	PROTEICA		1,405	0			#DIV/0!
T60	4	PROTEICA		1,405	0			#DIV/0!
T0	5	MEDITERRANEA	72,5	1,54	30,57008	106	112	0,946428571
T15	5	MEDITERRANEA	70,6	1,54	29,76893	101,5	109	0,931192661
T30	5	MEDITERRANEA	69	1,54	29,09428	96	108	0,888888889
T45	5	MEDITERRANEA	68	1,54	28,67263	93	105	0,885714286
T60	5	MEDITERRANEA	66,5	1,54	28,04014	92	105	0,876190476
T0	6	VEGETARIANA	70,9	1,46	33,2614	95,5	107	0,892523364
T15	6	VEGETARIANA	69	1,46	32,37005	94	106	0,886792453
T30	6	VEGETARIANA	67	1,46	31,43179	97	107	0,906542056
T45	6	VEGETARIANA	66,6	1,46	31,24414	96	107	0,897196262
T60	6	VEGETARIANA	66	1,46	30,96266	96	110	0,872727273
T0	7	MEDITERRANEA	79,8	1,55	33,2154	103,7	115	0,90173913
T15	7	MEDITERRANEA	77,2	1,55	32,13319	99,5	113	0,880530973
T30	7	MEDITERRANEA	74	1,55	30,80125	103	111	0,927927928
T45	7	MEDITERRANEA	73	1,55	30,38502	98	110	0,890909091
T60	7	MEDITERRANEA	72,6	1,55	30,21852	92	107	0,859813084

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	PESO	ALTEZZA	BMI	CIRC. VITA	CIRC. FIANCHI	VITA/FIANCHI
T0	8	VEGETARIANA	77,6	1,61	29,93712	85,7	118,8	0,721380471
T15	8	VEGETARIANA	75	1,61	28,93407	85	118	0,720338983
T30	8	VEGETARIANA	73,1	1,61	28,20107	83	116	0,715517241
T45	8	VEGETARIANA	72,2	1,61	27,85386	82,5	116	0,711206897
T60	8	VEGETARIANA	71,4	1,61	27,54523	81,5	113	0,721238938
T0	9	PROTEICA	83	1,59	32,83098	94	116,5	0,806866953
T15	9	PROTEICA	80,8	1,59	31,96076	93	115	0,808695652
T30	9	PROTEICA	80,2	1,59	31,72343	90	113	0,796460177
T45	9	PROTEICA	78,3	1,59	30,97188	88	110	0,8
T60	9	PROTEICA		1,59	0			#DIV/0!
T0	10	MEDITERRANEA	76,5	156,6	0,003119	94,6	105,5	0,896682464
T15	10	MEDITERRANEA	74,1	156,6	0,003022	93	103	0,902912621
T30	10	MEDITERRANEA	72,7	156,6	0,002964	92,5	101,5	0,911330049
T45	10	MEDITERRANEA	NO	156,6	#####	NO	NO	#VALORE!
T60	10	MEDITERRANEA	69,7	156,6	0,002842	88	98	0,897959184
T0	11	PROTEICA	75	1,56	30,81854	98	115	0,852173913
T15	11	PROTEICA	72,2	1,56	29,66798	94,5	111,6	0,846774194

T30	11	PROTEICA	70	1,56	28,76397	90	107	0,841121495
T45	11	PROTEICA	69	1,56	28,35306	93	109	0,853211009
T60	11	PROTEICA	67,7	1,56	27,81887	90,5	105	0,861904762
T0	12	VEGETARIANA	98,1	1,78	30,962	112	110,5	1,013574661
T15	12	VEGETARIANA	96	1,78	30,2992	110	108	1,018518519
T30	12	VEGETARINA	96,8	1,78	30,5517	111,5	109,5	1,01826484
T45	12	VEGETARIANA	93,6	1,78	29,54172	109	108,5	1,004608295
T60	12	VEGETARIANA	93	1,78	29,35235	108,5	107	1,014018692
T0	13	VEGETARINA	85,2	1,64	31,67757	109	108	1,009259259
T15	13	VEGETARIANA	83,8	1,64	31,15705	107	109	0,981651376
T30	13	VEGETARIANA	83	1,64	30,85961	106	109	0,972477064
T45	13	VEGETARIANA	82	1,64	30,4878	103,5	108	0,958333333
T60	13	VEGETARIANA	81,2	1,64	30,19036	102	108	0,944444444
T0	14	PROTEICA	80,1	1,61	30,90159	100	121,3	0,824402308
T15	14	PROTEICA	78,5	1,61	30,28433	100	119	0,840336134
T30	14	PROTEICA	79,5	1,61	30,67011	97,5	118,5	0,82278481
T45	14	PROTEICA		1,61	0			#DIV/0!
T60	14	PROTEICA		1,61	0			#DIV/0!

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	PESO	ALTEZZA	BMI	CIRC. VITA	CIRC. FIANCHI	VITA/FIANCHI
T0	15	MEDITERRANEA	75,7	1,57	30,71119	98	99,5	0,984924623
T15	15	MEDITERRANEA	72,8	1,57	29,53467	96	98	0,979591837
T30	15	MEDITERRANEA	71,9	1,57	29,16954	94,5	96	0,984375
T45	15	MEDITERRANEA	71,2	1,57	28,88555	93	96	0,96875
T60	15	MEDITERRANEA	69,7	1,57	28,27701	93	98	0,948979592
T0	16	MEDITERRANEA	89,8	1,65	32,98439	114	112,8	1,010638298
T15	16	MEDITERRANEA	87,2	1,65	32,02938	112,5	111,5	1,00896861
T30	16	MEDITERRANEA	85,5	1,65	31,40496	111	109	1,018348624
T45	16	MEDITERRANEA	84,8	1,65	31,14784	112	110	1,018181818
T60	16	MEDITERRANEA	84,3	1,65	30,96419	109	108	1,009259259
T0	17	VEGETARIANA	79,3	1,63	29,84681	104,5	116,7	0,89545844
T15	17	VEGETARIANA	76	1,63	28,60476	96	113	0,849557522
T30	17	VEGETARIANA	74,9	1,63	28,19075	95	110	0,863636364
T45	17	VEGETARIANA	73,9	1,63	27,81437	95	110	0,863636364
T60	17	VEGETARIANA	73,5	1,63	27,66382	94	110	0,854545455
T0	18	ATTACCO	101,4	1,77	32,36618	114	110,3	1,033544878
T15	18	ATTACCO	98,9	1,77	31,5682	111	110	1,009090909
T30	18	ATTACCO	97,4	1,77	31,08941	110	110	1
T45	18	ATTACCO	95	1,77	30,32334	110	110	1
T60	18	ATTACCO	95	1,77	30,32334	108	109	0,990825688
T0	19	VEGETARIANA	102,5	1,78	32,35071	117	109	1,073394495
T15	19	VEGETARIANA	99,4	1,78	31,3723	114	108,5	1,050691244
T30	19	VEGETARIANA	97,2	1,78	30,67794	114	108	1,055555556
T45	19	VEGETARIANA	97,2	1,78	30,67794	112	108	1,037037037

T60	19	VEGETARIANA	95,4	1,78	30,10983	110	107	1,028037383
T0	20	ATTACCO	85,9	1,69	30,07598	104	104	1
T15	20	ATTACCO	85,2	1,69	29,83089	101	104	0,971153846
T30	20	ATTACCO	83,1	1,69	29,09562	97	103	0,941747573
T45	20	ATTACCO	82,8	1,69	28,99058	97	102,5	0,946341463
T60	20	ATTACCO	83	1,69	29,06061	93,5	102,5	0,912195122
T0	21	MEDITERRANEA	82,5	1,56	33,90039	102	118	0,86440678
T15	21	MEDITERRANEA	80,4	1,56	33,03748	100	116	0,862068966
T30	21	MEDITERRANEA	79,2	1,56	32,54438	98,8	115	0,859130435
T45	21	MEDITERRANEA	77,2	1,56	31,72255	95,3	113	0,843362832
T60	21	MEDITERRANEA	77	1,56	31,64037	95	112	0,848214286

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	PESO	ALTEZZA	BMI	CIRC. VITA	CIRC. FIANCHI	VITA/FIANCHI
T0	22	VEGETARIANA	84,5	1,66	30,66483	98	118	0,830508475
T15	22	VEGETARIANA	82,2	1,66	29,83016	94	116	0,810344828
T30	22	VEGETARIANA	80,5	1,66	29,21324	94	116	0,810344828
T45	22	VEGETARIANA	80	1,66	29,03179	94	114	0,824561404
T60	22	VEGETARIANA	78,8	1,66	28,59631	93	113	0,82300885
T0	23	ATTACCO	75,8	1,617	28,99006	85	115,8	0,73402418
T15	23	ATTACCO	73	1,617	27,91919	84,5	114	0,74122807
T30	23	ATTACCO	72	1,617	27,53674	83,5	112	0,745535714
T45	23	ATTACCO	69	1,617	26,38937	83	109	0,76146789
T60	23	ATTACCO	67,5	1,617	25,81569	83	108	0,768518519
T0	24	MEDITERRNEA	79,1	1,61	30,5158	95	113	0,840707965
T15	24	MEDITERRNEA	77,2	1,61	29,7828	92	112	0,821428571
T30	24	MEDITERRNEA	77,2	1,61	29,7828	91	112	0,8125
T45	24	MEDITERRNEA	74,3	1,61	28,66402	90	109	0,825688073
T60	24	MEDITERRNEA	75	1,61	28,93407	89	112	0,794642857
T0	25	ATTACCO	81,1	1,598	31,75904	88	113	0,778761062
T15	25	ATTACCO	78,4	1,598	30,70171	85,5	113	0,756637168
T30	25	ATTACCO	78,4	1,598	30,70171	85,5	112	0,763392857
T45	25	ATTACCO	78	1,598	30,54506	85	111,5	0,762331839
T60	25	ATTACCO	78,4	1,598	30,70171	86	111	0,774774775
T0	26	VEGETARIANA	73	1,56	29,99671	90	107	0,841121495
T15	26		71,9	1,56	29,54471	90	106	0,849056604
T30	26				#DIV/0!			#DIV/0!
T45	26				#DIV/0!			#DIV/0!
T60	26				#DIV/0!			#DIV/0!

N.B.: Evidenziati i pazienti drop out

Tabella 2

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	TBW (L)	ECW(L)	BCM	FM	FFM
T0	1	VEGETARIANA	38,1	16,8	28,8	27,1	51,9
T15	1	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	1	VEGETARIANA	35,8	16,6	25,7	25,1	48,7
T45	1	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	1	VEGETARIANA	34,5	16,9	23,7	23,4	47
T0	2	PROTEICA	34,3	15	26,2	30,5	47
T15	2	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	2	PROTEICA	35,3	16,1	26	25,7	48,1
T45	2	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	2	PROTEICA	33,7	14,9	25,6	24,3	46,2
T0	3	MEDITERRANEA	35,1	16	25,8	33,5	47,9
T15	3	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	3	MEDITERRANEA					
T45	3	MEDITERRANEA					
T60	3	MEDITERRANEA					
T0	4	PROTEICA	30,9	12,6	25,2	21,5	42,5
T15	4	PROTEICA					
T30	4	PROTEICA					
T45	4	PROTEICA					
T60	4	PROTEICA					
T0	5	MEDITERRANEA	37,7	16,5	28,7	21,2	51,3
T15	5	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	5	MEDITERRANEA	34,5	15,7	25,5	22	47
T45	5	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	
T60	5	MEDITERRANEA	34,9	15,9	25,6	19	47,5
T0	6	VEGETARIANA	32	15,6	21,9	23	43,5
T15	6	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	6	VEGETARIANA	32	15,6	21,9	23	43,5
T45	6	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	6	VEGETARIANA	32,3	14,3	24	21,8	44,2
T0	7	MEDITERRANEA	37,5	16,4	28,5	28,7	51,1
T15	7	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	7	MEDITERRANEA	38,3	16,7	29,1	22	52
T45	7	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	7	MEDITERRANEA	37,4	17,1	27,3	21,8	50,8

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	TBW (L)	ECW(L)	BCM	FM	FFM
T0	8	VEGETARIANA	33,9	15,6	24,7	31,3	46,3
T15	8	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	8	VEGETARIANA	33,9	15,6	24,7	31,3	46,3
T45	8	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO

T60	8	VEGETARIANA	32,6	15,5	23,1	26,8	44,6
T0	9	PROTEICA	40,5	18,6	29,3	28,2	54,8
T15	9	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	9	PROTEICA	40,2	18,4	29,1	25,8	54,4
T45	9	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	9	PROTEICA					
T0	10	MEDITERRANEA	36,7	15,5	28,8	26,4	50,1
T15	10	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	10	MEDITERRANEA	36,6	15,2	29,3	22,6	50,1
T45	10	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	10	MEDITERRANEA	35,1	15,4	26,7	21,7	48
T0	11	PROTEICA	38,8	15,9	31,2	22,1	52,9
T15	11	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	11	PROTEICA	34,9	14,7	27,6	22,2	47,8
T45	11	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	11	PROTEICA	34,9	14,7		19,9	47,8
T0	12	VEGETARIANA	53,1	22,7	41,3	25,8	72,3
T15	12	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	12	VEGETARINA	55,1	23,1	43,4	21,9	47,9
T45	12	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	12	VEGETARIANA	53,4	22,4	41,4	20,4	41,4
T0	13	VEGETARINA	48,1	17,7	42	19,3	65,9
T15	13	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	13	VEGETARIANA	47,7	18,9	39,4	17,9	65,1
T45	13	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	13	VEGETARIANA	47,5	21,2	35,4	16,7	64,5
T0	14	PROTEICA	37,8	16,6	28,7	28,6	51,5
T15	14	PROTEICA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	14	PROTEICA	36,2	15,9	27,5	30	49,5
T45	14	PROTEICA					
T60	14	PROTEICA					

	NR.	TIPO					
	PROG	DIETA/KCAL	TBW (L)	ECW(L)	BCM	FM	FFM
T0	15	MEDITERRANEA	40,1	16,9	31,4	21,2	54,5
T15	15	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	15	MEDITERRANEA	38,4	16	30,4	19,6	52,3
T45	15	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	15	MEDITERRANEA					
T0	16	MEDITERRANEA	35,2	14,5	28,6	41,1	48,7
T15	16	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	16	MEDITERRANEA	34,7	15,3	26,5	37,9	47,6
T45	16	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	16	MEDITERRANEA	34,2	13,6	29,2	35,8	48,5

T0	17	VEGETARIANA	39,1	16	31,5	25,9	53,4
T15	17	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	17	VEGETARIANA	37,4	16,4	28,4	23,9	51
T45	17	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	17	VEGETARIANA	37,6	16,4	28,7	23,6	51,3
T0	18	ATTACCO	56,9	20,1	51	23,6	77,8
T15	18	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T30	18	ATTACCO	55,7	18	53,1	20,8	76,6
T45	18	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T60	18	ATTACCO	53,2	19,6	46,5	22,1	72,9
T0	19	VEGETARIANA	55,8	18,6	52,1	25,8	76,7
T15	19	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	19	VEGETARIANA	55,8	18,6	52,1	20,5	76,7
T45	19	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	19	VEGETARIANA	54,1	14,1	63,9	13	82,4
T0	20	ATTACCO	50,7	19,3	43,1	16,6	69,3
T15	20	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T30	20	ATTACCO	46,8	16,9	41,8	18,6	64,5
T45	20	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T60	20	ATTACCO	46,9	19	38,1	18,9	64,1
T0	21	MEDITERRANEA	37,8	17,1	27,9	31,3	51,4
T15	21	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	21	MEDITERRANEA	35,1	16,4	25,1	31,4	47,8
T45	21	MEDITERRANEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	21	MEDITERRANEA	35,2	16	25,9	29	48

	NR. PROG	TIPO DIETA/KCAL	TBW (L)	ECW(L)	BCM	FM	FFM
T0	22	VEGETARIANA	41,9	18	32,3	27,5	57
T15	22	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	22	VEGETARIANA	41	17,4	32	24,7	55,8
T45	22	VEGETARIANA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	22	VEGETARIANA	38,4	15,5	31,3	26,2	52,6
T0	23	ATTACCO	34,4	13,9	28,3	28,3	47,5
T15	23	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T30	23	ATTACCO	34	14,8	26,1	25,4	46,6
T45	23	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T60	23	ATTACCO	35,5	14	29,7	18,7	48,8
T0	24	MEDITERRNEA	35,4	16,3	25,8	30,7	48,4
T15	24	MEDITERRNEA	NO	NO	NO	NO	NO
T30	24	MEDITERRNEA	34,5	17	23,5	30,2	47
T45	24	MEDITERRNEA	NO	NO	NO	NO	NO
T60	24	MEDITERRNEA	33,2	16,2	22,9	29,6	45,4
T0	25	ATTACCO	37,4	16	29,2	30	51,4

T15	25	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T30	25	ATTACCO	37,3	15,7	29,5	27,4	51
T45	25	ATTACCO	NO	NO	NO	NO	NO
T60	25	ATTACCO	34	15,8	24,5	31,9	46,5
T0	26	VEGETARIANA					
T15	26						
T30	26						
T45	26						
T60	26						

N.B.: Evidenziati i pazienti drop out

Progetto n. 21: “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”

Responsabile: dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Antonella Mirizzi, Filippo Procino, Angelo Campanella, Letizia Pesole, Irene Bruno, Claudia Buongiorno, Valentina De Florio, Carla Leone, Anna Maria Pascale Luca Di Lena, Fabio Fucilli, Giuseppe Di Giovanni, Nicola Giampaolo.

Background:

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 saranno reclutati i 1450 soggetti del progetto Micol, di età compresa tra i 64 e i 40 anni.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Il richiamo per la terza 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 sarà effettuata tramite il questionario internazionale per l’attività fisica (IPAQ), nella sua forma lunga e versione italiana.

Ai soggetti del progetto viene fatto un prelievo ematico, la Bioimpedenziometria e l'ecografia dell'addome superiore. Parte del sangue viene destinato alla biobanca. In questo studio viene anche raccolto un campione di feci.

Il follow-up dei soggetti appartenenti alla coorte Micol under 65 anni ha cominciato la sua fase operativa il 01 Settembre 2017 e sono stati arruolati 900 soggetti a tutt'oggi.

Progetto n. 22: “Analisi costo-beneficio di un intervento basato sulla dieta mediterranea e l'attività fisica in pazienti diabetici e steatosici”

Responsabile: dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Antonella Bianco, Antonella Mirizzi, Filippo Procino, Angelo Campanella, Letizia Pesole, Irene Bruno, Claudia Buongiorno, Valentina De Florio, Carla Leone, Anna Maria Pascale, Luca Di Lena, Fabio Fucilli, Giuseppe Di Giovanni, Nicola Giampaolo

Background:

L'attività fisica ha sempre giocato un ruolo fondamentale nella prevenzione e trattamento delle malattie cronico degenerative. Nel 1569 Mercurial definì l'esercizio fisico come “una naturale propensione dell'essere umano il cui proposito è mantenere la salute e recuperarla quando è andata persa”

Nel 2050 la percentuale di persone over 60 anni crescerà fino al 40% e la percentuale di coloro con più di 80 anni al 10-15%. Questo significa che, in prospettiva, un adulto che lavora su tre avrà più di 50 anni. Aiutarlo a mantenere la capacità di lavoro ed una vita indipendente e autosufficiente sia nella vita quotidiana sia nel tempo libero diventerà cruciale, pertanto, nelle prossime decadi.

Un altro aspetto importante è mantenere una buona forza muscolare. Le sfide che propongono gli anziani (>60 anni) non sono differenti da quelle che propongono persone più giovani; tuttavia, occorre valutare attentamente i singoli casi individuali, dipendendo dell'età, adattamenti funzionali e strutturali ed una diminuita capacità in generale.

Più il soggetto ha uno stile di vita meno attivo, più precocemente si manifesteranno cambiamenti quali, principalmente, ridotta capacità motoria e problemi vestibolari. Inoltre, ad una riduzione delle fibre muscolari (tipo 1 e 2 principalmente negli arti inferiori), la responsabilità di questi cambiamenti ricade su fattori neuronali (riduzione del numero di motoneuroni) e disfunzioni della funzione meccanica del muscolo (per esempio frequenza massima ridotta o ridotta elasticità)

La forza muscolare diminuisce gradualmente dal 30esimo anno fino al 50esimo anno di vita. Nella sesta decade di vita, è stato osservato un'ulteriore diminuzione non lineare del 16% e nell'ottava decade questa diminuzione può raggiungere il 30%. Questo risulta in un'ulteriore riduzione dello scambio di informazione sensoriale-motoria con una riduzione della qualità della coordinazione inter e intramuscolare. La perdita funzionale della forza e dell'equilibrio è il risultato inevitabile e conseguente.

Alcuni studi hanno dimostrato che l'allenamento fisico può contrastare gli effetti dell'età.

Gli anziani inoltre sono generalmente portatori di una o più malattie croniche o di fattori di rischio ad esse associate.

In Italia tra il 1998 ed il 2012 la prevalenza di alcuni fattori di rischio associati a malattie cardiovascolari è aumentata notevolmente. Questo trend è stato osservato in entrambi i sessi ed in tutte le classi sociali. In particolare, il diabete si presenta come un fattore importante all'interno dello spettro delle malattie croniche, unitamente all'obesità e alle dislipidemie.

Numerose evidenze scientifiche segnalano l'importanza dell'attività fisica sia come intervento di prevenzione primaria e secondaria che come vera e propria terapia.

In questo ambito si inserisce questo progetto, che si propone di integrare l'attività fisica e la dieta nell'ambito del Diabete di tipo 2, l'obesità e l'impatto costo beneficio per il SSN. Tale progetto è inoltre propedeutico ad un'integrazione dell'IRCCS nell'assistenza territoriale.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Il Progetto è iniziato a marzo 2018 e sinora sono stati reclutati 50 soggetti. Il ritardo di inizio studio è dovuto ai rallentamenti nell'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) e degli strumenti necessari al monitoraggio di parametri biochimici durante le sedute di palestra (acidolattico, glicemia). Tuttavia, dopo il completamento delle procedure il progetto è stato avviato ed il ritmo di arruolamento è ottimale, avendo già una discreta lista di attesa per i gruppi successivi. Il tipo di impegno dei pazienti da un punto di vista funzionale (ipertesi, diabetici, dislipidemici e dei tempi di valutazione) limita la quantità di partecipanti contemporaneamente per cui è stato richiesto un altro contratto per un laureato in Scienze Motorie all'uopo di aumentare l'efficienza nel reclutamento. Le sedute in palestra si svolgono da lunedì al sabato. Il gruppo che ha scelto i giorni lunedì, mercoledì e venerdì ha accesso alla palestra in tre turni diversi: alle 8, alle 10 e alle 14. Le attività nei giorni di martedì, giovedì e sabato si svolgono in un unico turno alle ore 7.

Contemporaneamente ed in modo parallelo si è proceduto all'avvio dei Gruppi di Cammino. Le camminate hanno una frequenza settimanale doppia nei turni di mattina e pomeriggio. Ad oggi si sono iscritti e partecipano almeno una volta a settimana un totale di 220 persone con un gruppo regolare di 40 e 50 persone nei turni di mattina e pomeriggio rispettivamente. Sono stati programmati ed eseguiti, su frequenza mensile, camminate durante il fine settimana in percorsi extra urbani una volta al mese ed il gruppo ha partecipato a diversi eventi pubblici, inerenti il fitness ed il benessere fisico (Roccella Ionica, Calabria e Castellana Grotte).

Progetto n. 23: “Effetto di alcuni polimorfismi genetici e della loro interazione con i dietary patterns sulla severità della NAFLD”

Responsabile: dott. Alberto R. Osella

Partecipanti: Angela Teresa Di Lorenzo, Caterina Bonfiglio, Isabella Franco, Antonella Bianco, Antonella Mirizzi, Filippo Procino, Angelo Campanella, Letizia Pesole, Irene Bruno, Claudia Buongiorno, Valentina De Florio, Carla Leone, Filomena Cariola, Antonio Di Carlo.

Background:

Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) è la causa più comune di malattia epatica cronica nei paesi industrializzati sia negli adulti che in ragazzi. Tale fenomeno accompagna l'epidemia

mondiale di obesità, la cosiddetta globesità. È stato stimato che dal 20% al 30% degli adulti e dal 3% al 10% dei ragazzi del mondo occidentale hanno una NAFLD e questa percentuale arriva fino all'80% nella popolazione obesa. Il termine NAFLD comprende una serie di momenti della malattia epatica cronica: dalla semplice steatosi alla steatoepatite (NASH), con lesioni epatocellulari, necroinfiammazione ed attivazione della fibrogenesi epatica. Anche se da un punto di vista tradizionale NAFLD viene definito come uno spettro di patologie; questo punto di vista è recentemente stato modificato dato che, la semplice steatosi e la NASH, rappresentano due entità diverse.

La steatosi semplice ha generalmente un decorso clinico benigno mentre la NAHS è una condizione potenzialmente severa con un significativo, aumentato rischio di malattie epatiche associate e con aumentata morbilità e mortalità.

Ad oggi i dati sull'associazione tra fattori genetici e lo sviluppo di NASH vs semplice steatosi sono scarsi. Studi realizzati su bambini hanno indicato che lo stile di vita sedentario con una dieta ricca in calorie aumentano il BMI e l'adiposità viscerale, ma altri studi hanno indicato una forte influenza degli aspetti genetici nella NAFLD. Tuttavia, gli studi sugli adulti sono molto pochi.

Il dominio dei polimorfismi Patatin-like phospholipase containing-3 [PNPLA3] e Lipin 1 [LPIN1]), oxidative stress (eg, superoxide dismutase 2 [SOD2]), insulin signaling (eg, insulin receptor substrate-1 [IRS-1]), e fibrogenesis (eg, Kruppel-like factor 6 [KLF6]), sono stati associati con la severità del danno epatico.

Alcuni studi hanno trovato un'associazione tra dietary patterns, BMI ed i polimorfismi in bambini anche se i risultati non sono definitivi.

Quindi insorge una urgente necessità di trovare i mezzi per una diagnosi precoce per l'identificazione dei fattori predittivi di progressività della malattia cronica epatica non solo nei bambini ma anche negli adulti, giacché la diagnosi ricade sulla biopsia epatica la quale non sempre è possibile effettuare, sia per motivi etici che clinici. Gli score clinici disponibili sono parzialmente utili nella discriminazione di una minoranza di pazienti che hanno già una fibrosi in atto, quindi la diagnosi non invasiva contestuale di fattori genetici predisponenti a basso costo rappresenta uno strumento di grande utilità sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista della sanità pubblica.

Stato di avanzamento del progetto (nel caso di seconda o terza annualità):

Nell'ambito di questo progetto sono stati arruolati 180 soggetti: 120 controlli provenienti dalla popolazione generale di Putignano, rientranti nel progetto Nutriep, e 60 casi con le caratteristiche su menzionate arruolati in un trial clinico dal titolo "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".

I soggetti sono stati successivamente richiamati per il prelievo di sangue e per ottenere il loro consenso informato per questo ulteriore accertamento di laboratorio. I controlli sono stati selezionati

Non si rendono necessari ulteriori procedimenti perché i dati relativi alla storia medica e personale di ogni soggetto sono stati già ottenuti.

Progetto n. 24: “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”

Responsabile: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: dott. Aberto Osella, dott. Nicola Veronese, dott.ssa Maria Notarnicola, dott.ssa Valeria Tutino, sig.na Valentina De Nunzio, dott.ssa Anna Maria Cisternino, dott.ssa Rosa Reddavid, sig. Vito Guerra

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 reductasi 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. 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. E’ importante sottolineare che le LDL piccole e dense sono notoriamente più aterogene delle LDL normali, più ampie e più leggere: probabilmente per la loro maggiore capacità di penetrare nel subendotelio (grazie alle ridotte dimensioni), ma anche per la loro limitata capacità di resistere allo stress ossidativo, che le porta a convertirsi, soprattutto nello strato sottoendoteliale della parete arteriosa, in LDL ossidate, in grado di attivare i meccanismi della chemiotassi, la penetrazione di cellule infiammatorie ed, in ultima analisi, i meccanismi dell’aterogenesi. Il profilo caratterizzato da bassi valori della colesterolemia HDL, da alti valori plasmatici dei trigliceridi, e da alterazioni qualitative delle LDL, che assumono maggiore densità e minori dimensioni, è secondo alcuni autori l’anomalia lipidica più frequente nei soggetti sopravvissuti ad un infarto miocardico; certamente questo assetto lipidico, denominato variamente nella letteratura (dislipidemia

aterogenica, triade lipidica) contribuisce in maniera significativa all'aumentata probabilità di eventi vascolari dei soggetti con soprappeso o obesità, e spesso si associa anche a malattie neoplastiche specie del colon retto.

È possibile che tale associazione possa essere mediata, almeno in parte, dalle variazioni dei livelli di adiponectina, una citochina prodotta dal tessuto adiposo, dotata di un'azione complessiva antinfiammatoria ed antiaterogena e che tende a ridursi all'aumentare della massa adiposa, specie in presenza di un eccesso di tessuto adiposo addominale. L'adiponectina, infatti, correla in maniera inversa con i livelli della lipasi epatica, che è l'enzima lipasico che più specificamente agisce sulle lipoproteine LDL ed HDL ad elevato tenore di trigliceridi convertendole nelle particelle corrispondenti di minori dimensioni e di maggiore densità. L'adiponectina, inoltre, correla in maniera inversa anche con il catabolismo dell'Apo-I, l'apolipoproteina essenziale per la funzione e la struttura delle HDL: all'aumentare dell'adiposità addominale, quindi, si riducono i livelli di adiponectina ed aumenta il catabolismo dell'apo-AI, i cui livelli plasmatici, di conseguenza, si riducono a loro volta.

Infine, è ancora opportuno ricordare che alcuni dei componenti della tipica alimentazione moderna sono in grado di influenzare sfavorevolmente questi parametri lipidici, e vanno pertanto selettivamente ridotti (al di là dell'esigenza ovvia di controllare l'apporto calorico totale) nel paziente con soprappeso o obesità. Ad esempio, il consumo di acidi grassi della serie trans si associa ad una progressiva attivazione dei fenomeni della flogosi, documentati da un aumento dei livelli della PCR.

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 classici sarà importante per ottenere una descrizione accurata dello scenario delle trasformazioni metaboliche che possono evidenziarsi in queste patologie.

Dalle prime analisi di lipidomica effettuate sui GR congelati da più di 20 anni è emerso un errore nella valutazione al gas-cromatografo e pertanto si è deciso di limitare lo studio alla sola analisi delle LDL-piccole e dense, associando adiponectina e PCR. Tuttavia, grazie alla ripresa della coorte MICOL sono stati elaborati altri dati oggetto di pubblicazioni nell'anno 2018 e di seguito elencate:

- 1) Potato Consumption Is not Associated with Higher Risk of Mortality: A Longitudinal Study among Southern Italian Older Adults. Osella AR, Veronese N, Notarnicola M, Cisternino AM, Misciagna G, Guerra V, Nitti A, Campanella A, Caruso MG. *J Nutr Health Aging*. 2018;22(6):726-730. doi: 10.1007/s12603-018-1018-4.
- 2) Menopause Does Not Affect Fatty Liver Severity In Women: A Population Study in a Mediterranean Area. Veronese N, Notarnicola M, Osella AR, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, Guerra V, Rotolo O, Zinzi I, Chiloiro M, Leandro G, Correale M, Tutino V, Misciagna G, Bonfiglio C, Caruso MG. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2018;18(5):513-521. doi: 10.2174/1871530318666180423101755.
- 3) Dietary fiber and health outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. Veronese N, Solmi M, Caruso MG, Giannelli G, Osella AR, Evangelou E, Maggi S, Fontana L, Stubbs B, Tzoulaki I. *Am J Clin Nutr*. 2018 Mar 1;107(3):436-444. doi: 10.1093/ajcn/nqx082.
- 4) Coffee Intake and Liver Steatosis: A Population Study in a Mediterranean Area. Veronese N, Notarnicola M, Cisternino AM, Reddavid R, Inguaggiato R, Guerra V, Rotolo O, Zinzi I, Leandro G, Correale M, Tutino V, Misciagna G, Osella AR, Bonfiglio C, Giannelli G, Caruso MG; MICOL Group. *Nutrients*. 2018 Jan 15;10(1). pii: E89. doi: 10.3390/nu10010089.

La coorte totale comprende 800 soggetti con età over 65 in un'area Mediterranea del sud Italia. A dicembre 2016, 85 soggetti avevano avuto infarto del miocardio e 75 avevano sviluppato un tumore. Dalla stessa coorte sarà individuato un soggetto controllo senza nessuno degli outcomes di interesse che verrà appaiato per sesso, età ad ogni caso; quindi in totale saranno oggetto dello studio 320 soggetti. 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 riferiti è stata validata con i medici di famiglia di ciascun soggetto, secondo i seguenti indicatori di malattia certa: la diagnosi di evento cardiovascolare è stata effettuata sulla base della diagnosi di Infarto Acuto del Miocardio insieme ad almeno un ECG con segni di 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 indicativi di procedure chirurgiche o terapie mediche per il cancro.

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio è stata già effettuata su un totale di 236 campioni, 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. Non sono state ancora effettuati i dosaggi di adiponectina e PCR, né sono stati valutati i patterns dietetici.

La tabella sottostante mostra il numero di campioni su cui è stato effettuato ad oggi il dosaggio delle LDL piccole e dense.

n. campioni	Causa di morte	Dosaggi
40/75	CANCRO	LDL piccole e dense
83/85	CVD	LDL piccole e dense
30/75	controllo CANCRO	LDL piccole e dense
82/85	controllo CVD	LDL piccole e dense

L'interazione tra patterns dietetici e profili lipidici sarà valutata mediante test statistici appropriati al fine di individuare profili metabolici precoci di malattie complesse come le malattie cardiovascolari e il cancro. Ci aspettiamo una significativa associazione tra livelli sierici di LDL piccole e dense e l'incidenza di infarto del miocardio e tumori del colon retto, prostata e mammella, tenendo conto dei fattori di rischio metabolici comuni. Se questa associazione esiste, i nostri risultati potrebbero essere utili per identificare quegli individui esposti a rischi metabolici e consentirà la progettazione di formulazioni nutraceutiche protettive o interventi nutrizionali mirati a correggere queste alterazioni.

Attraverso la costruzione di banche dati di profili lipidici con il nuovo dosaggio delle LDL piccole e dense con altri parametri biochimici ed enzimatici del pathway lipidico di soggetti con infarto del miocardio e cancro sarà possibile creare prototipi di nutraceutici o diete personalizzate. L'innovazione del nostro progetto è diretta verso la medicina personalizzata. La potenza dell'integrazione di profili lipidici risiede nella sua capacità di personalizzare il profilo, che è il risultato della combinazione di analisi e storia del soggetto al fine di tracciare una storia individuale, che colleghi tra loro i vari elementi di familiarità, dieta, stile di vita e la funzione metabolica.

I profili lipidici e delle LDL piccole e dense verranno correlati ad altri fattori nutrizionali e farmacologici, nonché di aderenza alla dieta mediterranea, per costruire panels integrati della valutazione biochimica complessiva.

Alla luce dei risultati finali tutto il data base verrà trasferito al software Stata per l'analisi statistica finale.

Progetto n. 25: “Studio pre-clinico e clinico dei meccanismi fisiopatologici, cellulari e molecolari della regolazione della barriera intestinale in risposta a diete a differente composizione in carboidrati”

Responsabile: dott. Francesco Russo

Partecipanti: C. Clemente, A. Crovace, B. D’Attoma, I. Gigante, M. Linsalata, M. Martulli, M. Notarnicola, A. Orlando, G. Riezzo, V. Tutino.

Attualmente è in corso un progetto di ricerca corrente (n. 26; DDG n. 748/2018) dal titolo “***Studio pre-clinico e clinico dei meccanismi fisiopatologici, cellulari e molecolari della regolazione della barriera intestinale in risposta a diete a differente composizione in carboidrati***”, che si basa sulle potenzialità terapeutiche di particolari regimi alimentari nel trattamento della D-IBS. Tale progetto è costituito da una parte clinica accanto ad una pre-clinica. Lo studio clinico prevede un trial clinico randomizzato, singolo cieco, in cui si valuta la sintomatologia GI, lo stato nutrizionale e psicologico, il profilo ematochimico, la permeabilità intestinale (PI), il profilo infiammatorio, la lipidomica dei pazienti con D-IBS prima e dopo trattamento per tre mesi con diete specifiche per IBS. Lo studio pre-clinico include una sperimentazione *in vitro* condotta su linee cellulari umane di tumore intestinale in cui si valutano gli effetti del plasma dei pazienti IBS-D, sottoposti a due diversi tipi di dieta, sulla modulazione della PI attraverso l'espressione di differenti proteine di giunzione intercellulare. Parallelamente, in un modello sperimentale animale di disbiosi intestinale, che riproduce abbastanza fedelmente i sintomi clinici di pazienti affetti da IBS, si valutano gli effetti delle differenti diete sul ruolo potenziale della PI e del microbiota intestinale nella patogenesi dell'IBS. A tale scopo, nel corso del 2018 è stata sottomessa al Ministero della Salute tutta la documentazione relativa al progetto e necessaria ai fini della autorizzazione alla sperimentazione, ottenuta in data 28/11/2018, ai sensi dell'art. 31 del D.lgs 26/2014. Pertanto, sono in corso le procedure d'acquisto delle diete e degli animali per completare la parte *in vivo* prevista.

Il razionale dello studio clinico si basa sull'associazione tra l'assunzione di determinati cibi e la comparsa e/o il peggioramento dei sintomi GI in IBS. Sono stati proposti molti approcci dietetici ma pochi nell'ambito di studi controllati. Infatti, le raccomandazioni attuali si basano principalmente sugli effetti fisiologici dei costituenti alimentari piuttosto che su prove scientifiche derivanti da adeguati trials clinici. Recenti evidenze suggeriscono che l'assunzione di oligosaccaridi fermentabili, disaccaridi, monosaccaridi e polioli (FODMAPs) possa innescare sintomi GI in pazienti con IBS. Questi carboidrati sono poco assorbiti nell'intestino tenue e possono passare integri nel colon, dove aumentano l'acqua endoluminale attraverso l'attività osmotica e inducono la produzione di gas a causa della loro fermentazione ad opera della flora batterica intestinale. Ciò a sua volta può causare distensione addominale e diarrea. Una dieta povera di FODMAPs (lowFODMAPs) sembra essere particolarmente utile in pazienti affetti da IBS, ma finora pochi trials randomizzati hanno riportato dati a favore della effettiva superiorità di una dieta lowFODMAPs rispetto alla pratica dietetica tradizionale utilizzata per i pazienti con IBS (ovvero incoraggiare un pasto regolare e "mangiare sano"; evitare grandi pasti; ridurre l'assunzione di grassi;

scoraggiare l'assunzione eccessiva di fibre, in particolare le fibre insolubili; ridurre la caffeina; evitare cibi che inducono meteorismo).

Per questo studio sono selezionati pazienti adulti (tra 18-65 anni) afferenti all' "Ambulatorio di Celiachia e disturbi funzionali" che soddisfacessero i criteri di Roma III-IV per IBS variante diarrea (IBS-D) (in questo gruppo si ha la massima efficacia della dieta – con un miglioramento che interessa sino al 75% dei pazienti). I criteri di esclusione sono: la presenza di gravi patologie cardiache, epatiche, neurologiche o psichiatriche o di malattie GI diverse da IBS (ad esempio, malattia infiammatoria intestinale, malattia celiaca) che potrebbero spiegare i sintomi attuali. Inoltre, saranno esclusi quei pazienti che hanno precedentemente seguito una dieta a basso contenuto di particolari sostanze (ad esempio, basso contenuto di FODMAPs, dieta vegana, dieta priva di glutine). Questa ultima categoria di soggetti potrà rientrare nello studio a patto di sospendere la dieta priva di glutine fino alla ricomparsa dei sintomi. La dieta a ridotto contenuto di lattosio è consentita, purché i pazienti accettino di mantenere costante questa assunzione durante il periodo di studio, tranne nel caso di randomizzazione nel braccio di trattamento con dieta a basso contenuto di FODMAPs. I pazienti devono anche essere disposti a modificare la loro dieta attuale per partecipare allo studio. L'uso di prodotti probiotici è consentito, e i pazienti che consumano prodotti probiotici devono essere istruiti a continuare ad assumere per tutto il periodo di studio, la stessa quantità precedentemente assunta. I farmaci utilizzati per il trattamento dell'IBS, compresi gli antidepressivi, saranno ammessi a condizione che vengano usati regolarmente e abbiano un dosaggio stabile per almeno un mese prima dell'inclusione nello studio.

Nel corso del 2018 è iniziato il reclutamento dei pazienti, una volta ottenuto il necessario parere del Comitato Etico (avvenuto in data 18.12.2017; n. 274). A tutt'oggi abbiamo selezionato 50 pazienti con i requisiti di inclusione/esclusione descritti sopra. Di questi, 23 pazienti (5 maschi e 18 femmine; età media 43 ± 10 aa) hanno completato o sono in fase di completamento del trial clinico, 4 sono stati persi nel follow-up (rinuncia da parte dei pazienti per motivi di lavoro), 23 soggetti non hanno aderito al progetto. (in allegato lo schema del progetto e il dettaglio delle singole visite)

In seguito al reclutamento dei pazienti, è stata effettuata la raccolta del materiale biologico (sangue, feci ed urine) al giorno 0. Successivamente, è stata effettuata la stessa raccolta su 12 pazienti che hanno completato la 1° fase dello studio, prima dell'inizio della dieta e dopo 90 giorni. I campioni di siero, feci ed urine sono stati aliquotati e conservati a -80 °C fino al momento dei dosaggi. Sono stati valutati i livelli ematici di zonulina, un peptide coinvolto nella permeabilità intestinale e dell'enzima Diaminossidasi, marker di integrità cellulare dell'epitelio intestinale. Accanto ai livelli ematici, sono stati anche dosati i livelli di zonulina nelle feci. Nelle urine a tempo 0 e dopo 3 mesi è stato dosato l'indolo, un marker di alterata flora batterica intestinale. I valori delle variabili biochimiche analizzate sono riportati nella sottostante tabella.

	Giorno 0	Dopo 90 giorni
Zonulina fecale (ng/mL)	116.7 [41.4-290.3]	83.3 [42.9-219.5]
Zonulina sierica ng/mL)	58.7 [33.4-78.0]	60.1 [36-73.4]
Diaminossidasi (ng/mL)	34.3 [21.0-50.2]	34.8 [24.4-76.0]
Indolo urinario(mg/dL)	6.7 [0.94-16.8]	5.0 [0.75-11.7]

Le variabili sono espresse come mediana e range

Come dato preliminare, considerando in toto i pazienti finora entrati nello studio (non divisi, quindi, per trattamento dietetico), come dato saliente, si assiste ad un decremento di circa il 29% dei valori di zonulina fecale. Inoltre, negli stessi pazienti è iniziata l'analisi lipidomica sulla membrana eritrocitaria in due tempi. Le valutazioni sono condotte dal gruppo del Laboratorio di Biochimica Nutrizionale. La metodica di estrazione degli acidi grassi è eseguita mediante impiego del robot

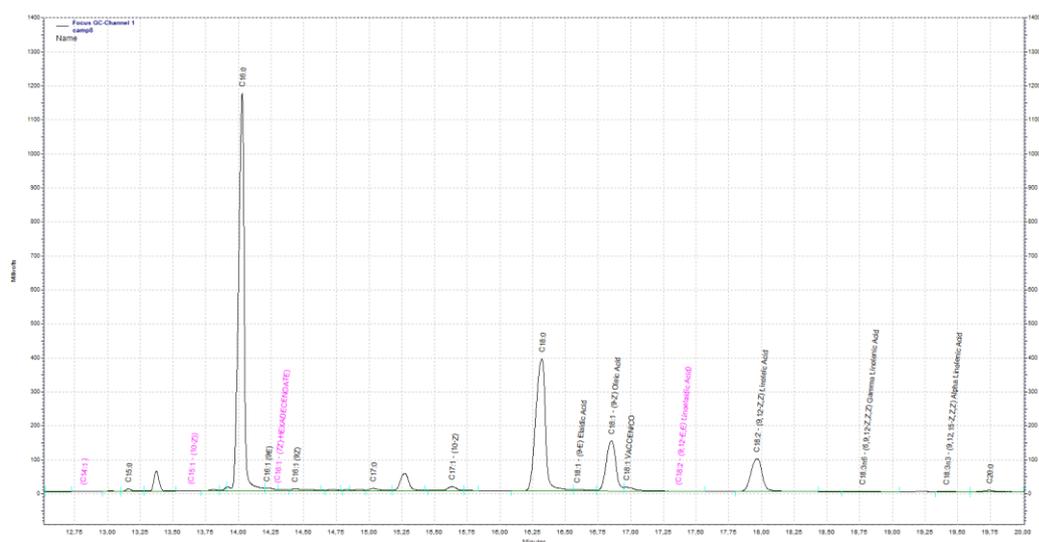
LNG-R1 della Lipinutragen. Questo sistema robotizzato è in grado di selezionare l'eritrocita maturo ed estrarre i singoli acidi grassi dalla membrana eritrocitaria.

Un'aliquota di sangue intero è caricata a bordo del robot che procede a selezionare i globuli rossi maturi e a determinare la loro rottura con lisi osmotica. Dopo la lisi, è eseguito il processo di estrazione dei lipidi presenti nelle membrane cellulari; gli acidi grassi vengono estratti con esano dopo transesterificazione per idrolisi basica ottenendo una soluzione di metil esteri degli acidi grassi che viene iniettata nel gas-cromatografo. L'analisi gas cromatografica separa i singoli acidi grassi in base all'ordine di eluizione ottenendo un cromatogramma da cui si può effettuare un'analisi quantitativa e qualitativa.

Di seguito è riportata una tabella con i dati sinora ottenuti dai 12 pazienti che hanno completato lo studio ai tempi T₀ e T₂ (dopo 90 giorni di trattamento dietetico). Il dato più significativo è la riduzione, dopo 90 giorni di trattamento, del rapporto AA/EPA, considerato un indice di infiammazione tissutale.

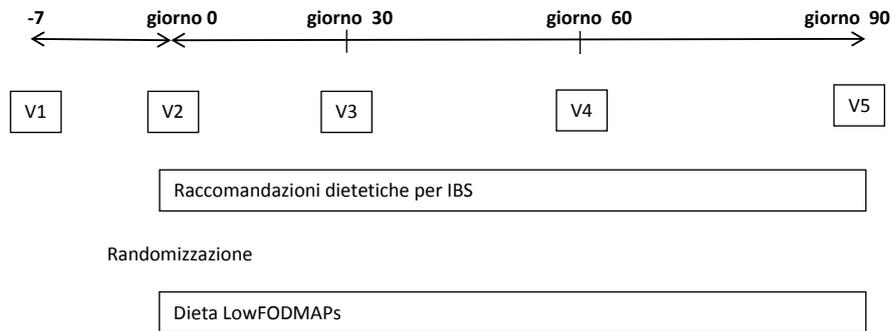
Acidi grassi	(% rel.) T0	(% rel.) T1	v.n. (% rel.)
Acido Stearico (C18:0)	14,98	15,92	13 - 20
Acido Oleico (C18:1) omega 9	14,67	14,88	9 - 18
Acido Arachidonico (C20:4) omega 6 (AA)	14,16	13,43	13 - 17
Acido Eicosapentaenoico (C20:5) omega 3 (EPA)	0,67	0,72	0.5 - 0.9
Acidi grassi saturi totali (SFA)	43,50	45,22	30 - 45
Acidi grassi monoinsaturi totali (MUFA)	20,08	20,85	13 - 23
Acidi grassi polinsaturi totali (PUFA)	36,30	33,82	28 - 39
AA/EPA ratio	24,53	19,44	< 15

A seguire, un esempio di profilo di acidi grassi ottenuto dall'analisi gas-cromatografica:



Allegato 1

Schema del progetto e il dettaglio delle singole visite



- V1. (Screening). Durante la visita, i pazienti riceveranno informazioni verbali e scritte sullo studio e sottoscriveranno il loro consenso informato. I pazienti saranno inoltre informati sull'obiettivo dello studio che è quello di confrontare due diverse diete con potenziali benefici per i pazienti. Tali benefici saranno valutati sulla scorta di un miglioramento dei sintomi dell' IBS. Inoltre, i pazienti saranno informati anche circa il fatto che nessuna delle diete si è dimostrata capace di curare l'IBS o in grado di controllare completamente tutti i sintomi e che, infine, nessuna prova scientifica ha sinora dimostrato che una delle diete sia effettivamente superiore all'altra. Durante i successivi 7 giorni, i partecipanti completeranno un diario quotidiano sulle caratteristiche delle feci basato sulla scala di Bristol e sulla valutazione delle abitudini intestinali, nonché un diario alimentare.
- V2. (Giorno 0). Randomizzazione. Sette giorni dopo la visita di screening, i pazienti torneranno per la visita ambulatoriale. In tale occasione i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS Symptom Severity Scale (IBS-SSS) e Gastrointestinal Symptoms Rating Scale – GSRS) (vedi allegati). Per entrare nella fase di randomizzazione sarà necessario che lo score IBS-SSS sia maggiore o uguale a 175 (ovverosia, i sintomi IBS dovranno risultare da moderati a gravi). I criteri di inclusione e di esclusione saranno nuovamente esaminati, incluse le abitudini alimentari. Se i pazienti saranno ritenuti idonei alla randomizzazione, uno specifico programma provvederà alla assegnazione a uno dei due bracci dello studio per seguire due diverse diete. Nel corso della visita, i pazienti completeranno anche i questionari relativi alla qualità della vita (Quality of Life - QoL) (IBS QoL e i questionari SCL-90 e SF-36) (vedi allegati), e riceveranno 4 dispense, una per ogni settimana d'intervento, contenenti i questionari e i diari che i pazienti dovranno completare durante lo studio (Diario sintomatologico, diario alimentare e Bristol Stool Form da compilare ogni giorno - vedi allegato, nonché l'IBS-SSS da compilare ogni 15 giorni). In occasione di tale visita, sarà eseguito un prelievo ematico e prelievo dei campioni biologici (urine, feci) necessari per le valutazioni strumentali previste dallo studio. Le diete che saranno somministrate a random (dieta A o dieta B), avranno entrambe lo scopo di alleviare i sintomi relativi all'IBS. I pazienti saranno consigliati, con il supporto di un nutrizionista, di assumere una dieta a basso contenuto in FODMAP s(dieta A) o una specifica dieta per IBS (consigli dietetici - dieta B) nonché di seguire tali regimi durante le successive 12 settimane (con controlli nutrizionali intermedi ogni 4 settimane) prima di tornare alla visita finale prevista dallo studio. Durante la prima visita nutrizionale, il paziente sarà sottoposto a un colloquio atto a valutare lo stile di vita, le abitudini alimentari, le condizioni fisiologiche ed, eventualmente, quelle patologiche. Sarà, inoltre, effettuata una valutazione antropometrica (peso, altezza, circonferenze) nonché un'analisi bioimpedenziometrica con successiva consegna del diario alimentare, da compilare e consegnare ad ogni visita di controllo, insieme a tutto il materiale informativo necessario alla corretta adesione allo studio.
- V3. (giorno 30): Visita intermedia. Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno i questionari sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IBS diet adherence Report Scale – IDARS) (vedi allegato). L'adesione alla dieta sarà, inoltre, oggetto dell'incontro con il nutrizionista che effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento.
- V4. (giorno 60): Visita intermedia. Come V3.
- V5 (giorno 90): Visita di fine trattamento. Durante questa visita saranno raccolti i questionari completati, incluso il diario sintomatologico e alimentare, e i pazienti completeranno il questionario sintomatologici (IBS-SSS e GSRS) e il questionario sull'aderenza alla dieta (IDARS). Inoltre, saranno somministrati i questionari relativi alla QoL (IBSQoL, SCL-90 e SF-36). L'adesione alla dieta sarà oggetto dell'incontro con il nutrizionista che effettuerà nuovamente una valutazione antropometrica e un'analisi bioimpedenziometrica, e valuterà i potenziali eventi avversi comparsi durante il periodo di intervento. Sarà eseguito un prelievo ematico e dei campioni biologici necessari per le valutazioni strumentali previste dallo studio.

Elenco delle Pubblicazioni dell'Istituto anno 2018

Linea 1 - Medicina di precisione in gastroenterologia

1. Liso Marina, De Santis S, Scarano A, Verna G, Dicarlo Manuela, Galleggiante V, Campiglia P, Mastronardi Mauro, Lippolis Antonio, Vacca M, Sobolewski A, Serino Grazia, Butelli E, De Angelis M, Martin C, Santino A, Chieppa Marcello. A Bronze-Tomato Enriched Diet Affects the Intestinal Microbiome under Homeostatic and Inflammatory Conditions. *Nutrients*. 2018; 10 (12): 1862-
2. Turco A, Monteduro Anna Grazia, Mazzotta E, Maruccio G, Malitesta C. An Innovative Porous Nanocomposite Material for the Removal of Phenolic Compounds from Aqueous Solutions. *Nanomaterials*. 2018; 8 (5):334.
3. Ventura Y, Carr Brian I, Kori I, Guerra Vito, Shibolet O. Analysis of aggressiveness factors in hepatocellular carcinoma patients undergoing transarterial chemoembolization. *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 24 (15):1641-1649.
4. Sansone F, Esposito T, Lauro MR, Picerno P, Mencherini T, Gasparri F, De Santis S, Chieppa Marcello, Cirillo C, Aquino R. Application of Spray Drying Particle Engineering to a High-Functionality/Low-Solubility Milk Thistle Extract: Powders Production and Characterization. *Molecules*. 2018; 23 (7): 1716.
5. De Santis S, Fiorentino MR, Galleggiante V, Verna G, Liso Marina, Massaro M, Lan J, Troisi J, Bertamino A, Pinto A, Campiglia P, Santino A, Giannelli Gianluigi, Fasano A, Serino Grazia, Chieppa Marcello. Aquaporin 9 Contributes to the Maturation Process and Inflammatory Cytokine Secretion of Murine Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*. 2018; 9:2355.
6. Fassan M, Vianello L, Sacchi D, Fanelli GN, Munari G, Scarpa M, Cappellesso R, Loupakis F, Lanza C, Salmaso R, Mescoli C, Valeri N, Agostini M, D'Angelo E, Lonardi S, Pucciarelli S, Veronese Nicola, Luchini C, Rugge M. Assessment of intratumor immune-microenvironment in colorectal cancers with extranodal extension of nodal metastases. *Cancer Cell International*. 2018; 18 (1):131.
7. Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Tafaro Angela, Bianco Giusy, Gigante Isabella, Scavo Maria Principia, D'Alessandro Rosalba, Refolo Maria Grazia, Messa Caterina, Caruso Maria Gabriella, Notarnicola Maria. Cannabinoid Receptor-1 Up-regulation in Azoxymethane (AOM)-treated Mice After Dietary Treatment with Quercetin. *Anticancer Research*. 2018; 38 (8):4485-4491.
8. Akkiz H, Carr Brian I, Yalçın KK, Guerra Vito, Kuran S, Altıntaş E, Üsküdar O, Karaoğullarından Ü, Özakıyol A, Tokmak S, Yücesoy M, Bahçeci Hİ, Ülkü A, Akçam T, Yalçın PK, Ekinci N, Şimşek H, Örmeci N, Sonsuz A, Demir M, Kılıç M, Uygun A, Ballı T, Demir A, Arslan B, Doran F. Characteristics of Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness Factors in Turkish Patients. *Oncology*. 2018; 94 (2):116-124.
9. Cariola Filomena, Disciglio Vittoria, Valentini Anna M, Lotesoriere Claudio, Fasano Candida, Forte Giovanna, Russo Luciana, Di Carlo Antonio, Guglielmi Floranna, Manghisi A, Lolli Ivan, Caruso Maria L, Simone Cristiano. Characterization of a rare variant (c.2635-2A>G) of the MSH2 gene in a family with Lynch syndrome. *International Journal of Biological Markers*. 2018; pp. 1724600818766496.
10. Refolo Maria Grazia, Lippolis Catia, Carella Nicola, Cavallini Aldo, Messa Caterina, D'Alessandro Rosalba. Chlorogenic Acid Improves the Regorafenib Effects in Human Hepatocellular Carcinoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (5): 1518.

11. Cammà C, Leandro Gioacchino. Direct antiviral agents and risk of HCC: Waiting for Godot. *Journal of Hepatology*. 2018; :614-616.
12. Hammad S, Cavalcanti Elisabetta, Werle J, Caruso Maria Lucia, Dropmann A, Ignazzi Antonia, Ebert MP, Dooley S, Giannelli Gianluigi. Galunisertib modifies the liver fibrotic composition in the Abcb4Ko mouse model. *Archives of Toxicology*. 2018; 92 (7):2297-2309.
13. Rani B, Malfettone A, Dituri Francesco, Soukupova J, Lupo L, Mancarella Serena, Fabregat I, Giannelli Gianluigi. Galunisertib suppresses the staminal phenotype in hepatocellular carcinoma by modulating CD44 expression. *Cell Death and Disease*. 2018; 9 (3): 373.
14. Zizzari A, Bianco M, Del Mercato LL, Sorarù A, Carraro M, Pellegrino P, Perrone E, Monteduro Anna G, Bonchio M, Rinaldi R, Viola I, Arima V. Highly Sensitive Membrane-Based Pressure Sensors (MePS) for Real-Time Monitoring of Catalytic Reactions. *Analytical Chemistry*. 2018; 90 (12):7659-7665.
15. Zhang S, Wang J, Wang H, Fan L, Fan B, Zeng B, Tao J, Li X, Che L, Cigliano Antonio, Ribback S, Dombrowski F, Chen B, Cong W, Wei L, Calvisi D, Chen X. Hippo Cascade Controls Lineage Commitment of Liver Tumors in Mice and Humans. *American Journal of Pathology*. 2018; 188 (4): 995-1006.
16. Ranieri C, Di Tommaso S, Loconte DC, Grossi V, Sanese P, Bagnulo R, Susca FC, Forte Giovanna, Peserico A, De Luisi A, Bartuli A, Selicorni A, Melis D, Lerone M, Praticò, AD, Abbadessa G, Yu Y, Schwartz B, Ruggieri M, Simone Cristiano, Resta N. In vitro efficacy of ARQ 092, an allosteric AKT inhibitor, on primary fibroblast cells derived from patients with PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS). *Neurogenetics*. 2018; 19 (2):77-91.
17. Lucarelli G, Rutigliano M, Sallustio F, Ribatti D, Giglio A, Lepore Signorile M, Grossi V, Sanese Paola, Napoli A, Maiorano E, Bianchi C, Perego RA, Ferro M, Ranieri E, Serino Grazia, Bell LN, Ditunno P, Simone Cristiano, Battaglia M. Integrated multi-omics characterization reveals a distinctive metabolic signature and the role of NDUFA4L2 in promoting angiogenesis, chemoresistance, and mitochondrial dysfunction in clear cell renal cell carcinoma. *Aging* 2018; 10 (12): 3957-3985.
18. Rizzato S, Primiceri E, Monteduro Anna Grazia, Colombelli A, Leo A, Manera MG, Rella R, Maruccio G. Interaction-tailored organization of large-area colloidal assemblies. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. 2018; 9:1582-1593.
19. Osella Alberto R, Colaianni G, Correale Mario, Pesole Pasqua L, Bruno I, Buongiorno C, Deflorio V, Leone CM, Colucci SC, Grano M, Giannelli Gianluigi. Irisin Serum Levels in Metabolic Syndrome Patients Treated with Three Different Diets : A Post-Hoc Analysis from a Randomized Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2018; 10 (7):844.
20. Primiceri E, Chiriaco MS, Notarangelo FM, Crocama A, Ardissino D, Cereda M, Bramanti AP, Bianchessi MA, Giannelli Gianluigi, Maruccio G. Key Enabling Technologies for Point-of-Care Diagnostics. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2018; 18 (11): 3607.
21. Faillaci F, Marzi L, Critelli R, Milosa Fabiola, Schepis F, Turola Elena, Andreani S, Vandelli G, Bernabucci V, Lei B, D'Ambrosio F, Bristot L, Cavalletto L, Chemello L, Sighinolfi P, Manni P, Maiorana A, Caporali C, Bianchini M, Marsico M, Turco L, de Maria N, Del Buono M, Todesca P, di Lena Luca, Romagnoli D, Magistri P, di Benedetto F, Bruno S, Taliani G, Giannelli Gianluigi, Martinez-Chantar ML, Villa E. Liver Angiopoietin-2 Is a Key Predictor of De Novo or Recurrent Hepatocellular Cancer After Hepatitis C Virus Direct-Acting Antivirals. *Hepatology*. 2018; 68 (3):1010-1024.
22. Caraceni P, Riggio O, Angeli P, Alessandria C, Neri S, Foschi FG, Levantesi F, Airolidi A, Boccia S, Svegliati-Baroni G, Fagioli S, Romanelli RG, Cozzolongo Raffaele, Di Marco V, Sangiovanni V, Morisco F, Toniutto P, Tortora A, De Marco R, Angelico M, Cacciola I, Elia G, Federico A, Massironi S, Guarisco R, Galioto A, Ballardini G, Rendina M, Nardelli S, Piano S, Elia C, Prestianni L, Mirici Cappa F, Cesarini L, Simone L, Pasquale C, Cavallin M, Andrealli M, Fidone F, Ruggeri M, Roncadori M, Baldassarre M, Tufoni M, Zaccherini G, Bernardi M, for the ANSWER Study Investigators. Long-term albumin administration in

- decompensated cirrhosis (ANSWER) : an open-label randomised trial. *Lancet* (London, England). 2018; 391 (10138): 2417-2429.
23. Chaparro M, Verreth A, Lobaton T, Gravito-Soares E, Julsgaard M, Savarino E, Magro F, Biron IA, Lopez-Serrano P, Casanova MJ, Gompertz M, Vitor S, Arroyo M, Pugliese D, Zabana Y, Vicente R, Aguas M, Shitrit ABG, Gutierrez A, Doherty GA, Fernandez-Salazar L, Cadilla JM, Huguet JM, O'Toole A, Stasi Elisa, Marcos NM, Villoria A, Karmiris K, Rahier JF, Rodriguez C, Diz-Lois Palomares M, Fiorino G, Benitez JM, Principi M, Naftali T, Taxonera C, Mantzaris G, Sebkova L, Iade B, Lissner D, Bradley IF, Roman ALS, Marin-Jimenez I, Merino O, Sierra M, Van Domselaar M, Caprioli F, Guerra I, Peixe P, Piqueras M, Rodriguez-Lago I, Ber Y, van Hoeve K, Torres P, Gravito-Soares M, Rudbeck-Resdal D, Bartolo O, Peixoto A, Martin G, Armuzzi A, Garre A, Donday MG, Martín de Carpi FJ, Gisbert JP. Long-term safety of in utero exposure to anti-TNF α drugs for the treatment of inflammatory bowel disease: Results from the multicenter European TEDDY study. *American Journal of Gastroenterology*. 2018; 113 (3):396-403.
 24. Akkiz H, Carr Brian I, Kuran S, Karaoğullarından Ü, Üsküdar O, Tokmak S, Arslan B, Doran F, Balli HT, Ülkü A, Akçam TA, Bahçeci Hİ, Polat KY, Örmeci N, Şimşek H, Sonsuz A, Demir A, Altıntaş E, Demir M, Yalçın K, Ekinçi N, Harmancı ÖA, Yücesoy M, Uygun A, Guerra Vito, Delik A, Tokat Y, Yılmaz S, Bektaş A, Kılıç M. Macroscopic Portal Vein Thrombosis in HCC Patients. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2018; 2018:3120185.
 25. Veronese Nicola, Notarnicola Maria, Osella Alberto R, Cisternino Anna Maria, Reddavid Rosa, Inguaggiato Rosa, Guerra Vito, Rotolo Ornella, Zinzi I, Chiloiro M, Leandro Gioacchino, Correale Mario, Tutino Valeria, Misciagna G, Bonfiglio Caterina, Caruso Maria Gabriella. Menopause Does Not Affect Fatty Liver Severity In Women: A Population Study in a Mediterranean Area. *Endocrine, Metabolic and Immune Disorders - Drug Targets*. 2018; 18 (5):513-521.
 26. Sommella E, Basilicata MG, Tenore GC, Manfra M, Mastrocinque R, Ostacolo C, Vitale A, Chieppa Marcello, Campiglia P, Pepe G. Modification of lipid profile in commercial cow milk samples before and after their expiration date: Evaluation of storage crucial parameters and possible environmentally friendly disposal alternatives. *Journal of Food Quality*. 2018; 2018.
 27. Valentini Annamaria, Di Pinto Federica, Cariola Filomena, Guerra Vito, Giannelli Gianluigi, Caruso Maria Lucia, Pirrelli Michele. PD-L1 expression in colorectal cancer defines three subsets of tumor immune microenvironments. *Oncotarget*. 2018; 9 (9):8584-8596.
 28. Luchini C, Cros J, Pea A, Pilati C, Veronese Nicola, Rusev B, Capelli P, Mafficini A, Nottegar A, Brosens Lodewijk AA, Noë M, Offerhaus GJA, Chianchiano P, Riva G, Piccoli P, Parolini C, Malleo G, Lawlor RT, Corbo V, Sperandio N, Barbareschi M, Fassan M, Cheng L, Wood LD, Scarpa A. PD-1, PD-L1, and CD163 in pancreatic undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells : expression patterns and clinical implications. *Human Pathology*. 2018; 81:157-165.
 29. Carr Brian I, Giannelli Gianluigi, Guerra Vito, Giannini E, Farinati F, Rapaccini G, Marco M, Zoli M, Caturelli E, Masotto A, Virdone R, Sacco R, Trevisani F. Plasma cholesterol and lipoprotein levels in relation to tumor aggressiveness and survival in HCC patients. *International Journal of Biological Markers*. 2018; 33 (4): 423-431.
 30. Hanafy N, Abdelhamid N, Quarta A, Ferraro MM, Dini L, Nobile C, De Giorgi ML, Carallo S, Citti C, Gaballo A, Cannazza G, Rinaldi R, Giannelli Gianluigi, Leporatti S. Polymeric Nano-Micelles as Novel Cargo-Carriers for LY2157299 Liver Cancer Cells Delivery. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (3):748.
 31. Valentini Annamaria, Cavalcanti Elisabetta, Di Maggio M, Caruso Maria L. RAS-expanded Mutations and HER2 Expression in Metastatic Colorectal Cancer: A New Step of Precision Medicine. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*. 2018; 26 (8):539-544.

32. Vitale A, Farinati F, Noaro G, Burra P, Pawlik TM, Bucci L, Giannini EG, Faggiano C, Ciccicarese F, Rapaccini GL, Di Marco M, Caturelli E, Zoli M, Borzio F, Sacco R, Cabibbo G, Virdone R, Marra F, Felder M, Morisco F, Benvegnù L, Gasbarrini A, Svegliati-Baroni G, Foschi FG, Olivani A, Masotto A, Nardone G, Colecchia A, Fornari F, Marignani M, Vicari S, Bortolini E, Cozzolongo Raffaele, Grasso A, Aliberti C, Bernardi M, Frigo AC, Borzio M, Trevisani F, Cillo U, group, on behalf of the Italian Liver Cancer (ITA.LI.CA). Restaging Patients With Hepatocellular Carcinoma Before Additional Treatment Decisions: A Multicenter Cohort Study. *Hepatology*. 2018; 68 (4):1232-1244.
33. Caruso Maria L, Cavalcanti Elisabetta, De Michele Francesco, Ignazzi Antonia, Carullo R, Mastronardi Mauro. Small bowel capsule endoscopy revealing neuromuscular and vascular hamartoma of the jejunum : A case report. *Medicine*. 2018; 97 (15):e0196.
34. D'Alessandro Rosalba, Refolo Maria Grazia, Lippolis Catia, Carella Nicola, Messa Caterina, Cavallini Aldo, Carr Brian I. Strong enhancement by IGF1-R antagonists of hepatocellular carcinoma cell migration inhibition by Sorafenib and/or vitamin K1. *Cellular oncology (Dordrecht)*. 2018; 41 (3):283-296.
35. Caja L, Dituri Francesco, Mancarella Serena, Caballero-Diaz D, Moustakas A, Giannelli Gianluigi, Fabregat I. TGF- β and the Tissue Microenvironment: Relevance in Fibrosis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (5):1294.
36. Dituri Francesco, Mancarella Serena, Cigliano Antonio, Chieti Annarita, Giannelli Gianluigi. TGF- β as Multifaceted Orchestrator in HCC Progression: Signaling, EMT, Immune Microenvironment, and Novel Therapeutic Perspectives. *Seminars in Liver Disease*. 2018 ; pp. 1-17.
37. Tutino Valeria, Defrancesco ML, Tolomeo M, De Nunzio Valentina, Lorusso Dionigi, Paleni D, Caruso Maria Gabriella, Notarnicola Maria, Barile M. The expression of riboflavin transporters in human colorectal cancer. *Anticancer Research*. 2018; 38 (5):2659-2667.
38. Grossi V, Forte Giovanna, Sanese P, Peserico A, Tezil T, Lepore Signorile M, Fasano Candida, Lovaglio R, Bagnulo R, Loconte DC, Susca FC, Resta N, Simone Cristiano. The longevity SNP rs2802292 uncovered: HSF1 activates stress-dependent expression of FOXO3 through an intronic enhancer. *Nucleic Acids Research*. 2018; 46 (11):5587-5600.
39. Celestini V, Tezil T, Russo Luciana, Fasano Candida, Sanese P, Forte Giovanna, Peserico A, Lepore Signorile M, Longo G, De Rasmio D, Signorile A, Gadaleta RM, Scialpi N, Terao M, Garattini E, Cocco T, Villani G, Moschetta A, Grossi V, Simone Cristiano. Uncoupling FoxO3A mitochondrial and nuclear functions in cancer cells undergoing metabolic stress and chemotherapy. *Cell Death and Disease*. 2018; 9 (2):231.

Linea 2 – Medicina preventiva/predittiva in gastroenterologia

40. Lorusso Dionigi, De Santis S, Lantone Giulio, Armentano Raffaele. A rare case of incidental mucinous adenocarcinoma with osseous metaplasia associated with cysts of the presacral space. *The Turkish journal of gastroenterology: the official journal of Turkish Society of Gastroenterology* 2018; nov 20.
41. Russo Francesco, Chimienti G, Riezzo Giuseppe, Linsalata Michele, D'Attoma Benedetta, Clemente Caterina, Orlando Antonella. Adipose Tissue-Derived Biomarkers of Intestinal Barrier Functions for the Characterization of Diarrhoea-Predominant IBS. *Disease Markers*. 2018; 2018:1827937.
42. Soccio M, Laus MN, Alfarano M, Dalfino Giuseppe, Panunzio MF, Pastore D. Antioxidant/Oxidant Balance as a novel approach to evaluate the effect on serum of long-term intake of plant antioxidant-rich foods. *Journal of Functional Foods*. 2018; 40:778-784.

43. Latini G, De Felice C, Barducci A, Dipaola L, Gentile M, Andreassi MG, Correale Mario, Bianciardi G. Clinical biomarkers for cancer recognition and prevention: A novel approach with optical measurements. *Cancer Biomarkers*. 2018; 22 (2):179-198.
44. Ducheix S, Peres C, Härdfeldt J, Frau C, Mocciaro G, Piccinin E, Lobaccaro JM, De Santis S, Chieppa Marcello, Bertrand-Michel J, Plateroti M, Griffin JL, Sabbà C, Ntambi JM, Moschetta A. Deletion of Stearoyl-CoA Desaturase-1 From the Intestinal Epithelium Promotes Inflammation and Tumorigenesis, Reversed by Dietary Oleate. *Gastroenterology*. 2018; 155 (5): 1524-1538.e9.
45. Notarnicola Maria, Lorusso Dionigi, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, De Leonardis Giampiero, Marangelli Gisella, Guerra Vito, Veronese Nicola, Caruso Maria Gabriella, Giannelli Gianluigi. Differential Tissue Fatty Acids Profiling between Colorectal Cancer Patients with and without Synchronous Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (4):962.
46. Maselli Maria Antonietta, Ignazzi Antonia, Pezzolla Francesco, Scirocco Annunziata, Lorusso Dionigi, De Ponti F, Severi C. Gender-differences of in vitro colonic motility after chemo- and radiotherapy in humans. *BMC pharmacology & toxicology*. 2018; 19 (1): 49.
47. Caruso Maria Lucia, Cavalcanti Elisabetta, Ignazzi Antonia, Lantone Giulio, De Michele Francesco. Infliximab Has a Number of Well-Described Adverse Effects. Is Myeloid Metaplasia One of These in Elderly Long-standing IBD Patients? *Inflammatory Bowel Diseases*. 2018.
48. Veronese Nicola, Stubbs B, Koyanagi A, Vaona A, Demurtas J, Schofield P, Thompson T, Maggi S. Mitochondrial genetic haplogroups and incident obesity: a longitudinal cohort study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2018; 72 (4):587-592.
49. Principi M, Iannone A, Losurdo G, Mangia M, Shahini E, Albano F, Rizzi SF, La Fortezza RF, Lovero R, Contaldo A, Barone M, Leandro Gioacchino, Ierardi E, Di Leo A. Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Inflammatory Bowel Disease: Prevalence and Risk Factors. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2018; 24 (7):1589-1596.
50. Linsalata Michele, Riezzo Giuseppe, D'Attoma Benedetta, Clemente Caterina, Orlando Antonella, Russo, Francesco. Noninvasive biomarkers of gut barrier function identify two subtypes of patients suffering from diarrhea predominant-IBS: a case-control study. *BMC Gastroenterology*. 2018; 18 (1): 167.
51. Cavalcanti Elisabetta, Ignazzi Antonia, De Michele Francesco, Caruso Maria Lucia. PDGFR α expression as a novel therapeutic marker in well-differentiated neuroendocrine tumors. *Cancer Biology and Therapy*. 2018; :1-8.
52. Rosati G, Pinto C, Di Fabio F, Chiara S, Lolli Ivan R, Ruggeri EM, Ciuffreda L, Ferrara R, Antonuzzo L, Adua D, Racca P, Bilancia D, Benincasa E, Stroppolo ME, Di Costanzo F. Quality of life, compliance, safety and effectiveness in fit older metastatic colorectal patients with cancer treated in first-line with chemotherapy plus cetuximab: A retrospective analysis from the ObservEr study. *Journal of Geriatric Oncology*. 2018; 9 (3): 243-248.
53. Losurdo G, Castellaneta A, Rendina M, Carparelli S, Leandro Gioacchino, Di Leo A. Systematic review with meta-analysis: de novo non-alcoholic fatty liver disease in liver-transplanted patients. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2018; 47 (6):704-714.

Linea 3 – Medicina partecipativa in gastroenterologia

54. Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Caruso Maria Gabriella, Bonfiglio Caterina, Franco Isabella, Mirizzi Antonella, De Leonardis Giampiero, Cozzolongo Raffaele, Giannuzzi Vito, Giannelli Gianluigi, Notarnicola Maria, Osella Alberto R. Aerobic Physical Activity and a Low Glycemic Diet Reduce the AA/EPA Ratio in Red Blood Cell Membranes of Patients with NAFLD. *Nutrients*. 2018; 10 (9): 1299.

55. Veronese Nicola, Notarnicola Maria, Cisternino Annamaria, Reddavid Rosa, Inguaggiato Rosa, Guerra Vito, Rotolo Ornella, Zinzi I, Leandro Gioacchino, Correale Mario, Tutino Valeria, Misciagna G, Osella Alberto R, Bonfiglio Caterina, Giannelli Gianluigi, Caruso Maria G for MICOL Group. Coffee Intake and Liver Steatosis: A Population Study in a Mediterranean Area. *Nutrients*. 2018; 10 (1):1-9.
56. Firth J, Stubbs B, Teasdale SB, Ward PB, Veronese Nicola, Shivappa N, Hebert JR, Berk M, Yung AR, Sarris J. Diet as a hot topic in psychiatry: a population-scale study of nutritional intake and inflammatory potential in severe mental illness. *World Psychiatry*. 2018; 17 (3):365-367.
57. Veronese Nicola, Solmi M, Caruso Maria Gabriella, Giannelli Gianluigi, Osella Alberto R, Evangelou E, Maggi S, Fontana L, Stubbs B, Tzoulaki I. Dietary fiber and health outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2018; 107 (3):436-444.
58. Panza F, Lozupone M, Solfrizzi V, Sardone Rodolfo, Dibello V, Di Lena Luca, D'Urso F, Stallone R, Petruzzi M, Giannelli Gianluigi, Quaranta N, Bellomo A, Greco A, Daniele A, Seripa D, Logroscino G. Different Cognitive Frailty Models and Health- and Cognitive-related Outcomes in Older Age: From Epidemiology to Prevention. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*.2018; 62 (3):993-1012.
59. 2017 FISMAD Scientific Committee (Leandro Gioacchino). Gender equality in medicine: What do gastroenterologists from Italy think of it? *Digestive and Liver Disease*. 2018; 50 (7):725-727.
60. Cavallini Aldo, Minervini F, Garbetta A, Lippolis Catia, Scamarcio G, Di Franco C, D'Alessandro Rosalba. High degradation and no bioavailability of artichoke miRNAs assessed using an in vitro digestion/Caco-2 cell model. *Nutrition Research*. 2018; 60 :68-76.
61. AIGO (Leandro Gioacchino). IBS clinical management in Italy: The AIGO survey. *Digestive and Liver Disease*. 2018; :1-8.
62. Chimienti G, Picca A, Sirago G, Fracasso F, Calvani R, Bernabei R, Russo Francesco, Carter Christy S, Leeuwenburgh C, Pesce V, Marzetti E, Lezza A, Maria S. Increased TFAM binding to mtDNA damage hot spots is associated with mtDNA loss in aged rat heart. *Free Radical Biology and Medicine*. 2018; 124: 447-453.
63. Veronese Nicola, Demurtas J, Celotto S, Caruso Maria Gabriella, Maggi S, Bolzetta Francesco, Firth J, Smith L, Schofield P, Koyanagi A, Yang L, Solmi M, Stubbs B. Is chocolate consumption associated with health outcomes? An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *Clinical Nutrition*. 2018; 18:30204-8.
64. Orlando Antonella, Linsalata Michele, Bianco Giusy, Notarnicola Maria, D'Attoma Benedetta, Scavo Maria Principia, Tafaro Angela, Russo Francesco. *Lactobacillus rhamnosus* GG Protects the Epithelial Barrier of Wistar Rats from the Pepsin-Trypsin-Digested Gliadin (PTG)-Induced Enteropathy. *Nutrients*. 2018; 10 (11): 1698-
65. Bolzetta F, Stubbs B, Noale M, Vaona A, Demurtas J, Celotto S, Cester A, Maggi S, Koyanagi A, Cereda E, Veronese Nicola. Low-dose vitamin D supplementation and incident frailty in older people: An eight year longitudinal study. *Experimental Gerontology*. 2018; 101:1-6.
66. Picca A, Riezzo Giuseppe, Lezza A, Clemente Caterina, Pesce V, Orlando Antonella, Chimienti G, Russo Francesco. Mitochondria and redox balance in coeliac disease: A case-control study. *European Journal of Clinical Investigation*. 2018; 48 (2):1-8.
67. Scirocco Annunziata, Pallotta L, Rengo M, Ignazzi Antonia, Carabotti M, Cicenia A, Vona R, Chirletti P, Maselli Maria Antonietta, Donghia R, Coluzzi M, Matarrese P, Silecchia G, Severi C. Myogenic oxidative imbalance interferes with antral motility in obese subjects. *Digestive and Liver Disease*. 2018; 50 (8):820-827.
68. Iannone A, Giorgio F, Russo Francesco, Riezzo Giuseppe, Girardi B, Pricci M, Palmer SC, Barone M, Principi M, Strippoli G, Di Leo A, Ierardi E. New fecal test for non-invasive

- Helicobacter pylori detection: A diagnostic accuracy study. *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 24 (27):3021-3029.
69. Solfrizzi V, Agosti P, Lozupone M, Custodero C, Schilardi A, Valiani V, Sardone Rodolfo, Dibello V, Di Lena Luca, Lamanna A, Stallone R, Bellomo A, Greco A, Daniele A, Seripa D, Sabbà C, Logroscino G, Panza F. Nutritional Intervention as a Preventive Approach for Cognitive-Related Outcomes in Cognitively Healthy Older Adults: A Systematic Review. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*. 2018; 64 (s1): S229-S254.
 70. Osella Alberto R, Veronese Nicola, Notarnicola Maria, Cisternino Annamaria, Misciagna G, Guerra Vito, Nitti A, Campanella A, Caruso Maria G for MICOL/NUTRIHEP Group. Potato Consumption is not Associated with Higher Risk of Mortality: A Longitudinal Study among Southern Italian Older Adults. *Journal of Nutrition, Health and Aging*. 2018; 22 (6):726-730.
 71. Losurdo G, Cubisino R, Barone M, Principi M, Leandro Gioacchino, Ierardi E, Di Leo A. Probiotic monotherapy and Helicobacter pylori eradication: A systematic review with pooled-data analysis. *World Journal of Gastroenterology*. 2018; 24 (1):139-149.
 72. Riezzo Giuseppe, Orlando Antonella, D'attoma Benedetta, Linsalata Michele, Martulli Manuela, Russo Francesco. Randomised double blind placebo controlled trial on Lactobacillus reuteri DSM 17938 improvement in symptoms and bowel habit in functional constipation. *Beneficial Microbes*. 2018; 9 (1):51-60.
 73. Procino Filippo, Misciagna G, Veronese Nicola, Caruso Maria L, Chiloiro M, Cisternino Annamaria, Notarnicola Maria, Bonfiglio Caterina, Bruno I, Buongiorno C, Campanella A, for MICOL Group. Reducing NAFLD-screening time: A comparative study of eight diagnostic methods offering an alternative to ultrasound scans. *Liver International*. 2019; 39 (1):187-196.
 74. Shivappa N, Hébert JR, Veronese Nicola, Caruso Maria Gabriella, Notarnicola Maria, Maggi S, Stubbs B, Firth J, Fornaro M, Solmi M. The relationship between the dietary inflammatory index (DII®) and incident depressive symptoms: A longitudinal cohort study. *Journal of Affective Disorders*. 2018; 235:39-44.
 75. Zagari RM, Romiti A, Ierardi E, Gravina AG, Panarese Alba, Grande G, Savarino E, Maconi G, Stasi Elisa, Eusebi LH, Farinati F, Conigliaro R, Bazzoli F, Romano M. The "three-in-one" formulation of bismuth quadruple therapy for Helicobacter pylori eradication with or without probiotics supplementation: Efficacy and safety in daily clinical practice. *Helicobacter*. 2018; 23 (4):e12502.

05 APR. 2019

Il Direttore Scientifico

(Prof. Gianluigi Giannelli)

