



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

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



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

Direzione Scientifica



RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA CORRENTE DELL'ANNO 2020

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 nell’anno 2020 sono i seguenti:

Progetto 03/2018: “Classificazione molecolare e immunofenotipica dei carcinomi gastrici: correlazione con HER2 e PD-L1”

Responsabile: dott AM Valentini

Partecipanti: Dott. G Arborea, Dott. R Armentano, Dott ML Caruso, Dott S Coletta, Dott. F Di Pinto, Dott. R Donghia, Dott V Guerra, Dott. N Schena

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

Il carcinoma gastrico (CG) è una patologia eterogenea sia a livello intratumorale che intertumorale. Comprendere le basi molecolari di questa eterogeneità è importante a livello diagnostico, prognostico e terapeutico.

La prima classificazione molecolare del CG è stata messa a punto nel 2014 dal “The Cancer Genome Atlas” (TCGA) e prevede la classificazione dei carcinomi gastrici in 4 sottotipi: EBV (con infezione da Epstein Barr Virus), MSI (con instabilità dei microsatelliti), CIN (con instabilità cromosomica), GS (genomicamente stabili). Le metodiche molecolari impiegate per definire la classificazione TCGA però, non sono disponibili presso tutti i laboratori di anatomia patologica per cui successivamente sono state messe a punto delle classificazioni immunofenotipiche che utilizzano metodiche come l’immunohistochimica (IHC) e l’ibridazione in situ cromogenica (CISH), per la rilevazione di marcatori proteici in sostituzione dei molecolari.

L’obiettivo del primo anno del progetto è stato quello di valutare la densità dei TILs nel microambiente tumorale ed effettuare una classificazione dei carcinomi nei 4 Tumor Microenvironment Immune Types (TMITs), correlando questi ultimi con i fattori istopatologici.

Allo scopo si è proceduto alla determinazione immunohistochimica di PD-L1 e del CD8. evidenziando la possibilità di utilizzare l’espressione di questi marcatori per predire la risposta all’immunoterapia, utilizzando un metodo semplice, a basso costo e disponibile presso tutti i laboratori di anatomia patologica, quale l’IHC.

I risultati ottenuti dallo studio sono stati oggetto di un lavoro scientifico pubblicato sulla rivista *Oncology Letters*:

Valentini AM, Di Pinto F, Coletta S, Guerra V, Armentano R, Caruso ML. ***Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status.*** *Oncology Letters*. 2019;18(2):1775-1785. doi: 10.3892/ol.2019.10513.

L’obiettivo del secondo anno di progetto è stato quello di caratterizzare i carcinomi gastrici dal punto di vista immunofenotipico, mediante la determinazione dello status di EBV, MLH1, p53, HER2, E-Caderina, PD-L1, e correlare i marcatori con i fattori istopatologici quali sede, tipo istologico, infiltrazione nella parete (pT) e interessamento linfonodale (pN).

La casistica è stata ampliata fino a comprendere 70 campioni istologici e su di essa si è proceduto alla determinazione dell’espressione di EBV, MLH1, p53, HER2, E-Caderina, PD-L1, al fine di realizzare una classificazione immunofenotipica dei carcinomi gastrici. I dati della letteratura riguardanti le classificazioni immunofenotipiche presentano alcune criticità riguardo la valutazione dei marker utilizzati, soprattutto per quanto riguarda p53 ed E-Caderina. Gli studi finora effettuati sono stati condotti su biopsie o su Tissue MicroArray (TMA) che hanno il limite di non permettere una adeguata valutazione dell’eterogeneità della espressione dei marcatori tissutali.

A nostra conoscenza questo è il primo studio che effettua una classificazione immunofenotipica dei CG esclusivamente su pezzi chirurgici.

Campioni di carcinomi gastrici fissati in formalina e inclusi in paraffina, provenienti da 70 pazienti (46 maschi e 24 femmine) sottoposti a resezione chirurgica presso il nostro istituto tra il 2014 e il 2017 sono stati arruolati in questo studio. Le caratteristiche clinicopatologiche dei pazienti sono riassunte in tabella I.

Si è proceduto alla determinazione dell’infezione da EBV tramite CISH per EBV-encoded RNA (EBER) utilizzando il kit RNAScope (Advanced Cell Diagnostics, CA, USA). I campioni che mostravano una forte positività nei nuclei delle cellule tumorali sono stati considerati come EBV-positivi.

È stata successivamente determinata l'espressione immunohistochimica degli altri marcatori: PD-L1 (clone E1L3N, Cell Signaling Technology, MA, USA), MLH1 (MAb ES05, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:50) p53 (MAb DO7, Menarini diagnostics, Italy, diluizione 1:500), E-Caderina (MAb NCH-38, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:100) e HER2 (Polyclonal antibody, Agilent Technologies, CA, USA, diluizione 1:600). L'espressione di membrana di PD-L1 è stata valutata sulle cellule tumorali utilizzando un cut-off >5%.

Tumori con completa perdita di espressione di MLH1 nei nuclei delle cellule tumorali sono stati definiti come tumori con deficit del sistema del mismatch repair (MMR-D).

L'espressione immunohistochimica di p53 è stata valutata nei nuclei delle cellule tumorali e solo i casi con una intensa positività in più del 70% delle cellule tumorali sono stati classificati come casi con overespressione di p53.

Per quanto riguarda la E-Caderina, casi con completa perdita di reattività di membrana delle cellule tumorali o solo debole reattività citoplasmatica sono stati considerati come E-Caderina aberranti, mentre casi con un pattern di colorazione di membrana o misto citoplasma/membrana, sono stati considerati come E-Caderina normali (Figura 1).

Per la valutazione dello status del gene HER2, sono stati utilizzati i criteri di Hofmann. Si è proceduto dapprima alla determinazione di HER2 mediante metodica immunohistochimica e soltanto i casi con score 2+ sono stati sottoposti a CISH con kit Zytovision per valutare l'eventuale amplificazione genica. I carcinomi gastrici con score immunohistochimico 3+ e 2+/con amplificazione genica sono stati considerati come HER2 positivi.

Sulla base dei risultati ottenuti da CISH e IIC, i 70 campioni sono stati raggruppati nelle seguenti 5 categorie: "EBV", 2 casi (2.9%); "MLH1 deficient", 5 casi (7.2%); "p53 overexpressed and/or HER2 +", 43 casi (61.4%); "aberrant E-Cadherin", 8 casi (11.4%); "Normal pattern", 12 casi (17.1%), negativi per tutti i marcatori analizzati.

I casi EBV positivi, che hanno mostrato una intensa colorazione nucleare in più del 90% delle cellule tumorali, sono risultati essere del tipo istologico diffuso ($p < 0.05$) e positivi al PD-L1 ($p < 0.05$). Anche i casi con perdita di MLH1 hanno mostrato positività al PD-L1 ($p < 0.05$) (Tabella II). I campioni appartenenti al gruppo "p53 overexpressed and/or HER2 +" sono risultati per il 46.5% diffusi e per il 53.5% intestinali (Tabella II). Il gruppo con E-Caderina aberrante era costituito da casi esclusivamente di tipo diffuso ($p < 0.05$), T3-T4 ($p < 0.05$) e con pN status positivo ($p < 0.05$) (Tabella II). Il gruppo "Normal pattern" comprendeva 5 carcinomi gastrici diffusi e 7 intestinali, tutti negativi al PD-L1 (Tabella II).

I carcinomi gastrici diffusi hanno mostrato più profili immunofenotipici rispetto agli intestinali, che mancano della categoria EBV ed E-Caderina aberrante.

Lo studio ha messo in evidenza che per quanto riguarda i gruppi "EBV" e "MLH1 Deficient", la CISH e l'IIC sono in grado di riflettere in maniera affidabile lo status molecolare. Infatti, i casi che mostravano perdita di MLH1 sono stati testati con Idylla MSI test (Biocartis) e hanno mostrato tutti instabilità dei microsatelliti.

Nel gruppo "p53 overexpressed and/or HER2 +" è stata riscontrata un'elevata percentuale di carcinomi gastrici diffusi rispetto allo studio TGCA in cui la maggior parte dei CIN è costituita da carcinomi gastrici di tipo intestinale. Il dato ottenuto dallo studio potrebbe riflettere la non completa corrispondenza tra dato molecolare e immunohistochimico. P53, "Guardiano del Genoma" è il gene più frequentemente mutato nei tumori. La valutazione immunohistochimica di p53 è cambiata nel corso degli anni, perché sempre più studi hanno correlato le mutazioni del gene con l'espressione immunohistochimica della proteina. Infatti, in passato un cut-off del 5-10% di positività era considerato espressione indiretta della mutazione del gene. Più recentemente gli studi in letteratura sono concordi nell'affermare che l'espressione immunohistochimica di p53 in più del 70% dei nuclei delle cellule tumorali riflette una mutazione a carico del gene e che percentuali di positività tra il 20-50% riflettono un gene wild-type. Non c'è invece accordo tra gli autori su come debba essere considerata una colorazione immunohistochimica completamente negativa. Infatti, per alcuni corrisponde a un gene wild-type, mentre per altri a mutazioni nonsense o delezioni che sono responsabili della completa perdita di espressione della proteina.

Per quanto riguarda la E-Caderina, lo studio TGCA ha riscontrato un'elevata percentuale di mutazioni del gene CDH1 (codificante per la E-Caderina) nel gruppo dei CG genomicamente stabili. È stato dimostrato che non sempre lo status del gene CDH1 è correlato con l'espressione immunohistochimica della proteina, ma che l'espressione immunohistochimica della proteina è presente nella maggior parte dei CG di tipo diffuso. I risultati dello studio hanno dimostrato che al gruppo "Aberrant E-Cadherin" appartenevano tutti i CG con una istologia di tipo diffuso ($p < 0.05$) (Tabella II). Nella indagine immunohistochimica della E-Caderina l'osservazione di un pattern di colorazione solo di membrana (normale), completamente negativo o completamente citoplasmatico (aberrante), non presenta dubbi di valutazione. Al contrario in presenza di un pattern eterogeneo (membrana e citoplasma) non risulta chiaro se la proteina abbia perso o meno la sua funzione. Infatti, in alcuni studi il pattern di colorazione eterogeneo è valutato come normale mentre in altri aberrante.

Si può affermare che l'utilizzo di campioni chirurgici non ha migliorato la valutazione dei marcatori immunofenotipici anzi ha permesso maggiormente di evidenziarne i limiti.

"EBV" e "MLH1 deficient" sono classi ben definite di carcinomi gastrici, esclusive per alcuni campioni, e facilmente riconoscibili con CISH e IIC. Inoltre, la positività al PD-L1 rende questi pazienti eleggibili all'immunoterapia.

Diversamente, per marcatori come la E-Caderina o p53, l'immunohistochimica non è in grado di definire correttamente delle classi comparabili a quelle degli studi molecolari.

In conclusione, la classificazione immunofenotipica andrebbe quindi rivista allo scopo di individuare dei marcatori che possano meglio identificare le categorie dei CIN e GS e che possano essere bersagli terapeutici al pari di PD-L1 e HER2.

I risultati di questa seconda ed ultima fase del progetto sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni scientifiche:

- 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.
- 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.
- Increased nerve twigs in small intestinal mucosa with programmed cell death-ligand 1 and somatostatin receptor type 2A expression in recurrent Crohn disease A case report. Caruso Maria Lucia, Di Pinto Federica, Ignazzi Antonia, Coletta Sergio, Valentini Annamaria, Cavalcanti Elisabetta, De Michele Francesco. *MEDICINE* 2019
- Tumor microenvironment immune types in gastric cancer are associated with mismatch repair however, not HER2 status. Valentini Annamaria, Di Pinto Federica, Coletta Sergio, Guerra Vito, Armentano Raffaele, Caruso Maria Lucia. *Oncology Letters* 2019
- The role of miRNA-133b and its target gene SIRT1 in FAP-derived desmoid tumor. MT Rotelli, MG Refolo, C Lippolis, A Cavallini, A Picciariello, D Piscitelli and DF Altomare. *Oncotarget*. 2020
- Are Immunohistochemical Markers Useful in Phenotypic Gastric Cancer Classification? Di Pinto F, Armentano R, Arborea G, Schena N, Donghia R, Valentini AM. *Oncology*. 2020 Apr 21:1-9. doi: 10.1159/000506077

Progetto 05/2018: “Valutazione espressione tissutale di SMYD3”

Responsabile: dott. Cristiano Simone

Partecipanti: Dott.ssa Candida Fasano, Dott.ssa Giovanna Forte

Background

Le neoplasie dell'apparato gastrointestinale 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. Infatti, la maggior parte dei CCR sono adenocarcinomi e derivano dalla trasformazione di un polipo adenomatoso attraverso la sequenza adenoma-carcinoma innescata da numerose alterazioni genetiche ed epigenetiche. Talune alterazioni genetiche, quando ereditate e presenti in tutte le cellule dell'organismo, predispongono all'insorgenza dei CCR 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.

L'epigenetica è definita come lo studio dei cambiamenti ereditabili dell'espressione genica non causati da variazioni della sequenza primaria di DNA. 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. 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 (CCR), del polmone e del carcinoma epatocellulare (HCC).

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. 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. 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. 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. Pertanto, in questo scenario, una migliore comprensione del ruolo di SMYD3 nella tumorigenesi del tratto gastroenterico, potrebbe essere un vantaggio per futuri interventi farmacologici.

Obiettivo dello studio

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

Materiali e metodi

La valutazione della frequenza di espressione di SMYD3 in linee di CCR con fenotipi CIN, MIN, FAP è stata analizzata mediante RT-PCR (RNA) e saggi di immunoblotting per valutare i livelli della proteina SMYD3 nei lisati totali di cellule di CCR con fenotipi CIN, MIN, FAP.

La valutazione degli effetti del co-targeting di SMYD3 e di pathway implicati nello sviluppo del CCR (PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK) è stata effettuata mediante saggi di immunoblotting in cui sono stati analizzati i livelli di fosfoattivazione di ERK, AKT, MK2 e delle proteine clivate CASP3 e PARP-1 (marcatori apoptotici) in cellule di CCR sottoposte a trattamenti combinati con BCI-121 e gli inibitori delle vie di segnalazione PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK.

Gli effetti dei trattamenti di inibizione combinata di SMYD3 e delle pathways PI3K-AKT e p38-MAPK-MAPK sono stati valutati attraverso saggi di vitalità e mortalità cellulare. La mortalità cellulare è stata valutata al tempo zero, 24, 48 e infine alle 72 ore mediante conta cellulare con il colorante trypan blue. Come inibitori per i trattamenti singoli e/o combinati delle cellule di CCR sono stati utilizzati: BCI-121 (100µM) inibitore di SMYD3, LY294002 (20 µM) inibitore del pathway di PI3K-AKT e SB202190 (10 µM) inibitore di p38-MAPK. Tutti i risultati presentati sono rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Infine, gli effetti dei trattamenti combinati con inibitori di SMYD3 e chemioterapici sono stati valutati su cellule HCT116 pre-trattate per 48 ore con BCI-121 e/o EPZ01686, sono state trattate con etoposide (20µM) o NCS (1nM) per 24 ore e successivamente analizzate per immunofluorescenza a 0 e 24 ore. La vitalità cellulare dopo i trattamenti di inibizione combinata di SMYD3 e chemioterapici è stata valutata attraverso il WST-1 di linee HT29 e HCT116 trattate con i chemioterapici indicati per 24 o 72 ore +/- inibitori.

Risultati stato di avanzamento per la terza annualità di progetto

In questo progetto abbiamo indagato l'effetto derivante dall'inibizione combinata di SMYD3 e di due diversi pathway fortemente implicati nello sviluppo del cancro del colon-retto (CCR), quello della cascata PI3K-AKT e quello delle MAPK nello specifico p38-MAPK-MAPK. Per verificare questa ipotesi abbiamo utilizzato 5 linee cellulari di CCR che esprimessero elevati livelli di SMYD3 e differissero tra loro per background genetico e tipo instabilità (tabella 1).

Successivamente, abbiamo valutato l'efficienza degli inibitori del pathway di PI3K-AKT (LY294002, 20µM) e di SMYD3 (BCI-121, 100 µM), tramite analisi di western blot. Gli effetti di tale inibizione si ripercuotono anche sul pathway di RAS-MEK-ERK (Figura 3). In seguito, si è proceduto alla valutazione della proliferazione tramite il saggio del WST-1. Le cellule sottoposte ad inibizione singola o combinata delle due pathway (LY294002 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore) mostravano una riduzione della capacità di crescita in maniera tempo dipendente in tutte le linee cellulari di CCR utilizzate. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT) dia luogo ad una maggiore riduzione della capacità di crescita cellulare rispetto ai singoli trattamenti (Figura 4). Per avere una visione più completa dell'azione di questi due inibitori (LY294002 e BCI-121) si è proceduto alla valutazione della mortalità tramite conta cellulare in trypan blue. A seguito di inibizione singola e/o combinata delle due pathway (LY294002 e/o BCI-121 per 24-48-72 ore) abbiamo osservato un aumento del numero di cellule morte in maniera tempo dipendente in tutte le linee cellulari di CCR testate. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e PI3K-AKT) dia luogo ad un incremento della morte cellulare rispetto alla singola inibizione, la quale provoca più un arresto della proliferazione (Figura 5). Nel complesso tutti i risultati ottenuti nella prima parte della task 3 dimostrano che il co-targeting del pathway di RAS-MEK-ERK e di quello di PI3K-AKT, ottenuto utilizzando gli inibitori BCI-121 e LY294002, può essere considerata una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da cancro del colon-retto. Allo stesso modo abbiamo valutato l'effetto del co-targeting del pathway di RAS-MEK-ERK assieme al pathway delle MAPK, procedendo all'inibizione di p38-MAPK. Gli inibitori utilizzati sono stati: BCI-121 (100 µM) come inibitore di SMYD3, agendo in tal modo sul pathway di RAS-MEK-ERK, e SB202190 (10 µM) classico inibitore di p38α-MAPK.

Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) dia luogo ad una maggiore riduzione della capacità di crescita cellulare rispetto ai trattamenti singoli (Figura 8). Questi due inibitori (SB202190 e BCI-121) favoriscono un aumento della mortalità cellulare in maniera tempo dipendente in tutte le linee cellulari di CCR utilizzate. Inoltre, è possibile affermare come l'inibizione combinata dei due pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) dia luogo ad un incremento della morte cellulare rispetto alla singola inibizione, la quale provoca più un arresto della capacità di crescita (Figura 9).

Non essendo possibile distinguere il tipo di morte cellulare indotta dall'inibizione dei pathway (RAS-MEK-ERK e p38-MAPK) attraverso la colorazione per esclusione, abbiamo proceduto al western blot verificando il clivaggio della caspasi 3 e quello di PARP-1. I risultati suggeriscono che l'inibizione combinata, ottenuta attraverso la somministrazione di SB202190 e di BCI-121, promuove l'apoptosi (Figura 10). Nel complesso tutti i risultati ottenuti dimostrano che il co-targeting dei pathways di RAS-MEK-ERK e di p38-MAPK, ottenuto utilizzando rispettivamente gli inibitori BCI-121 e SB202190, può essere considerata una valida opzione terapeutica per i pazienti affetti da cancro del colon-retto.

In questo periodo, dopo la ripresa delle attività sperimentali in istituto (a seguito di lockdown per pandemia COVID-19), sono proseguiti i nostri studi volti all'identificazione di strategici co-targeting di pathways sinergici del CCR, con una prima valutazione dell'impiego di inibitori di SMYD3 in combinazione con agenti chemioterapici in uso nella clinica per il trattamento del CCR.

In tale direzione, nuovi spunti di indagine sono stati offerti da un nostro recente studio attualmente pubblicato sulla rivista *iScience* del gruppo editoriale *Cell Press*. In questo lavoro abbiamo chiarito un nuovo ruolo funzionale di SMYD3 nel meccanismo di ricombinazione omologa in risposta alla rottura del doppio filamento di DNA. I nostri risultati dimostrano che la fosforilazione di SMYD3 mediata da ATM consente la formazione di un complesso multiproteico formato da ATM, SMYD3, CHK2 e BRCA2, necessario per il reclutamento di RAD51 sui siti di rottura del doppio filamento di DNA e per il completamento del processo di ricombinazione omologa.

Questa scoperta ci ha indotto ad investigare la possibilità che un pre-trattamento con inibitori di SMYD3 su cellule di CCR potesse interferire con i meccanismi di riparazione del DNA nelle cellule tumorali e quindi potenziare l'effetto genotossico di agenti chemioterapici in uso clinico per il trattamento del CCR.

A tal fine abbiamo analizzato per immunofluorescenza l'efficienza di riparazione del DNA in cellule HCT116 pre-trattate con inibitori di SMYD3 (BCI-121 e EPZ031686) per 48 ore e successivamente sottoposte a trattamento con etoposide (VP-16) per 24 ore. La stessa analisi è stata effettuata in cellule trattate con la neocarzinostatina (NCS), un agente in grado di danneggiare il DNA mediante una rottura del doppio filamento. I livelli di danno del DNA sono stati valutati effettuando una conta del numero di foci di danno per cellula, osservabili mediante immunocolorazione della proteina 53BP1. I nostri dati oltre a confermare il ruolo fondamentale di SMYD3 nella riparazione del DNA, suggeriscono che l'inibizione di SMYD3 possa provocare un incremento del danno residuo del DNA in cellule di CCR sottoposte al trattamento con i chemioterapici, come osservato con etoposide (Figura 11a). A tal fine, abbiamo valutato gli effetti sulla mortalità cellulare del trattamento combinato di chemioterapici (doxorubicina, 5-fluorouracile, cisplatino ed etoposide) e BCI-121 nelle linee cellulari HT29 e HCT116 che esprimono elevati livelli di SMYD3 (Figura 11b).

Ad oggi, sono in corso esperimenti volti a valutare la vitalità cellulare a seguito di trattamenti combinati con inibitori di SMYD3 e inibitori farmacologici di altri attori implicati: nei diversi meccanismi di riparo oltre quello di ricombinazione omologa, in modo da agire su tutte le possibili vie di segnalazione che la cellula tumorale adotta per sopravvivere ai danni causati dalle terapie convenzionali.

Tabelle e figure

| Linea cellulare | Genotipo | | | | | | | | | MIN |
|-----------------|----------|------|------|-----|--------|------|------|-------|--------|-----|
| | APC | KRAS | BRAF | P53 | CTNNB1 | EGFR | PTEN | SMAD4 | PIK3CA | |
| HCT116 | wt | mut | wt | wt | wt | wt | wt | wt | mut | MSI |
| HT29 | mut | wt | mut | mut | wt | wt | wt | wt | mut | MSS |
| LOVO | mut | mut | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | MSI |
| Caco-2 | mut | wt | wt | mut | mut | wt | wt | wt | wt | MSS |
| SW480 | mut | mut | wt | wt | wt | wt | wt | wt | wt | MSS |

TABELLA 1: Analisi mutazionale delle linee cellulari di CCR.

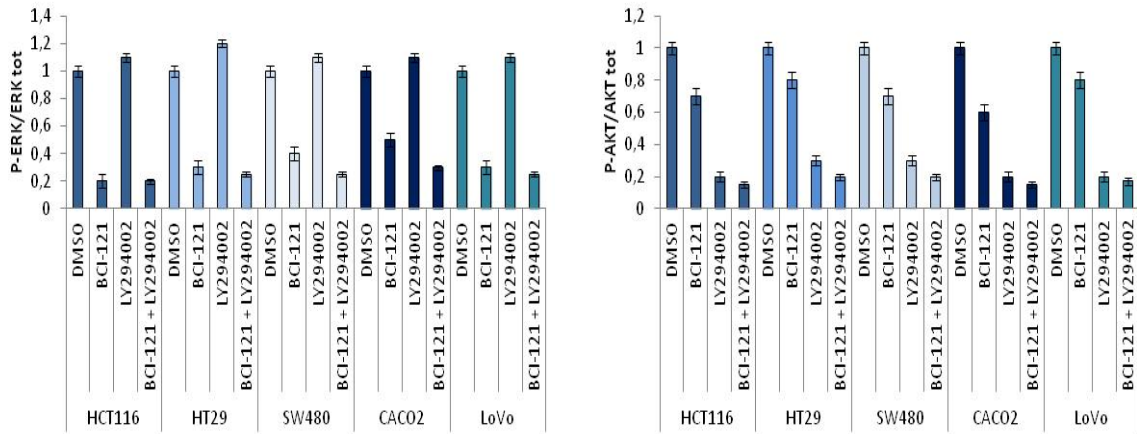


FIGURA 3: Analisi densitometriche dei livelli di p-ERK/ERK tot e p-AKT/AKT tot.

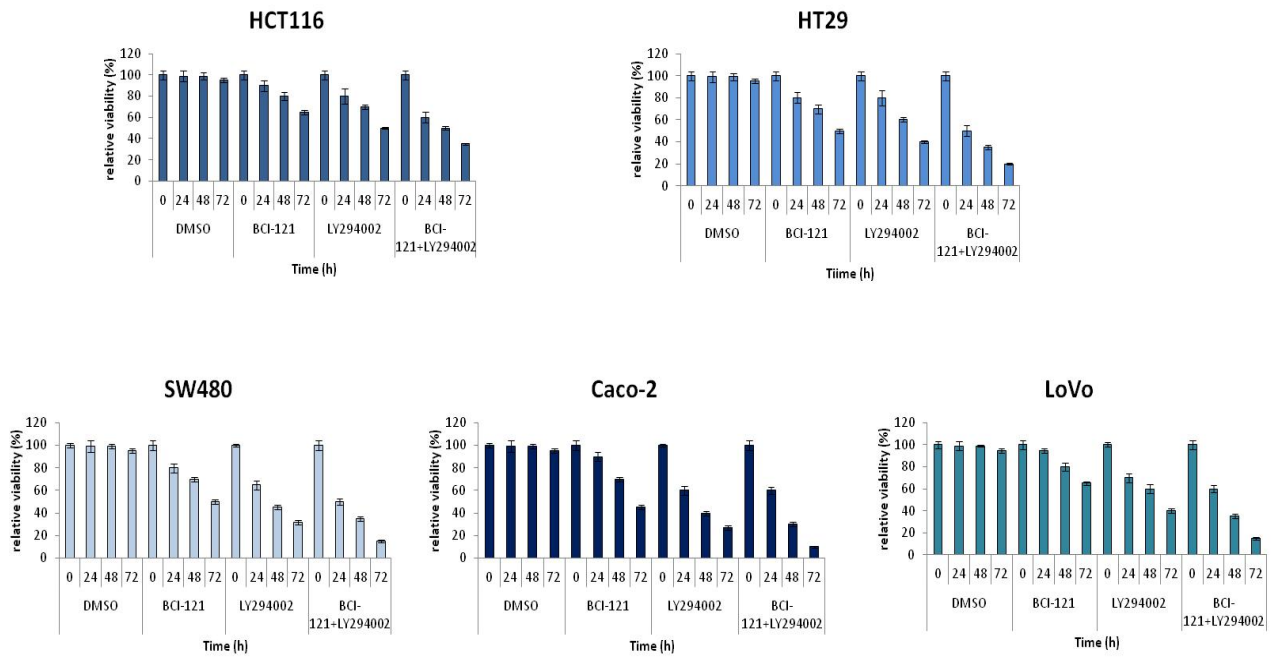


FIGURA 4: Saggio di vitalità cellulare (WST-1) in cellule di CCR trattate con BCI-121 (100µM) e/o con LY294002 (20 µM).

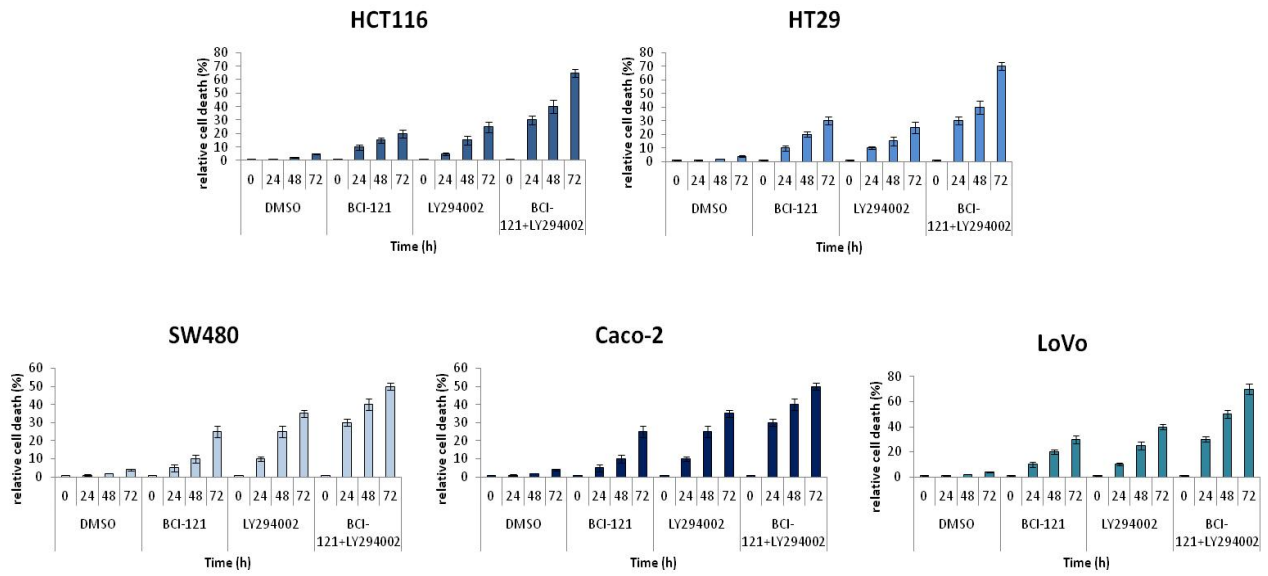


FIGURA 5: Conta cellulare con il colorante trypan blue in cellule di CCR trattate con BCI-121 (100 μ M) e/o con LY294002 (20 μ M).

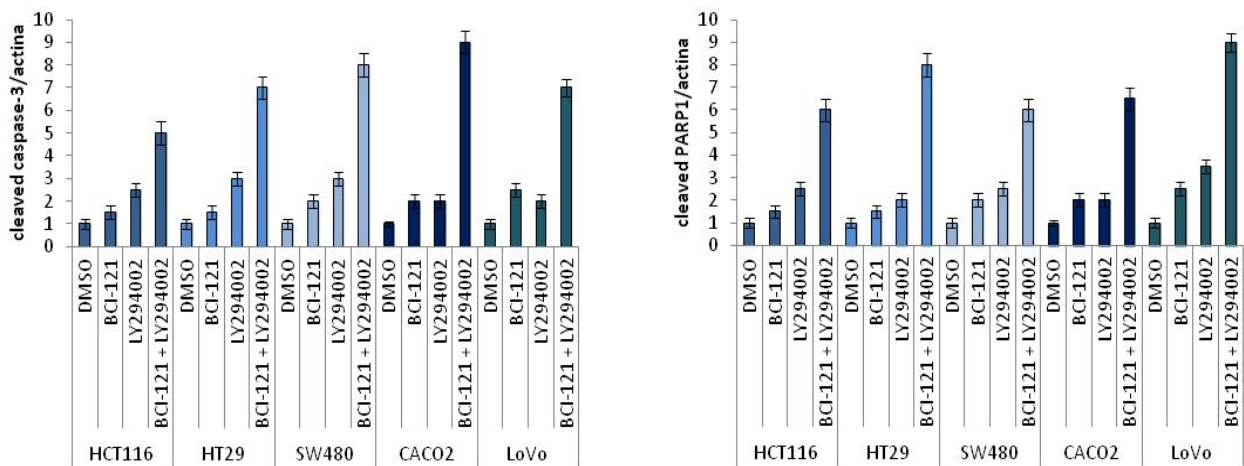


FIGURA 6: Analisi dei livelli di apoptosi rilevati dal clivaggio della caspasi 3 e di PARP-1.

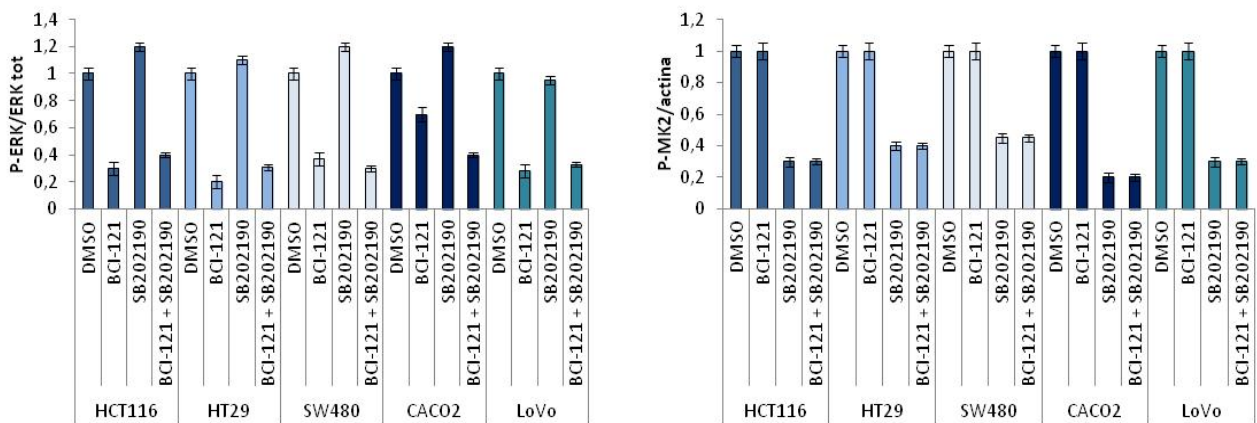


FIGURA7: Analisi densitometriche dei livelli di p-ERK/ERK tot e p-MK2/actina.

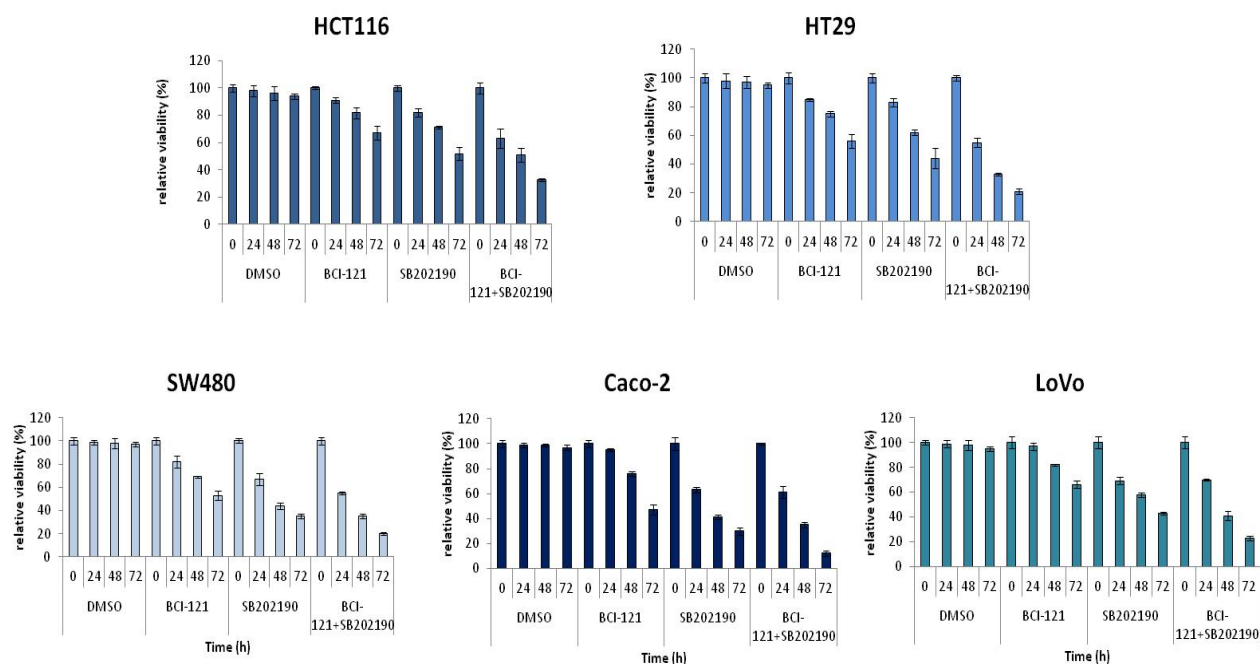


FIGURA 8: Saggio di vitalità cellulare (WST-1) in cellule di CCR trattate con BCI-121 (100 μ M) e/o SB202190 (10 μ M) (inibitore di p38-MAPK)

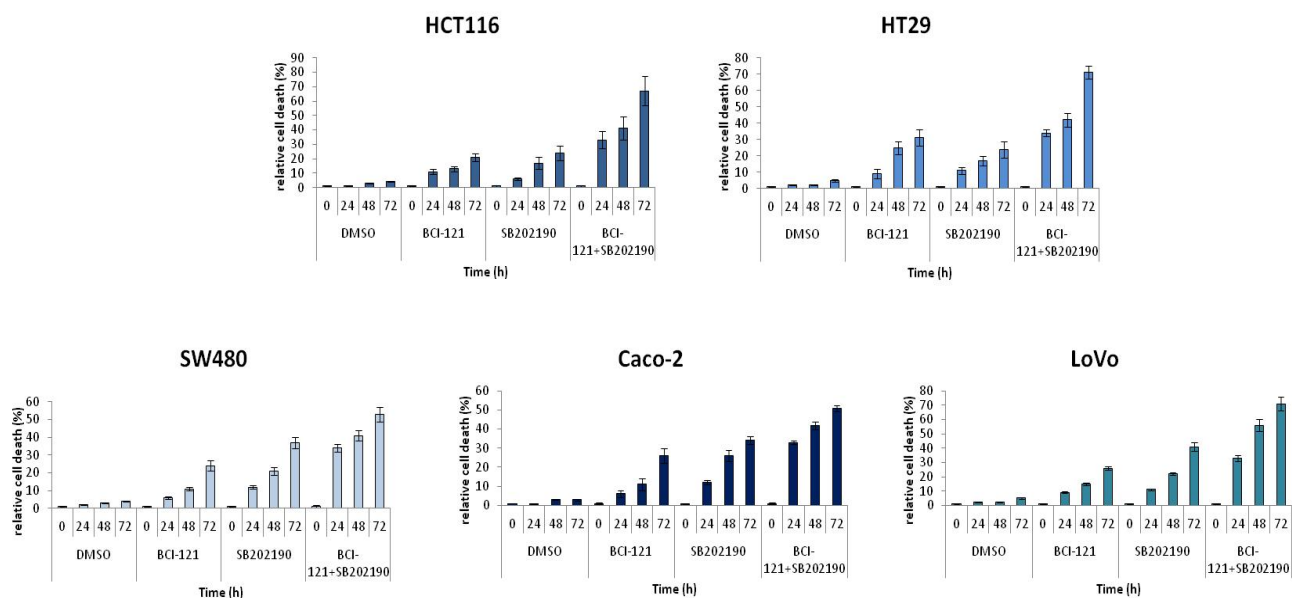


FIGURA 9: Conta cellulare con il colorante trypan blue in cellule di CCR trattate con BCI-121 (100 μ M) e/o con SB202190 (10 μ M).

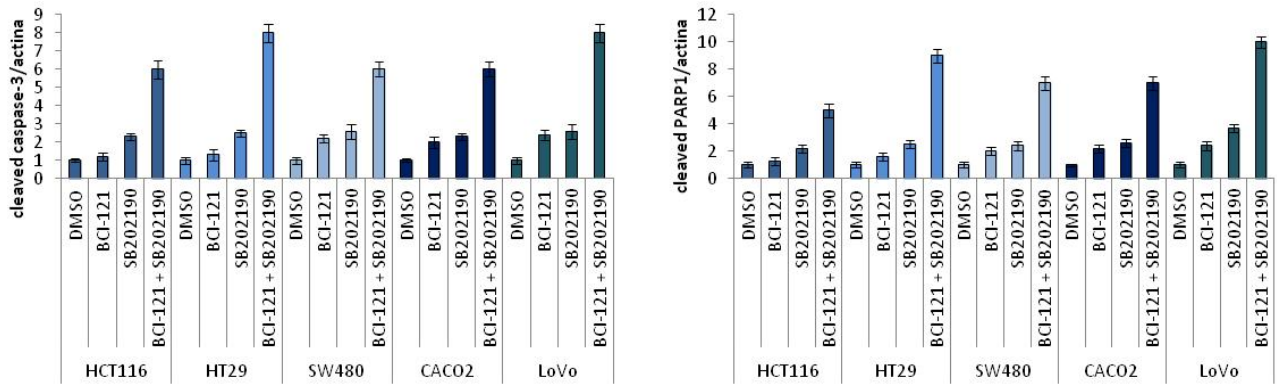
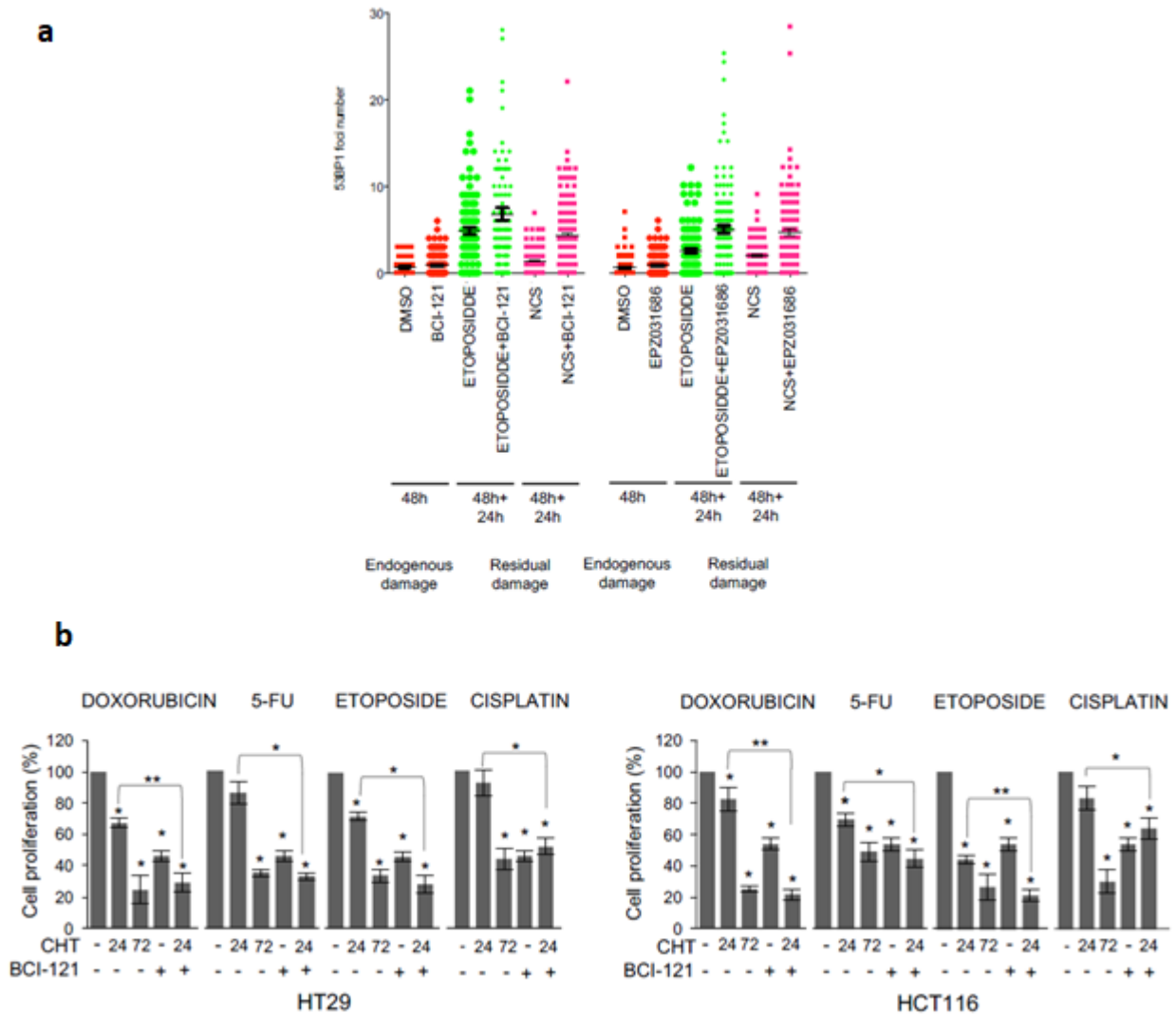


FIGURA 10: Analisi di immunoblotting dei marcatori apoptotici di cellule di CCR sottoposte ad inibizione combinata (BCI-121 e SB202190).



(a) Cellule HCT116 pre-trattate per 48 ore con BCI-121 (100 μ M) o EPZ031686 (1 μ M), sono state trattate con Etoposide (20 μ M) o NCS (1nM) per 24 ore e dopo fissate per l'analisi di immunofluorescenza a 0 e 24 ore.
 (b) Saggio WST-1 delle linee HT29 e HCT116 trattate con i chemioterapici indicati per 24 o 72 ore, paragonate a cellule pretrattate con BCI-121 per 48 ore e dopo trattate con gli stessi chemioterapici per 24 ore, per un totale di 72 ore.

Pubblicazioni:

- SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. Cinzia Bottino, Alessia Peserico, Cristiano Simone, Giuseppina Caretti. *Cancers*.
- Targeting SMYD3 to sensitize homologous recombination-proficient tumors to PARP-mediated synthetic lethality. Simone. *iScience*.

Progetto 07/2018: 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, Dott.ssa Maria Grazia Refolo, Sig. Gianpiero De Leonardis

Background

Nonostante i progressi conseguiti nel trattamento del cancro gastrico, il tumore dello stomaco rappresenta ancora la terza causa di morte per cancro in tutto il mondo. I pazienti spesso perdono l'opportunità di una terapia risolutiva chirurgica, in quanto nella maggior parte dei casi il tumore è già in uno stadio avanzato alla diagnosi. Rispetto alla migliore terapia di supporto, la chemioterapia può migliorare la qualità della vita e prolungare il tempo di sopravvivenza. Negli ultimi anni, studi biomolecolari sul cancro gastrico hanno permesso di introdurre nell'uso clinico nuovi farmaci ad azione mirata. Esempio ne è il Trastuzumab, anticorpo anti recettore del fattore di crescita epidermico umano (HER2), che in prima linea, in associazione a fluoropirimidine e derivati del platino può migliorare significativamente la sopravvivenza nei pazienti con carcinoma gastrico avanzato con HER2 amplificato. Accanto all'amplificazione di HER2, l'attivazione dell'angiogenesi è un ulteriore fattore in grado di indurre sviluppo e progressione di malattia nel carcinoma gastrico. In tale contesto, il recettore-2 del fattore di crescita vascolo-endoteliale (VEGFR-2), secreto dalle cellule tumorali gastriche o dalle cellule stromali intra-tumorali appare mediatore chiave dell'angiogenesi. Il Ramucirumab è un anticorpo monoclonale umanizzato che blocca in modo specifico il VEGFR-2 ed è attualmente l'unico farmaco antiangiogenico approvato per il carcinoma gastrico avanzato in progressione di malattia dopo una prima linea con derivati del platino e fluoropirimidine, sia in monoterapia (studio REGARD) che in associazione con il taxano Paclitaxel (studio RAINBOW).

Obiettivo dello studio

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

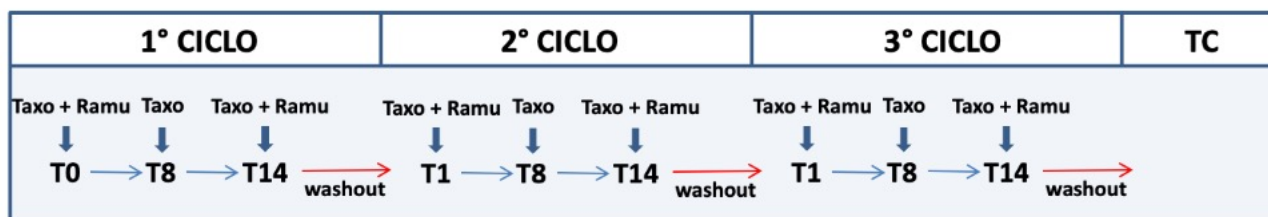
B. analizzare l'espressione *in situ* dei recettori VEGFR1/2/3, del VEGFA, della TUBBIII, di HER2 e di PDGFR nelle cellule tumorali da biopsie gastriche. Inoltre, nei pazienti arruolati nello studio sarà valutata la percentuale di vasi tumorali positivi per VEGFR2 al fine di stabilire il valore prognostico di tale marcatore.

Materiali e Metodi

Allo stato attuale sono stati reclutati 31 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, da 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.

Risultati

Nelle prime indagini sierologiche effettuate su 40 campioni in doppio derivanti da 13 pazienti, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono stati analizzati i seguenti analiti: 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 mostravano 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.

Stato di avanzamento

È in corso una seconda analisi sui sieri di 18 pazienti afferenti all' U.O. di Oncologia del nostro Istituto nel corso degli anni 2018/2019. La disponibilità di reperti biotipici consente di effettuare un'analisi di espressione *in situ* dei principali fattori bersaglio dell'azione del Ramucirumab, quali i recettori VEGFR1/2/3, HER2 e PDGFR nonché i fattori VEGFA, la TUBBIII nelle cellule e nei vasi tumorali. Tale analisi verrà condotta in collaborazione con l'Unità di Anatomia Patologica del nostro istituto.

Pubblicazioni:

- Inflammatory Mechanisms of HCC Development. MG Refolo, C Messa, V Guerra, BI Carr, R D'Alessandro. Cancers.
- Molecular mechanisms of synergistic action of Ramucirumab and Paclitaxel in gastric cancer cell lines. Messa et al. Scientific Reports.

Progetto 09/2019: “NUOVI BERSAGLI TERAPEUTICI NELLA TERAPIA PERSONALIZZATA NEL CANCRO DEL COLON RETTO (CCR): MANIPOLAZIONE FARMACOLOGICA DELL’ASSE MAPK-FoxO3A E MEDICINA MITOCONDRIALE”

Responsabile: dott. Cristiano Simone

Partecipanti: Dott.ssa Martina Lepore Signorile

Background

L'esistenza di vie di segnalazione cancro-specifiche e di deregolazioni molecolari uniche da paziente a paziente sottolinea l'importanza strategica della caratterizzazione genomica per sviluppare terapie personalizzate più efficienti. Un recente studio ha mostrato un'interessante caratterizzazione delle alterazioni somatiche in CCR. Oltre alle attese mutazioni in APC, TP53, SMAD4, PIK3CA e KRAS, sono state trovate aberrazioni genomiche significative in IGF2, IGFR, ERBB2, ERBB3, MEK, AKT, MTOR e SRC e queste convergono tutte sul fattore di trascrizione FoxO3A, suggerendo che diverse proteine coinvolte nelle più critiche vie di segnalazione correlate al cancro, come le vie RTK-RAS e PI3K, possano essere oggetto dell'inibizione. La regolazione dell'attività di FoxO3A in risposta a stimoli extracellulari gioca un ruolo fondamentale nell'omeostasi cellulare, essendo un fattore di trascrizione cruciale nel meccanismo molecolare che guida le cellule verso la sopravvivenza o la morte. Infatti, FoxO3A è controllato da una vasta gamma di stimoli esterni, che non solo regolano la sua attività trascrizionale, ma ne influenzano anche la sua localizzazione subcellulare. Questi meccanismi di regolazione sono mediati da vie di segnalazione correlate alla cancerogenesi, che alla fine determinano modifiche post-traduzionali (PTM) di FoxO3A (come ad esempio la fosforilazione). I nostri recenti risultati hanno dimostrato che FoxO3A si localizza nei mitocondri di cellule tumorali e tessuti non tumorali sottoposti a stress metabolico e a chemioterapici (CHT). Abbiamo identificato due residui di serina di FoxO3A, la S12 e la S30 (entrambi fosforilate in cellule tumorali umane). In risposta allo stress metabolico, queste serine sono fosforilate rispettivamente dalla MAP chinasi ERK nella via di MEK/ERK e dalla chinasi AMPK. Questo doppio segnale fosforilativo su FoxO3A comporta la traslocazione di questa proteina nei mitocondri, dove si lega al DNA mitocondriale formando un complesso con TFAM, mtRNAPOL e SIRT3. La formazione di tale complesso permette l'espressione del genoma mitocondriale soprattutto di quei geni responsabili del metabolismo ossidativo del mitocondrio. L'effetto finale della traslocazione mitocondriale di FoxO3A è quello di sostenere la funzionalità ossidativa mitocondriale nelle cellule tumorali metabolicamente stressate e/o trattate con CHT. La correlazione tra le vie a cascata di MEK/ERK e di AMPK (che convergono in specifiche fosforilazioni del dominio N-terminale di FoxO3A) rappresenta solo il primo capitolo del “codice mitocondriale” di FoxO3A, suggerendo l'ipotesi che le cellule cancerose siano altamente suscettibili all'inibizione della fosforilazione ossidativa, e che gli inibitori della traduzione mitocondriale possano agire come sensibilizzanti per le (chemio)terapie anticancro. Il piano sperimentale previsto in questo progetto mira a caratterizzare i meccanismi coinvolti nella chemio-resistenza mediati dalla forma mitocondriale di FoxO3A (mtFoxO3A) impiegando cellule di CCR mutate stabilmente per il gene FoxO3A. Tali cellule sono generate attraverso trasfezioni stabili di costrutti mutanti e deleti di FoxO3A in cellule KO per il gene FoxO3A. Ripristinando stabilmente la funzione di FoxO3A in cellule di CCR FoxO3A KO andremo a manipolare la localizzazione di FoxO3A, mediante la modulazione di vie di segnalazione correlate al cancro. Questo meccanismo potrebbe rivelarsi molto promettente per contrastare la resistenza della cellula tumorale alla chemioterapia tradizionale.

Obiettivo dello studio

Caratterizzazione del meccanismo di chemio-resistenza mediato da mtFoxO3A in cellule di CCR mutate stabilmente e trattate con farmaci a bersaglio molecolare e agenti antineoplastici.

Materiali e metodi

Il ruolo di mtFoxO3A in risposta a terapie multi-farmaco è stata analizzata in cellule HCT116 FoxO3A -/- e in cellule trasfettate stabilmente con un pattern di costrutti mutanti e trattate con chemioterapici come irinotecano (CPT-11) ed etoposide (VP-16).

Le linee cellulari trasfettate stabilmente sono state ottenute mediante trasfezione delle linee cellulari di CCR HCT116-FoxO3A -/- con costrutti che esprimono il gene per la resistenza all'antibiotico geneticina (G-418) e i geni di nostro interesse (empty, FoxO3A wt, FoxO3A-S12A, FoxO3A-d242-271). Dopo 48-72h dalla trasfezione, le cellule trasfettate sono state selezionate utilizzando una concentrazione ottimale di G-418 (500 µg/ml) preventivamente ricavata mediante una curva dose/risposta (curva Killer). La tossicità cellulare dell'antibiotico G-418 è stata valutata ogni 24 ore mediante osservazione al microscopio ottico. In seguito, le cellule sono state mantenute in coltura per circa 9 giorni sostituendo il terreno implementato con l'antibiotico due volte a settimana. Dopo nove giorni dalla trasfezione iniziale le cellule sopravvissute sono state piastrate a una densità di 10 cellule /ml al fine di selezionare singoli cloni mutati stabilmente. Al fine di verificare l'avvenuta trasfezione dei costrutti desiderati, abbiamo sequenziato i cloni cellulari selezionati per accertarci che ogni clone

esprimesse stabilmente i costrutti trasfettati inizialmente, ovvero il plasmide empty e i costrutti FoxO3Awt, FoxO3A-S12A/S30A e FoxO3A-d242-271.

Successivamente, le cellule sono state valutate per vitalità, morte cellulare. Dopo i trattamenti, la vitalità cellulare è stata valutata indirettamente monitorando l'apoptosi attraverso i seguenti test: MTT/proliferazione, IB (FoxO3A N-terminale, fosfo-ERK, e PARP clivato, BIM) e IF (TMRE- potenziale di membrana mitocondriale e MitotrackerRed), Q-PCR e IB analisi dei geni codificati a livello mitocondriale (ND6, COX1).

Risultati / stato di avanzamento per la seconda annualità di progetto

In questa fase di progetto, come previsto da programmazione iniziale, abbiamo analizzato il ruolo funzionale della forma mitocondriale di FoxO3A (mtFoxO3A) nei meccanismi di chemio-resistenza in cellule di CCR trasfettate stabilmente e sottoposte a stimoli metabolici e a trattamenti con agenti antineoplastici e/o con farmaci biologici a bersaglio molecolare. In particolare, abbiamo caratterizzato dal punto di vista molecolare il ruolo mitocondriale di FoxO3A in risposta a stress metabolico indotto da deprivazione di glucosio (LG) e a stress genotossico indotto da chemioterapici ad azione antineoplastica (CPT-11, VP-16).

Per queste indagini funzionali *in cellulo* abbiamo impiegato come modello di studio le cellule di CCR HCT116 FoxO3A knockout generate mediante il sistema di genome editing CRISPR/CAS9 (HCT116-FoxO3A *-/-*) trasfettate stabilmente con il plasmide vuoto (plasmide empty) e con i costrutti di FoxO3A wt, di FoxO3A-S12A/S30A (sostituzione concomitante di entrambe le serine per abrogare completamente la localizzazione mitocondriale FoxO3A), e con il costrutto FoxO3A-d242-271 (costrutto deleto privo della sequenza di localizzazione nucleare, NLS).

In seguito, abbiamo valutato la localizzazione subcellulare di FoxO3A in queste cellule trasfettate stabilmente mediante l'analisi per Immunoblot di estratti mitocondriali sottoposti a purificazione con proteinasi K. Confermando i nostri studi preliminari, l'analisi densitometrica dei blot relativi ad estratti mitocondriali di cellule stabili per l'espressione di FoxO3A-S12A/S30A, ha rivelato l'assenza di localizzazione mitocondriale confermando che S12 e S30 sono entrambe responsabili per la traslocazione mitocondriale di FoxO3A in cellule di cancro sottoposte a stress metabolico (Fig.3a). Il trattamento con la proteinasi K ha permesso di stabilire la precisa localizzazione di FoxO3A nella matrice mitocondriale di cellule FoxO3A wt e/o FoxO3A-d242-271 che conservano l'estremità N-terminale, target dei processi di import mitocondriale (MPP, MIP). Le linee che esprimono stabilmente FoxO3A wt e FoxO3A-d242-271 mostrano la proteina ricombinante FoxO3A sulla membrana esterna e localizzano all'interno del mitocondrio nella sua forma clivata (Fig.3a). Quest'analisi conferma che la concomitante sostituzione delle serine 12 e 30 in alanina va ad abrogare i segnali di fosforilazione mediati da ERK (sulla serina 12) e da AMPK (sulla serina 30) che sono risultati fondamentali per la localizzazione mitocondriale di FoxO3A [7] (Fig.3a).

In tutte le nostre linee trasfettate stabilmente, abbiamo quindi valutato la localizzazione subcellulare di FoxO3A e i suoi effetti sulla vitalità/morte cellulare in risposta a stress metabolico indotto da deprivazione di glucosio (LG). Questa vasta caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili è stata eseguita mediante immunoblot sulla frazione mitocondriale, analisi dell'espressione di geni mitocondriali per QPCR, immunofluorescenza (Fig.3b-f).

I saggi di vitalità/morte cellulare dei mutanti stabili sottoposti a stress metabolico confermano un incremento della sopravvivenza cellulare in quelle cellule in cui era stata ricostituita stabilmente l'espressione di FoxO3A wt. Da notare che a differenza del mutante stabile S12A/S30A, il mutante FoxO3A-d242-271 era ancora in grado di proteggere le cellule da morte cellulare dopo stress metabolico (Fig.3b,c).

Questi risultati hanno sottolineato l'importanza cruciale dei segnali fosforilativi sulle serine 12 (target di ERK) e 30 (target di AMPK) di FoxO3A (Fig.3d) nella resistenza delle cellule tumorali allo stress metabolico.

Inoltre, mediante analisi dell'espressione genica QPCR dei mutanti abbiamo osservato che solo wt e d242-271 presentavano un incremento dell'attività trascrizionale di geni target mitocondriali come ND6 e COX1; mentre nel mutante S12A/S30A viene attivata la trascrizione nucleare di BIM, gene pro-apoptotico (Fig.3e).

La caratterizzazione per immunofluorescenza delle linee trasfettate stabilmente ha evidenziato che, come mostrato dal grafico riportato in figura 3f la forma clivata di FoxO3A è necessaria per mantenere il potenziale di membrana nei mitocondri funzionalmente attivi delle cellule cancerose (colorazione con TMRE per visualizzare lo status di polarizzazione delle membrane). Infatti, la colorazione con TMRE non avviene nelle cellule mutanti S12A/S30A (Fig. 3f).

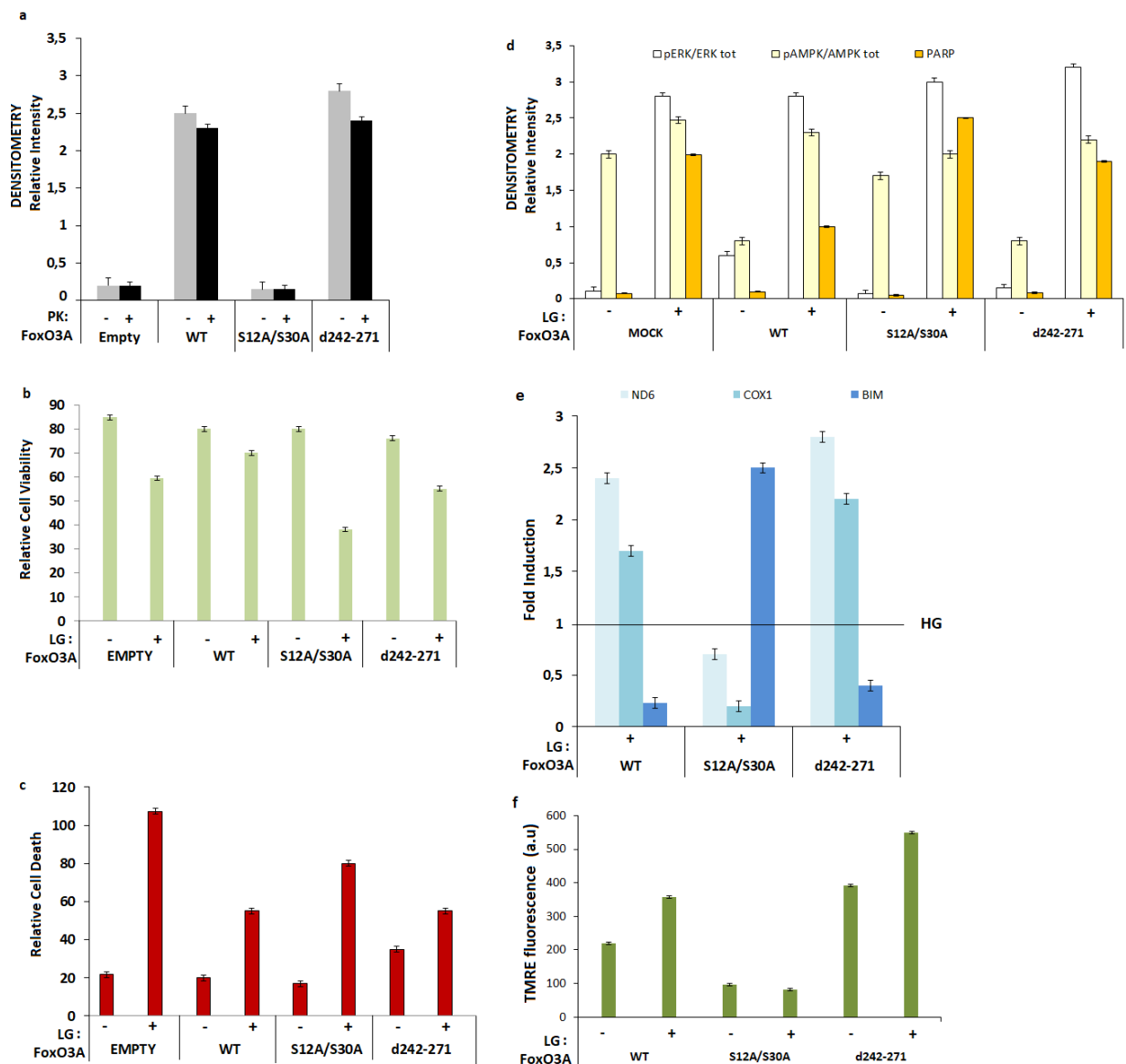


Figura 3: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress metabolico (LG). **a.** Analisi densitometriche dell'immunoblot in cellule HCT116 $-/-$ trasfettate stabilmente con i plasmidi indicati e sottoposte al trattamento con proteinasi K. **b,c.** saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress metabolico (LG); **d.** analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot) e poi calcolati sulle rispettive actine; **e.** analisi dei livelli di espressione genica di BIM e dei geni target mitocondriali mediante QPCR dopo induzione di stress metabolico; **f.** analisi per immunofluorescenza dei livelli di TMRE in in cellule HCT116 $-/-$ trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress metabolico.

Successivamente, al fine di investigare il ruolo di FoxO3A nel mitocondrio nei meccanismi di chemio-resistenza abbiamo valutato nelle cellule trasfettate stabilmente gli effetti della risposta a stress genotossico indotto con irinotecano (CPT-11). I saggi di vitalità e morte cellulare hanno evidenziato un incremento della sopravvivenza cellulare nelle linee cellulari che esprimevano stabilmente FoxO3A wt (Fig. 4a), mentre il doppio mutante stabile S12A/S30A non era in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi indotta da CHT (Fig. 4a) come dimostrato dall'incremento dell'espressione di BIM e dall'aumento dei livelli di PARP, ovvero due attori cruciali della risposta apoptotica (Fig 4b,c). Da notare che i mutanti stabili FoxO3A-wt e d242-271 in cui è stata ripristinata la funzionalità di mtFoxO3A mostrano un incremento dell'espressione dei geni target mitocondriali ND6 e COX1 (Fig. 4c) confermando ulteriormente l'ipotesi che mtFoxO3A svolga un ruolo fondamentale nella chemio-resistenza, favorendo l'incremento del metabolismo ossidativo mitocondriale e quindi la sopravvivenza di cellule trattate con chemioterapici.

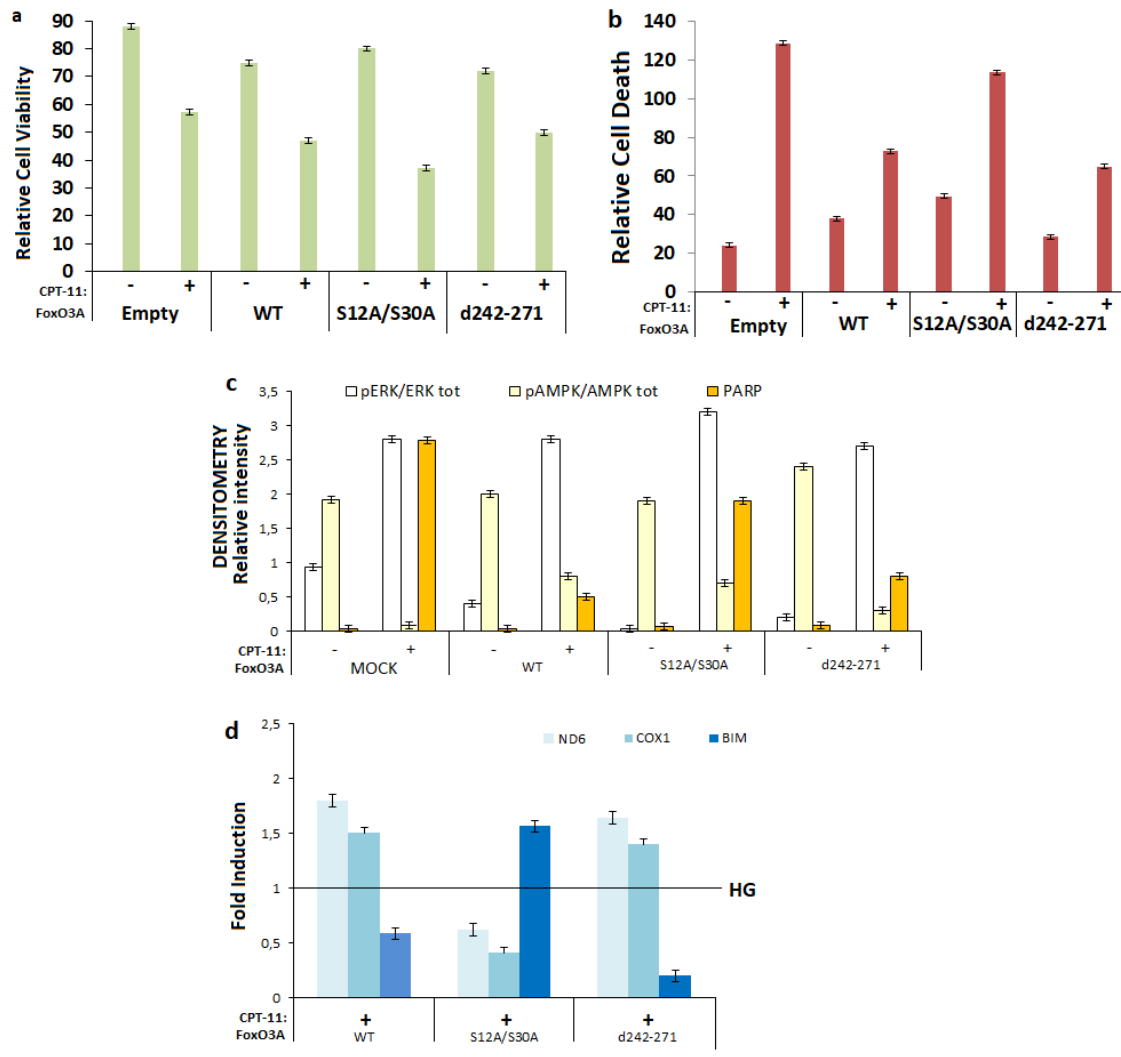


Figura 4: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress genotossico indotto da CPT-11 **a,b**, saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress genotossico indotto da CPT-11; **c**, analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot); **d**, analisi dei livelli di espressione di BIM e dei geni target mitocondriali mediante QPCR. In questi ultimi mesi sono proseguiti i nostri studi sul ruolo mitocondriale di FoxO3A nei meccanismi di chemio-resistenza. Nelle cellule trasfettate stabilmente abbiamo valutato gli effetti della risposta a stress genotossico indotto con un altro chemioterapico, l'etoposide (VP-16). Anche in questo caso come per i trattamenti con CPT-11, i saggi di vitalità e morte cellulare hanno evidenziato un incremento della sopravvivenza cellulare nelle cellule che esprimevano stabilmente FoxO3A wt (Fig.5a,b), mentre il doppio mutante stabile S12A/S30A non era in grado di proteggere la cellula dall'apoptosi indotta da CHT (Fig. 5a,b) come dimostrato dall'incremento dell'espressione di BIM e dall'aumento dei livelli di PARP, ovvero due attori cruciali della risposta apoptotica (Fig 5c,d). Da notare che i mutanti stabili FoxO3A-wt e d242-271 in cui è stata ripristinata la funzionalità di mtFoxO3A mostrano un incremento dell'espressione dei geni target mitocondriali ND6 e COX1 (Fig. 5c,d). I dati ottenuti a seguito del trattamento con VP-16 confermano ulteriormente l'ipotesi che mtFoxO3A svolga un ruolo fondamentale nella chemio-resistenza, favorendo l'incremento dell'espressione dei geni mitocondriali coinvolti nel metabolismo fosfo-ossidativo e nella catena respiratoria e quindi promuovendo la sopravvivenza di cellule trattate con chemioterapici.

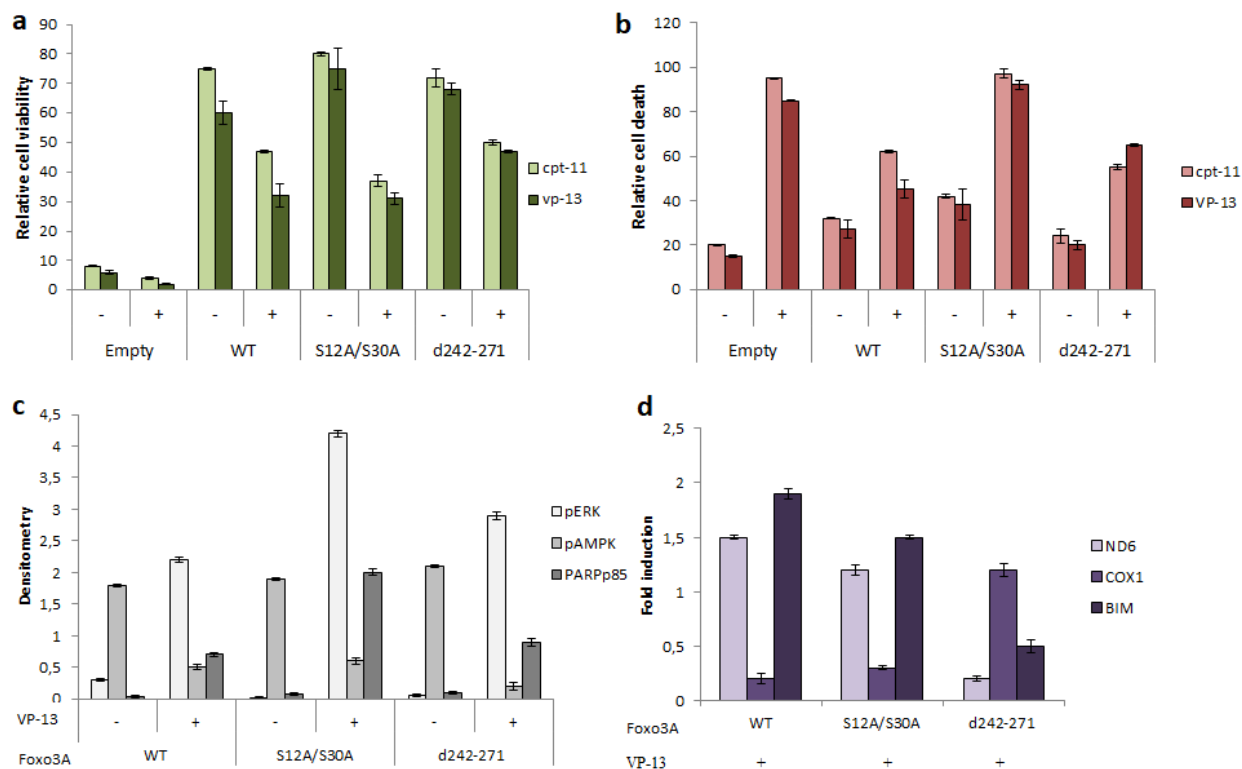


Figura 5: Caratterizzazione funzionale dei mutanti stabili di FoxO3A (empty, wt, S12A/S30A, d242-271) in risposta a stress genotossico indotto da VP-16 **a,b**, saggi di vitalità e morte cellulare in cellule trasfettate con i plasmidi indicati e sottoposte a stress genotossico indotto da CPT-11 e VP-16; **c**, analisi densitometriche dei risultati del western blot ottenute attraverso il software ImageJ. I valori sono stati calcolati effettuando il ratio delle proteine fosforilate sulla proteine totali (p-ERK/ERK tot e p-AMPK/AMPK tot); **d**, analisi dei livelli di espressione di BIM e dei geni target mitocondriali (COX-ND6) in cellule sottoposte a stress genotossico indotto da VP-16 mediante QPCR.

Concludendo, durante questa prima fase della seconda annualità progettuale abbiamo caratterizzato la risposta delle cellule di CCR mutate stabilmente e trattate con agenti chemioterapici. Abbiamo infatti dimostrato come la traslocazione di FoxO3A nel mitocondrio supporta indirettamente il meccanismo della fosforilazione ossidativa fondamentale per la sopravvivenza delle cellule tumorali sottoposte a stress genotossico indotto dal trattamento con farmaci chemioterapici (CPT-11 e VP-16).

In questo periodo, dopo la ripresa delle attività sperimentali in istituto (a seguito di lockdown per pandemia COVID-19), sono in corso gli esperimenti relativi alle attività progettuali previste da obiettivo 2. Quest'ultime sono incentrate sull'ampliamento delle linee cellulari di CCR con background genetici differenti che saranno sottoposte a trattamenti combinati con chemioterapici ed inibitori farmacologici delle vie di segnalazione implicate nella chemio-resistenza promossa dalla forma mitocondriale di FoxO3A.

Publicazioni:

- Chasing the FOXO3: insights into its new mitochondrial lair in colorectal cancer landscape. Grossi Valentina, Fasano Candida, Valentina Cestini, Lepore Signorile Martina, Paola Sanese, Cristiano Simone. *Cancers*.
- FOXO3 on the road to longevity: lessons from SNPs and chromatin hubs. Paola Sanese, Forte Giovanna, Disciglio Vittoria, Grossi Valentina, Cristiano Simone. *Computational and Structural Biotechnology Journal*
- FOXO3a from the Nucleus to the Mitochondria: a Round Trip in Cellular Stress Response. Fasano Candida, Disciglio Vittoria, Bertora Stefania, Lepore Signorile Martina, Cristiano Simone. *Cells*

Progetto 02/2019: Efficacia del trattamento combinato Paclitaxel e Ramucirumab in modelli di carcinoma gastrico avanzato con resistenza indotta dai taxani: studio *in vitro* e *in vivo*

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

Partecipanti: Dott.ssa Rosalba D'Alessandro, Dott.ssa Maria Grazia Refolo, Sig. Gianpiero De Leonardis

Background

Attualmente la combinazione del Ramucirumab con Paclitaxel rappresenta un'opzione terapeutica di seconda linea per i pazienti con Carcinoma Gastrico (GC) in progressione dopo una precedente terapia a base di platino e fluoropirimidina. I pazienti che hanno, invece, sviluppato resistenza ad un primo trattamento con taxani non sono candidati a tale trattamento combinato. La proposta progettuale ha lo scopo di comprendere, in un modello murino, sia i meccanismi di risposta molecolare di resistenza indotti dal Paclitaxel sia quelli di sinergia indotti dal trattamento combinato con il Ramucirumab. L'associazione Ramucirumab e Paclitaxel risulta di particolare interesse nel trattamento del carcinoma gastrico non solo per l'azione additiva ma anche sinergica in quanto l'effetto combinato risulta essere superiore alla somma degli effetti dei singoli agenti. Il meccanismo d'azione del Paclitaxel è legato alla capacità di interagire con la beta-tubulina III dei microtubuli, alterandone l'equilibrio di polimerizzazione/depimerizzazione. Ciò provoca la formazione di strutture microtubulari altamente stabili con conseguente inibizione della mitosi nella fase di transizione G2/M del ciclo cellulare e successiva induzione di apoptosi per attivazione della caspasi 3 e 9. L'incremento dei livelli di beta-tubulina III, così come una maggiore espressione di ciclina B1 o alterazioni nell'attivazione di vie di segnale intracellulari, quali PI3K/AKT/mTOR o MAPK, importanti nella regolazione del ciclo cellulare, sono stati riportati quali possibili meccanismi di resistenza ai taxani. Tali vie del segnale risultano essere bersaglio anche dell'azione del Ramucirumab.

Obiettivo

La conoscenza dei meccanismi responsabili di resistenza ai taxani, così come dei meccanismi capaci di contrastarli, come quelli dovuti alla combinazione con Ramucirumab, potrebbe condurre ad individuare target molecolari utili non solo a fini predittivi di risposta ma anche a fini prognostici. Sulla base dei risultati ottenuti *in vitro*, lo studio *in vivo* permetterà di definire i pattern molecolari, che sottendono i processi di crescita, diffusione tumorale e resistenza ai taxani. I risultati potranno, inoltre, essere utili nel definire in una seconda linea di trattamento l'efficacia della terapia di associazione nei pazienti con tumore gastrico resistenti ad un precedente trattamento con taxani.

Materiali e Metodi

Nel nostro laboratorio, abbiamo dimostrato in differenti linee cellulari di GC umano (HGC-27, N87, AGS, KATO III), che i due farmaci somministrati in combinazione esercitano un'azione sinergica e non semplicemente additiva rispetto all'azione dei singoli farmaci. 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 potenziare gli effetti esercitati dal Paclitaxel è stato confermato anche nel processo apoptotico e nella migrazione cellulare, valutata 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 investigate le principali cascate di segnale bersaglio dei farmaci in esame come MAPK e PI3K/Akt/mTOR.

Risultati

I nostri risultati preliminari suggeriscono che cellule di GC, in cui si è sviluppata resistenza all'azione del Paclitaxel, presentano disordini a livello dei microtubuli del citoscheletro, diminuita espressione di E-caderina associata a un aumento dei livelli della controparte mesenchimale, ridotta risposta all'azione di farmaci anti-mitotici e resistenza all'apoptosi. Inoltre, abbiamo studiato a livello molecolare le vie del segnale quali PI3K/Akt/mTOR e MAPK che sottendono ai processi di crescita e diffusione del tumore, dimostrando che l'azione combinata dei farmaci si esplica attraverso l'inibizione delle principali molecole di entrambe le vie del segnale.

Questi risultati sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica: MG Refolo et al. Molecular mechanisms of synergistic action of Ramucirumab and Paclitaxel in Gastric Cancers cell lines. **Scientific Reports**, 2020.

Stato di avanzamento

In continuità con le ricerche già avviate, il principale obiettivo di tale progetto sarà quello di analizzare, *in vivo*, i meccanismi molecolari alla base dell'effetto combinato dei due farmaci *versus* gli effetti dei singoli farmaci. Specificatamente, per tale scopo analizzeremo i tumori nel modello murino xenograft, derivati dall'impianto di cellule NCI-N87(ATCC CRL-5822) che derivano da metastasi epatiche di carcinoma gastrico e rese resistenti, nei nostri laboratori, all'azione del Paclitaxel. La resistenza all'azione del Paclitaxel è stata indotta *in vitro* mediante esposizione a concentrazioni crescenti del taxano, partendo da una concentrazione pari a 1/60 dell'IC50. La concentrazione del farmaco è stata incrementata del 25% ogni due settimane. Le cellule vengono definite resistenti quando sono in grado di crescere esponenzialmente in presenza di concentrazioni di Paclitaxel superiori alla IC50.

Lo studio permetterà di definire *in vivo* i pattern molecolari, osservati *in vitro*, che sottendono i processi di crescita, diffusione tumorale e resistenza ai taxani. I risultati potranno inoltre essere utili nel definire in una seconda linea di trattamento l'efficacia della terapia di associazione nei pazienti con tumore resistente ad un precedente trattamento con taxani.

Gli studi condotti sulle interazioni tra i componenti del microambiente, quali fattori di crescita e citochine, e la cellula tumorale e sul loro ruolo nell'influenzare la crescita e progressione della neoplasia, hanno consentito la pubblicazione di due reviews:

1 - Integrated Immune Gene Expression Signature and Molecular Classification in Gastric Cancer: New Insights.

Maria Grazia Refolo, Claudio Lotesoriere, Caterina Messa, Maria Gabriella Caruso, Rosalba D'Alessandro. J Leukoc Biol 2020. doi: 10.1002/JLB.4MR0120-221R.

2 - Inflammatory Mechanisms of HCC Development. Maria Grazia Refolo, Caterina Messa, Vito Guerra, Brian Irving Carr, Rosalba D'Alessandro. Cancers (Basel) 2020; 12(3):641.

Publicazioni:

- News about non-secretory exocytosis: mechanisms, properties, and functions. D'Alessandro Rosalba, Jacopo Meldolesi. Journal of Molecular Cell Biology
- News about the Role of the Transcription Factor REST in Neurons. Garcia-Manteiga Jose M., D'Alessandro Rosalba, Meldolesi Jacopo. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
- Integrated immune gene expression signature and molecular classification in gastric cancer: New insights MG Refolo, C Lotesoriere, C Messa, MG Caruso, R D'Alessandro. Journal of Leucocyte Biology

Progetto 04/2019: Valutazione dell'efficacia della somministrazione dell'anticorpo anti-IL1 Anakinra nel modello murino di Colite Ulcerosa TNF α indipendente.

Responsabile: Dott.Mauro Mastronardi

Partecipanti: Dott.ssa Grazia Serino, Dott.ssa Angela Tafaro, Dott. Marcello Chieppa, Dott. Antonio Lippolis

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 (Crohn's Disease, CD) e la Colite Ulcerosa (1, 2).

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 nel modello murino proposto per il presente studio (WINNIE), come una mutazione missenso nel gene di Muc2 causi l'assenza dello strato di muco e la conseguente infiammazione intestinale mediata dall'attivazione in senso infiammatorio del sistema immunitario.

Nello studio proposto studieremo la mutazione in omozigosi, e per semplicità chiameremo questi topi Winnie^{-/-}, come indice del genotipo mutato su entrambi gli alleli. Inoltre, analizzeremo un secondo gruppo di topi KO per il TNF α (linea 5540) ed infine l'incrocio delle due linee (topi Winnie-5540).

Nel modello murino di Colite Ulcerosa (topi Winnie) abbiamo rilevato una elevata presenza dell'IL-1 α a livello del colon che aumenta ulteriormente nei topi Winnie knock-out per il TNF α (linea Winnie5540) [De Santis et al.] Questo dato suggerisce una regolazione, ad oggi sconosciuta, della produzione di IL-1 α da parte del TNF α .

Il recettore per l'IL-1 appartiene a una superfamiglia di recettori caratterizzati dalla presenza del dominio TIR (toll-IL-1 resistance) e del dominio Immunoglobulinico. Esistono diverse possibilità di intervento farmacologico anti IL-1.

Negli ultimi 20 anni è stato studiato il ruolo del farmaco anakinra nei processi infiammatori. La molecola è un antagonista ricombinante del recettore per l'IL1. Andando a bloccare il sito di legame per l'IL-1 α sul rispettivo recettore, l'anakinra diminuisce l'effetto infiammatorio di questa citochina.

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 α , è in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α . Eventuali risultati positivi saranno alla base di una richiesta di autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β per i pazienti affetti da colite ulcerosa non responder ai farmaci biologici anti-TNF α . I nostri dati preliminari, confermano l'aumento di IL-1 α osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

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

È stata ottenuta l'autorizzazione per la sperimentazione animale.

Abbiamo effettuato gran parte degli esperimenti previsti

Il manoscritto "**Anakinra efficiently reduces inflammation in TNF-independent ulcerative colitis, a lesson from murine models**" che descrive i risultati dello studio è in fase di revisione da parte dei collaboratori

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

Obiettivo 1: Valutazione morfologica e molecolare della progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle.

Obiettivo specifico 1: Lo studio prevede la somministrazione per via intraperitoneale di 0.4 mg/topo (in 0.1 ml di PBS) di anakinra giornalmente per 10 settimane, a partire dalla quarta settimana di età. Abbiamo utilizzato fonti presenti in letteratura per valutare le dosi e la via di somministrazione meno invasiva (13-16). Il farmaco ha già dimostrato di non comportare effetti avversi o sofferenza negli animali trattati. I topi verranno pesati giornalmente, verrà valutata la presenza di sangue nelle feci insieme alla valutazione di benessere generale. Alla fine del trattamento i topi saranno sacrificati, l'intestino verrà rimosso e ne verrà studiata la morfologia per valutare eventuali miglioramenti indotti dalla somministrazione del farmaco. Verranno isolati tratti intestinali dal colon mediale per permettere analisi molecolari ed i linfonodi mesenterici per le analisi della attivazione del sistema immunitario adattativo.

Il nostro studio permetterà di valutare se la l'inibizione dell'azione dell'IL-1 β , sia in grado di proteggere i topi Winnie-5540 dall'infiammazione cronica osservata in assenza di TNF α .

Obiettivo 2: Valutazione del profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie-TNF α KO (e controlli) trattati con farmaco o vehicle al fine di individuare biomarker specifici della patologia e della risposta al farmaco.

Obiettivo specifico 2: Il profilo di espressione genica del colon mediale ottenuto dai Winnie-TNF α KO e delle linee murine controllo (WT, 5540 e Winnie) verrà analizzato mediante RNAseq. In un secondo momento valuteremo il cambiamento del profilo di espressione indotto dal trattamento con il farmaco anti-IL-1 β . Dagli stessi campioni utilizzati per la valutazione del profilo di espressione genica, valuteremo il profilo di espressione dei miRNA, in modo tale da poter individuare miRNAs coinvolti nella patologia infiammatoria cronica TNF α -indipendente. L'eventuale identificazione di miRNA coinvolti nella modulazione dell'infiammazione intestinale nei topi trattati con farmaco anti-IL-1 β potrà consentire la nascita di nuove linee sperimentali basate su miRNA-Based Therapeutic Strategies.

Obiettivo 3: Validazione dei dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD non responder al trattamento con anti-TNF α .

Obiettivo specifico 3: Eventuali risultati positivi ottenuti dalla sperimentazione su modello animale saranno alla base dell'analisi sistematica della banca di siero di pazienti trattati con farmaco anti-TNF α . Abbiamo già ottenuto l'autorizzazione dal comitato etico per la conservazione e la successiva analisi del siero dei pazienti affetti da colite ulcerosa e trattati con farmaco anti-TNF α . Valuteremo in parallelo il profilo citochinico dei pazienti che si sono rivelati dei responder o non responder alla terapia anti-TNF α , con particolare attenzione al livello di TNF α ed IL-1 β circolante. Se i risultati dovessero dimostrare la presenza di alti livelli di IL-1 β nel sangue dei pazienti non responder ai farmaci biologici anti-TNF α , chiederemo l'autorizzazione per la sperimentazione clinica del trattamento con farmaci anti-IL1 β in questa ristretta sottopopolazione di pazienti affetti da colite ulcerosa. I nostri dati preliminari confermano l'aumento di IL-1 β osservato dal gruppo della Dr.ssa Powrie [17] nei pazienti IBD non responder a terapie biologiche anti TNF α . In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per il trattamento dei pazienti IBD non responder, per i quali ci sono oggi un limitato numero di scelte terapeutiche.

Prima metà del progetto:

| | |
|------------|--|
| 0-6 mesi: | Breeding delle colonie murine e trattamento farmacologico. |
| 0-12 mesi: | Analisi morfologiche e molecolari |

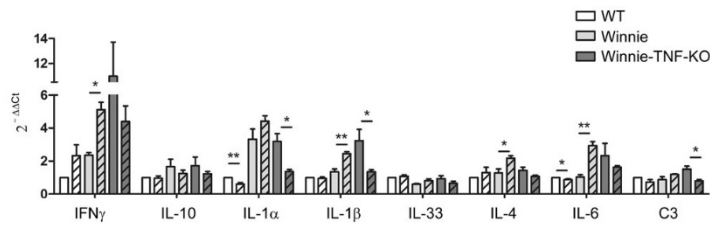
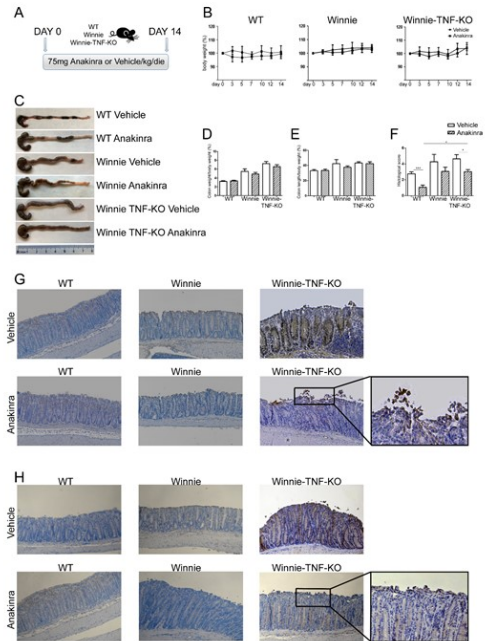
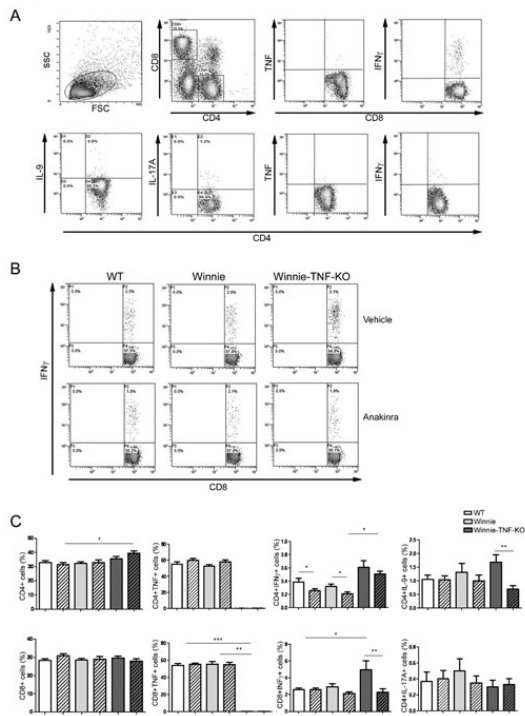
AVANZAMENTO:

Abbiamo sottomesso al Ministero l'autorizzazione per la sperimentazione animale per il trattamento dei topi Winnie e Winnie 5540 con il Farmaco ANAKINRA.

In seguito al conseguimento dell'autorizzazione (n. 760/2017PR) abbiamo cominciato il breeding degli animali ottenendo le colonie desiderate.

Ad oggi abbiamo trattato gli animali con il farmaco e valutato la risposta dal punto di vista morfologico e molecolare.

Abbiamo poi effettuato approfondite analisi sulla produzione di citochine infiammatorie da parte delle cellule T helper nei linfonodi mesenterici dei topi trattati con Anakinra evidenziando la diminuzione di IFN γ nelle cellule T CD8 $^+$.



Progetto 10/2019: “Sviluppo di una piattaforma di nanomedicina nelle malattie neoplastiche ed infiammatorie gastrointestinali”

Responsabile: Prof. Gianluigi Giannelli

Partecipanti: Mauro Mastronardi, Claudio Lotesoriere, Francesco Dituri, Maria Principia Scavo

Background

L’impiego delle nanotecnologie, applicate alle scienze mediche (nanomedicina) rappresenta un approccio fondamentale per la realizzazione della Medicina di Precisione che ha ispirato la redazione delle recenti linee di Ricerca dell’IRCCS “S. de Bellis”. Le nanoformulazioni sono fondamentali per poter ridurre le concentrazioni di farmaco, che altresì rimarrebbe in circolo, indirizzandolo direttamente sul tessuto interessato. I nanovettori possono essere organici ed inorganici, e possono essere coniugati superficialmente con molecole, quali anticorpi che riconoscono le proteine presenti sulla membrana cellulare delle cellule tumorali e attivando una reazione sito specifica, consentono un rilascio mirato del farmaco. Questo consente un’ottimizzazione dell’utilizzo delle quantità somministrate, con conseguente riduzione della distribuzione sistemica del farmaco e riduzione degli effetti collaterali, con un conseguente miglioramento della qualità di vita. Il razionale di questo approccio si applica quindi alle neoplasie, ma anche a tutte quelle patologie che richiedono l’uso di chemioterapici o di farmaci biologici con molteplici effetti collaterali come ad esempio le malattie infiammatorie croniche intestinali.

I nanovettori devono soddisfare numerosi requisiti, fra i quali: elevata biocompatibilità, attivarsi rilasciando i farmaci nel tessuto interessato dalla patologia, che può essere lo stomaco con un pH pari a 1, oppure passare indenni attraverso il pH gastrico proteggendo il carico molecolare in essi presenti ed arrivare nell'intestino dove, per attivazione pH dipendente, rilasciano il farmaco incapsulato nel loro interno.

Un'altra caratteristica delle nanoparticelle utilizzate per il rilascio dei farmaci, è di dover superare la barriera costituita dallo strato mucoso (laddove ancora presente durante la patologia), per poter raggiungere le cellule malate, quando somministrate per via orale e non per via sistemica. L'applicazione di queste tecnologie potenzialmente rappresenta una piattaforma di nanomedicina che può essere esportata per le terapie di numerose patologie del tratto gastroenterologico. Ad esempio, tumori del colon CRC, o a malattie infiammatorie croniche intestinali come il morbo di Crohn o Rettocolite Ulcerosa.

Le nanoformulazioni, possono inoltre essere utilizzate per il trasporto localizzato di steroidi, chemioterapici, e per ripristinare il microbiota locale e bilanciare le condizioni micorambientali nel sito patologico.

Recentemente, diversi altri studi hanno dimostrato che le nanoparticelle, possono essere utilizzate per la diagnosi di patologie tumorali, mediante la rilevazione di nanovesicole, dette esosomi, che vengono prodotte dalle cellule tumorali e, che mediante individuazione nel torrente ematico, potrebbero fornire informazioni precise sullo stato di avanzamento della malattia e sull'efficacia delle terapie applicate, riducendo così i tempi diagnostici e di follow-up.

Obiettivo dello studio

Obiettivo 1: Questo obiettivo si propone di sviluppare nanovettori per il trasporto di farmaci e per la diagnostica, utilizzando molecole organiche e/o molecole biologiche, e composti inorganici, che verranno formulate, allo stato di nanoparticelle per poter incapsulare i farmaci di interesse, sia idrofilici che idrofobici, oppure che verranno utilizzati a scopo diagnostico. Le nanoparticelle prodotte a scopo terapeutico, saranno stabili e resistenti alla digestione enzimatica e avranno un idoneo coefficiente di ritenzione del farmaco, garantendo una maggior biodisponibilità nel sito interessato dalla patologia, con riduzione della tossicità sistemica. Inoltre, verranno sviluppate nanoparticelle per la diagnosi precoce delle patologie in oggetto, sfruttando la capacità che verrà loro attribuita, di legare proteine specifiche presenti sulle membrane di vescicole circolanti (esosomi) prodotte dalle cellule tumorali, il che consentirà di avere un quadro sullo stato della patologia e sull'efficacia delle terapie, in maniera molto rapida.

Obiettivo 2: Questo approccio sarà testato in primis come trattamento per il trattamento del CRC e per il Morbo di Crohn. Normalmente, un trattamento sistemico con farmaci antitumorali per il CRC e anti-TNF per il Morbo di Crohn, migliora i sintomi della patologia; tuttavia, trattamenti prolungati hanno effetti collaterali severi, che portano alla sospensione temporanea delle terapie, con l'allungarsi dei tempi di trattamento. Per questo intendiamo sviluppare un trattamento che può essere somministrato per via orale, e che possa agire garantendo alte concentrazioni nel lume del tratto interessato dalla malattia. Ipotizziamo che in questo modo si riducano gli effetti collaterali, poiché il farmaco si accumula al sito di azione a concentrazioni sufficientemente elevate a livello locale senza accumulo sistemico in altri organi.

Materiali e metodi

Nanoparticelle.

Le nanoparticelle verranno sviluppate a partire da fosfolipidi e proteine (micelle e liposomi) che simuleranno le membrane biologiche, saranno biodegradabili e biocompatibili disponibili commercialmente con procedure di crosslinking chimico o condensazione ionica, e potranno essere coniugati con anticorpi che sfruttando la reazione antigene anticorpo, riconosceranno delle proteine notevolmente espresse nelle cellule patologiche, e per niente nelle cellule normali. Inoltre, verranno testate anche diverse lectine e mucine, poiché entrambe le tipologie di proteine possono fornire addizionali proprietà di targeting ai tessuti patologici. Il range di dimensione di queste nanoparticelle sarà compreso fra 50-250 nm per garantire l'attraversamento dello strato mucoso e sufficiente volume di carico per i farmaci.

Test diagnostici

Dopo aver estratto e caratterizzato le nanovesicole circolanti dal plasma dei pazienti da cui abbiamo ottenuto le biopsie per produrre gli organoidi, saranno preparate nanoparticelle di oro con un diametro medio di 35 nm, coniugate con un anticorpo specifico per una proteina presente sulla membrana delle vescicole la cui presenza è determinata dall'aumento del grading della patologia. Le vescicole verranno quindi individuate mediante microscopia e quantizzate sulla base del legame antigene-anticorpo che si costituirà tra le nanoparticelle e gli esosomi.

Test in vitro

Le particelle saranno testate per le loro interazioni in vitro con sistemi 2D e 3D di colture cellulari da linee cellulari tumorali o organoidi derivanti da tessuti di biopsia dei pazienti, o di soggetti esenti da patologia in modo da garantire un modello di studio della penetrazione dello strato mucoso delle particelle, in condizioni normali e patologiche. L'analisi verrà effettuata

utilizzando particelle marcate in fluorescenza e non per studiare l'uptake cellulare, la vitalità e le modifiche del citoscheletro dovute all'azione dei farmaci utilizzati e/o all'eventuale citotossicità che si dovesse presentare utilizzando le nanoparticelle prive di farmaco.

Test in vivo

Animali sani verranno impiegati per lo studio delle interazioni tra le nanoparticelle sviluppate e il microbiota per lo studio sul morbo di Chron, mentre per lo studio dell'efficacia chemioterapica, nel trattamento del CRC, si utilizzerà un modello murino transgenico (Apc^{min+}). Inizialmente verranno caratterizzati i ceppi che sono solitamente sovrarappresentati o alterati nei pazienti affetti da Morbo di Crohn, quali *Bacteroides*, *Eubacteria* and *Peptostreptococcus* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.02.018>), prestando particolare attenzione all'uptake e all'attività antibiotica delle nanoparticelle. Perciò, le nanoparticelle verranno marcate con una sonda fluorescente per poi procedere alla somministrazione orale negli animali, che verranno sacrificati a diversi tempi di esposizione (*time-points*) per rilevare la presenza delle nanoparticelle nello strato mucoso, nelle cellule epiteliali e nei batteri del microbiota. Questa analisi servirà a determinare un potenziale meccanismo di feedback da parte del microbiota sulle cellule affette dalla patologia. Negli animali affetti da tumore, si andrà a studiare dopo l'uptake, l'effetto farmacologico del trattamento, con l'eventuale regressione della patologia.

Risultati / stato di avanzamento per la I annualità del progetto

Nello sviluppo della piattaforma di nanomedicina, abbiamo sviluppato delle nanoformulazioni micellari, comparandole alle liposomiali, che trasportavano il 5-FU, chemoadeso a nanoparticelle di Fe (SPION). Nell'ambito dello studio comparativo in vitro, su cellule di CRC primarie e metastatiche, rispettivamente CaCo2 e CoLo-205, abbiamo rilevato mediante la microscopia elettronica a scansione, che in effetti l'azione citotossica, data dal 5-FU incapsulato nei liposomi si rivolge soprattutto alle modifiche del citoscheletro, e soprattutto alla riduzione degli pseudopodi cellulari, con conseguente perdita di aderenza e aggressività cellulare, sia in cellule metastatiche che in cellule di tumore primario rispetto alle cellule trattate con la combinazione micellare, in cui abbiamo incapsulato il 5-FU adsorbito sulle SPION. Abbiamo confermato l'azione citotossica, mediante test di proliferazione e mediante immunofluorescenza per il marcatore di proliferazione Ki-67, che risultava significativamente ridotto nelle cellule trattate con i liposomi, rispetto al controllo e alle cellule trattate con le micelle, confermandoci quindi che nanoformulazioni date da particelle con bilayer fosfolipidico, sono più affini alle membrane cellulari e consentono un rilascio maggiore dovuto ad una fusione più rapida con le membrane cellulari (*Imaging modification of colon carcinoma cells exposed to lipid based nanovectors for drug delivery: a scanning electron microscopy investigation. Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Fabio Vischio, Nunzio Denora, Valentino Laquintana, Annalisa Cutrignelli, Marinella Striccoli, Gianluigi Giannelli, Angela Agostiano, Maria Lucia Curri, Maria Principia Scavo. RSC Adv., 2019,9, 21810*). Abbiamo approfondito i nostri studi in vitro, sempre utilizzando le due linee cellulari tumorali (CaCo2 e CoLo205), e trattandole con i liposomi, coniugati con un anticorpo contro la proteina Frizzled-10, recettore del Wnt, che aumenta all'aumentare della carcinogenesi, trasportanti il 5-Fluoracile, farmaco chemioterapico di prima linea, nel trattamento del CRC, dimostrando la maggiore affinità dei liposomi targhettanti la proteina di membrana, rispetto ai liposomi non targhettanti. Mediante test di vitalità cellulare abbiamo constatato che laddove le cellule venivano trattate con liposomi non targhettanti l'effetto del chemioterapico era minore rispetto all'effetto che questo aveva quando i liposomi erano coniugati con l'anticorpo, che si andava a legare con la proteina di membrana presente nelle cellule tumorali, utilizzando per altro la stessa concentrazione. Inoltre, abbiamo dimostrato che la riduzione della vitalità si otteneva a concentrazioni molto più basse, rispetto alla concentrazione che usualmente viene utilizzata nei trattamenti con il 5-FU non incapsulato ($5 \mu\text{M}$ del farmaco non incapsulato Vs $2 \mu\text{M}$ del 5-FU incapsulato nei liposomi). Abbiamo inoltre dimostrato che anche la capacità di migrare delle cellule tumorali viene inibita utilizzando i liposomi targhettanti la FZD10, già ad una concentrazione di $2 \mu\text{M}$ di farmaco, confermando quindi l'azione citotossica a livello del citoscheletro. (*Effectiveness of a Controlled 5-FU Delivery Based on FZD10 Antibody-Conjugated Liposomes in Colorectal Cancer In vitro Models. Scavo MP, Cutrignelli A, Depalo N, Fanizza E, Laquintana V, Gasparini G, Giannelli G, Denora N. Pharmaceutics. 2020 Jul 10;12(7):650. doi: 10.3390/pharmaceutics12070650*).

Come da programma prestabilito, in contemporanea stiamo sviluppando nell'ambito della piattaforma anche sistemi diagnostici basati sull'utilizzo di nanoparticelle di Au, che coniugate con un anticorpo contro la FZD10 (ma si potrebbero utilizzare diverse proteine specifiche per diverse patologie, rilevano la presenza di nanovesicole circolanti prodotte esclusivamente dalle cellule tumorali, che potrebbero fornire indicazioni sia sullo staging della malattia, sia sull'efficacia della terapia, poiché ad una regressione della patologia corrisponde una diminuzione dell'espressione della proteina negli esosomi, e conseguente riduzione del legame tra nanoparticelle e esosomi. (*Exosomes for Diagnosis and Therapy in Gastrointestinal Cancers. Maria Principia Scavo, Nicoletta Depalo, Valeria Tutino, Valentina De Nunzio, Chiara Ingrosso, Federica Rizzi, Maria Notarnicola, Maria Lucia Curri and Gianluigi Giannelli Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 36.; Frizzled-10 Extracellular Vesicles Plasma Concentration Is Associated with Tumoral Progression in Patients with Colorectal and Gastric Cancer. Scavo Maria Principia, Cigliano Antonio, Depalo Nicoletta, Fanizza Elisabetta, Maria Grazia Bianco, Denora Nunzio, Laquintana Valentino, Curri Maria Lucia, Lorusso Dionigi, Lotesoriere Claudio, Panarese Alba, Giannelli Gianluigi. Journal of Oncology Volume 2019, Article ID 2715968*).

Sulla base dei risultati fin qui ottenuti e nell'ambito dello sviluppo ulteriore della piattaforma, si sta procedendo a sviluppare nanosistemi per il trasporto dei farmaci, utilizzando gli esosomi estratti dal plasma dei pazienti, come nanovettori, in modo da poter sviluppare un sistema personalizzato e biocompatibile totalmente con il paziente.

Pubblicazioni:

- Calcium regulates HCC proliferation as well as EGFR recycling/degradation and could be a new therapeutic target in HCC. Modica Teresa Maria Elisa, Dituri Francesco, MANCARELLA SERENA, Pisano Claudio, Fabregat Isabel, Giannelli Gianluigi. *Cancers*.
- Epigenetic upregulation and functional role of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier isoform 1 in hepatocellular carcinoma. Vittoria Infantino, Dituri Francesco, Paolo Convertini, Anna Santarsiero, Ferdinando Palmieri, Simona Todisco, MANCARELLA SERENA, Giannelli Gianluigi, Vito Iacobazzi. *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-MOLECULAR BASIS OF DISEASE*
- Frizzled-10 Extracellular Vesicles Plasma Concentration is Associated With Tumoral Progression In Patients With Colorectal And Gastric Cancer. Scavo Maria Principia, Antonio Cigliano, Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Maria Grazia Bianco, Nunzio Denora, Valentino Laquintana, Maria Lucia Curri, Lorusso Dionigi, Lotesoriere Claudio, Panarese Alba, Giannelli Gianluigi. *Journal of Oncology*
- FZD10 Carried by Exosomes Sustains Cancer Cell Proliferation. Scavo Maria Principia, Depalo Nicoletta, Rizzi Federica, Ingrosso Chiara, Fanizza Elisabetta, Chieti Annarita, Messa Caterina, Denora Nunzio, Laquintana Valentino, Striccoli Marinella, Curri Maria Lucia, Giannelli Gianluigi. *Cells*
- Imaging modification of colon carcinoma cells exposed to lipid based nanovectors for drug delivery: a scanning electron microscopy investigation Nicoletta Depalo, Elisabetta Fanizza, Fabio Vischio, Nunzio Denora, Valentino Laquintana, Annalisa Cutrignelli, Marinella Striccoli, Giannelli Gianluigi, Angela Agostiano, Maria Lucia Curri, Scavo Maria Principia *RSC Advances*
- Novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor galunisertib (LY2157299) in advanced hepatocellular carcinoma. Faivre Sandrine, Santoro Armando, Kelley Robin K, Gane Ed, Costentin Charlotte E, Gueorguieva Ivelina, Smith Claire, Cleverly Ann, Lahn Michael M, Raymond Eric, Benhadji Karim A, Giannelli Gianluigi. *LIVER INTERNATIONAL*
- Signaling networks in cholangiocarcinoma: molecular pathogenesis, targeted therapies and drug resistance. Laura Fouassier, Marco Marzoni, Marta B. Afonso, Steven Dooley, Kevin Gaston, Giannelli Gianluigi, Cecilia M. P. Rodrigues, Elisa Lozano, MANCARELLA SERENA, Oreste Segatto, Javier Vaquero, Jose J. G. Marin, Cédric Coulouarn. *LIVER INTERNATIONAL*
- SVR12 rates higher than 99% after sofosbuvir/ velpatasvir combination in HCV infected patients with F0-F1 fibrosis stage: A real world experience . Alessandra Mangia, Valeria Piazzolla, Anna Giannelli, Egidio Visaggi, Nicola Minerva, Vincenzo Palmieri, Immacolata Carraturo, Domenico Potenza, Nicola Napoli, Gianfranco Lauetta, Vincenzo Tagarielli, Rosanna Santoro, Piccigallo Ernesto, Sergio De Gioia, Angelo Chimenti, Giuseppe Cuccorese, Antonio Mentrangolo, Michele Mazzola, Ernesto Agostinacchio, Giuseppe Mennea, Carlo Sabbà, Marina Cela, Massimiliano Copetti, Ruggiero Losappio. *PLoS One*
- The Interactivity between TGFβ and BMP Signaling in Organogenesis, Fibrosis, and Cancer. Dituri Francesco, Cossu Carla, MANCARELLA SERENA, Giannelli Gianluigi. *Cells*
- Transforming Growth Factor- Promotes Morphomechanical Effects Involved in Epithelial to Mesenchymal Transition in Living Hepatocellular Carcinoma. Mariafrancesca Cascione, Stefano Loporatti, Dituri Francesco, Giannelli Gianluigi. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Validation of Hepatocellular Carcinoma Experimental Models for TGF-beta Promoting Tumor. MANCARELLA SERENA, Krol Silke, Crovace Alberto, Stefano Loporatti, Dituri Francesco, Martina Frusciante, Giannelli Gianluigi. *Cancers*
- Biomarkers and overall survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with TGF-βRI inhibitor galunisertib Giannelli Gianluigi, Armando Santoro, Robin K Kelley, Ed Gane, Valerie Paradis, Ann Cleverly, Claire Smith, Shawn T Estrem, Michael Man, Shuaicheng Wang, Michael M Lahn, Eric Raymond, Karim Benhadji, Sandrine Faivre *Plos One*
- Reproducibility warning: The curious case of Polyethylene glycol 6000 and spheroid cell culture Krol *Plos One*

- Impaired anti-tumor T cell response in hepatocellular carcinoma. N Chaoul, S Mancarella, L Lupo, G Giannelli, F Dituri *Cancers*
- Biomarkers and Overall Survival in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma Treated with TGF- β RI Inhibitor Galunisertib. Giannelli. *Plos One*.
- Clinical Multigene Panel Sequencing Identifies Distinct Mutational Association Patterns in Metastatic Colorectal Cancer F Belardinilli, C Capalbo, U Malapelle, P Pisapia, D Raimondo, E Milanetti, Y Mahdavian, C Liccardi, C Bonfiglio, S Mezi, V Magri, A Coppa, A Nicolussi, A Gradilone, M Petroni, S Di Giulio, F Fabretti, P Infante, S Coni, G Canettieri, G Troncone, G Giannini. *Frontiers in Oncology*
- Multi-sulfonated ligands on gold nanoparticles as virucidal antiviral for Dengue virus. Krol et al. *Scientific Reports*.
- NEMESIS: Non-inferiority, Individual Patient Meta-analysis of Selective Internal Radiation Therapy with Yttrium-90 Resin Microspheres versus Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma M Venerito, M Pech, A Canbay, R Donghia, V Guerra, G Chatellier, H Pereira, M Gandhi, PKH Chow, V Vilgrain, P Malfertheiner, J Ricke, G Leandro. *Journal of Nuclear Medicine*.
- Nanoencapsulated human pancreatic islets for β -cell replacement in Type 1 diabetes. S Krol, W Baronti & P Marchetti. *Nanomedicine*.
- Colorectal cancer and bone tissue: fantastic relations and where to find them. I Gigante, V Tutino, V De Nunzio, M Notarnicola. *Cancers*

Progetto 1/2020: "Il ruolo di esosomi per il cross-talk tra cellule tumorale e il microambiente in hepatocarcinoma"

Responsabile: *dott.ssa Silke Krol*

Partecipanti: *Francesco Dituri, Matteo Centonze, Mariangela Mezzapesa, Nunzio Denora*

Background

Gli esosomi sono vescicole di membrana le cui dimensioni di diametro sono comprese tra i 30 nm e i 130 nm. Sono prodotte nel compartimento endosomiale dai corpi multivescicolari (MVB). Vengono rilasciati nel milieu extracellulare sia in condizioni fisiologiche che patologiche. Gli esosomi contengono mRNA, RNA lungo non codificante, proteine, DNA e miRNA in una composizione ben definita. Prove sperimentali indicano il ruolo fondamentale degli esosomi nell'insorgenza di patologie ed in particolare nella crescita di tumori. Ciò accade poiché influenzano il microambiente tumorale e preparano le nicchie per le metastasi. Nel carcinoma epatocellulare (HCC), il tumore è composto da: epatociti maligni, cellule stromali tumorali attivate dalle cellule epatiche stellate, fibroblasti associati a tumori, miofibroblasti, cellule immuni e matrice extracellulare (ECM) dove avviene principalmente lo sviluppo della fibrosi.

Goulet et al. hanno mostrato che gli esosomi derivanti da cellule del tumore alla vescica contengono un alto tasso di TGF- β . In alcune linee cellulari il contenuto di TGF- β rilasciato negli esosomi è maggiore di quello libero. Il TGF- β esosomiale è coinvolto nella transizione fenotipica dei fibroblasti in CAFs come il TGF- β libero ma non è soggetto alle proprietà che ha il TGF- β libero in relazione alla produzione di ECM.

Si può concludere, in sintesi, che il ruolo degli esosomi nel crosstalk tra cellule tumorali, il loro microambiente e siti metastatici distanti è meritorio di interesse, specialmente alla luce dei fallimenti delle strategie terapeutiche che hanno come target il pathway del TGF- β . Ad esempio, il TGF- β racchiuso negli esosomi potrebbe bypassare il controllo degli inibitori e favorire lo sviluppo di tumori. Nel progetto ci concentreremo sulla presenza del TGF- β negli esosomi derivanti da linee cellulari di epatocarcinoma con e senza cellule CAF che possano avere la funzione di trigger.

Obiettivo dello studio

Obiettivo specifico 1: Sviluppo di Organoidi (3D) dalla linea cellulare dell'epatocarcinoma e fibroblasti associati al cancro

Obiettivo specifico 2: Identificazione di TGF- β in esosomi rilasciati da CAF o da cellule tumorali

Materiali e metodi

Sviluppo di un nuovo sistema di sferoidi tumorali per migliorare gli studi sul cancro, raccolta di esosomi ed i test terapeutici

Risultati / stato di avanzamento per la prima annualità del progetto

Sviluppo di Organoidi (3D) dalla linea cellulare dell'epatocarcinoma e fibroblasti associati al cancro:

In collaborazione con l'Università di Twente è stata sviluppata una nuova piattaforma basata sui frattali per la crescita di organoidi (CAF (cancer-associated fibroblasts) e cellule tumorale). In collaborazione con Francesco Dituri abbiamo messo in coltura le cellule CAF sui frattali e abbiamo visto che le cellule tumorale contaminanti formano sferoide di microtumori su un strato di fibroblasti (fig.1).

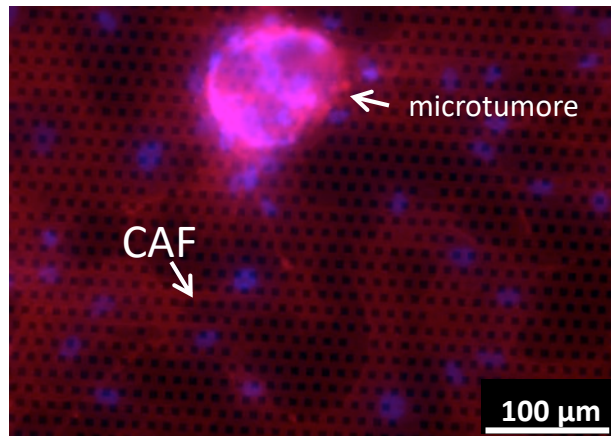


Figure 1. Coltura CAF dopo 13 giorni sulla nuova piattaforma frattale.

Altri esperimenti con cellule primarie di tumori di pancreas, di fegato e di intestine, hanno mostrato che queste superfici favoriscono la crescita delle cellule in 3D, risultante dopo alcuni giorni nella formazione di organoidi.

Il lavoro condurrà due brevetti, multiple pubblicazioni ed alla nascita di una start-up. Un brevetto è stato sottomesso e una pubblicazione è sotto valutazione nel giornale Biomaterials (IF 10.317). Una seconda pubblicazione è in preparazione.

Identificazione di TGF-beta in esosomi rilasciati da CAF o da cellule tumorali.

In collaborazione con l'Università di Bari (Prof. Nunzio Denora/Studentessa Mariangela Mezzapesa, UNIBA) abbiamo iniziato la Coltura cellulare per la raccolta di esosomi. Gli esosomi raccolti sono stati caratterizzati per la dimensione via DLS (dynamic light scattering; UNIBA) e per il contenuto proteico via Bradford test. Al fine del mese gli esosomi raccolti da CAF vengono spediti ad Alfatest (Milano) per la caratterizzazione via una nuova tecnica "ExoView" per la presenza di TGF-beta sia sulla superficie sia all'interno degli esosomi. Nanoparticelle che sono usati come marcatore per gli esosomi dal CAF sono stati preparati e caratterizzati. Primi esperimenti per la visualizzazione tramite il microscopio di fluorescenza e l'entrata delle particelle in cellule HLF (ilean tumorale per il cancro di fegato) erano condotti.

Pubblicazioni

- Exosomes for Diagnosis and Therapy in Gastrointestinal Cancers MP Scavo, N. Depalo, V. Tutino, V. De Nunzio, C. Ingrosso, F. Rizzi, M. Notarnicola, ML Curri, G. Giannelli Int. J. Mol. Sci.
- Effectiveness of a controlled 5-FU delivery based on FZD10 antibody conjugated liposomes in colorectal cancer in vitro models" "MP Scavo, A Cutrignelli, N Depalo, E Fanizza, V Laquintana, G Gasparini, G Giannelli, N Denora. Pharmaceutics
- A possible role of FZD10 delivering exosomes derived from colon cancers cell lines in inducing activation of epithelial-mesenchymal transition in normal colon epithelial cell line. MP Scavo, F Rizzi, N Depalo, E Fanizza, C Ingrosso, ML Curri, G Giannelli" International Journal of Molecular Sciences.

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 nell’anno 2020 sono i seguenti:

Progetto 10/2018: Grading e outcome clinico di GEP/NET in relazione al PDL-1 status

Responsabile: dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: Elisabetta Cavalcanti, Sergio Coletta

Background

I tumori neuroendocrini (NETs) sono un gruppo eterogeneo di tumori rari, con incidenza annuale di 4-5 nuovi casi ogni 100.000 abitanti. I tumori neuroendocrini pancreatici (pNETs) rappresentano circa il 25% dei NETs e 1-3% dei tumori pancreatici. 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 < 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).

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-1e del suo ligando (PD-L1) induce la regressione durevole del tumore e la stabilizzazione prolungata della malattia nei pazienti con tumori solidi avanzati. 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. In letteratura è evidenziato che 9 su 25 pazienti (36%) con tumore e positivi al PDL-1 hanno una risposta obiettiva alla terapia. Pertanto, non essendoci ancora in letteratura molte evidenze sulla correlazione nei NET con espressione PDL-1 e prognosi, in questo studio, sarà analizzata l’espressione del PD-L1 in una ben caratterizzata coorte di GEP-NET al fine di delineare e differenziare le caratteristiche clinico patologiche e molecolari.

Obiettivo dello studio

L’obiettivo dello studio è di indagare il valore prognostico dell’espressione di PD-L1 in pazienti con NET. In prima analisi si andrà a valutare la 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. Successivamente 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 insieme all’espressione di PD-L1 ci può aiutare ad identificare sottogruppi tumorali con diverso comportamento biologico e/o diversa risposta terapeutica.

Risultati / stato di avanzamento

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. Successivamente è stata messa a punto la metodica immunoistochimica per la valutazione tissutale del PD-L1. Attualmente il test del PD-L1 è controverso principalmente a causa dell'eterogeneità del tumore, della presenza in commercio di diversi tipi di anticorpi anti PD-L1 e dalla mancanza della definizione di un cut-off 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 valutati espressione di PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore. Abbiamo evidenziato una differente espressione del PDL-1 su cellule immunitarie infiltranti il tumore in base al grado, questo a dimostrazione del fatto che i NEN potrebbero acquisire resistenza alla sorveglianza immunitaria, attraverso l'aumento del PD-L1 e inibendo i linfociti infiltranti peritumorali e intratumorali. 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 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. 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. In 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, TGFB Signalling Pathways, P53 signalling pathway, WNT signalling, P13K-AKT signalling pathway. Nel contempo nel secondo anno di progetto 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, 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.** Infine, nell'ultimo anno abbiamo focalizzato i nostri studi sugli 8 miRNA identificati che sono espressi in tutti i gradi GEP-NET ma a livello diverso. In particolare, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sull'espressione di miR-96-5p che era progressivamente espresso dai NET G1 a i NET G3. miR-96-5p regola la pathway FOXO. FOXO1a è regolato da miRNA96 FOXO1a è un fattore di trascrizione coinvolto nella pathway IGF-1R / PI3K / Akt. Nei tumori maligni, FOXO1 è down-regolato ed il suo ruolo nella tumorigenesi non è del tutto chiaro. È stato ipotizzato che la downregulation di questo gene sia un passo importante nella formazione del tumore. 'attività e la funzione di FOXO1 sono regolate attraverso lo shuttling tra il nucleo e il citoplasma. In particolare, noi abbiamo evidenziato una differente espressione di FOXO tra NET G1, G2 e G3. Nello specifico l'espressione di FOXO1 è maggiormente localizzato nel nucleo dei NET G1 e G2 e nel citoplasma nei NET G3. I casi di NET ben differenziati (G1-G2) hanno un'espressione nucleare / citoplasmatica FOXO1 costantemente positiva che diminuisce con la progressione del tumore, confermando gli esiti più favorevoli nei pazienti G1 / G2 GEP-NET. Inoltre, l'effetto dell'attività di FOXO1 sulla chemiosensibilizzazione è stato dimostrato in diversi tumori (Hoekstra et al. 2008). I nostri dati sull'assenza di FOXO1 in pazienti GEP-NET

scarsamente differenziati potrebbero, almeno in parte, spiegare la chemioresistenza osservata in questo gruppo di pazienti (Fazio & Milione 2016). La combinazione di strategie convenzionali implementate con l'espressione di miRNA e la valutazione istologica FOX1 può rappresentare un nuovo gold standard per la valutazione di GEP-NET. Inoltre, i miRNA rappresentano un obiettivo innovativo per il trattamento personalizzato di diverse malattie. I nostri dati dimostrano un ruolo importante e non segnalato dei miRNA come biomarcatore nella classificazione NET GEPs e suggeriscono ulteriori indagini per indirizzare i loro potenziali terapeutici. Il progetto si è concluso con la pubblicazione: **Cavalcanti Elisabetta, Vanessa Galleggiante, Sergio Coletta, Elisa Stasi, Marcello Chieppa, Raffaele Armentano and Grazia Serino. Altered miRNAs expression correlates with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades. Front. Oncol. 2020; | doi: 10.3389/fonc.2020.01187**

Infine, il progetto si è concluso con l'ottenimento del **Brevetto N. 10201700006936** per Uso della proteina PD-L1 come marcatore per le neoplasie neuroendocrine.

Publicazioni:

- 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.
- 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.
- 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.
- Iatrogenic Kaposi sarcoma of the terminal ileum following short-term treatment with immunomodulators for Crohn disease. STASI ELISA, De Santis Stefania, Cavalcanti Elisabetta, Armentano Raffaele. MEDICINE
- Cavalcanti Elisabetta, Vanessa Galleggiante, Sergio Coletta, Elisa Stasi, Marcello Chieppa, Raffaele Armentano, Grazia Serino. Altered miRNAs expression correlates with Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades. Front. Oncol. 2020; | doi: 10.3389/fonc.2020.01187

Progetto “Effetto dei composti naturali sull’infiammazione e carcinogenesi sperimentale in modelli animali di cac e crc”

Responsabile: dott. Mastronardi Mauro

Partecipanti: Dott.ssa Angela Tafaro, Dott.ssa Isabella Gigante, Dott.ssa Giusy Bianco, Tecnici : Vito Spilotro / Sergio Coletta

Background

L'incidenza dei tumori gastroenterici non è esclusivamente attribuibile alla “predisposizione genetica”, ma è associata anche allo stile di vita. Si stima infatti che il 30% di tutte le neoplasie sia direttamente ricollegabile all'alimentazione.

Lo studio dei principi attivi di origine alimentare fornisce dati meccanicistici e farmacologici utili per caratterizzare il potenziale chemiopreventivo di tali composti con finalità terapeutiche ad alto rischio di sviluppare patologie cancerose (pazienti con patologie infiammatorie, displasie in fase precoce e/o soggetti a recidiva di tumori trattati in precedenza). Tra questi, i soggetti con malattia infiammatoria intestinale (IBD), come il morbo di Crohn (CD) o Colite Ulcerosa (UC), hanno un rischio elevato di sviluppare il cancro del colon-retto rispetto ad individui sani. Questo rischio è proporzionale alla durata ed estensione della malattia, con un'incidenza cumulativa alta pari al 30% nei soggetti con UC estesa e con diffuso coinvolgimento del colon.

Molti composti naturali ad attività antiossidante e antinfiammatoria sono un potenziale bersaglio per nuove terapie contro le sindromi infiammatorie croniche. La somministrazione orale di integratori funzionali a base di erbe può diventare una strategia di prevenzione o un coadiuvante della terapia per i pazienti suscettibili. Le sostanze chemiopreventive

derivate dalla dieta sono numerose. Gli alimenti contengono molteplici composti bioattivi o classi di composti le cui modalità di azione a livello cellulare, nonché a livello biomolecolare, sono negli ultimi anni oggetto di studio. Attualmente, almeno 40 agenti, singolarmente o in combinazione, sono di interesse per valutazioni cliniche, per la loro potenziale azione in svariati tumori inclusi tumori al fegato, al seno, alla prostata, al colon e al polmone. Tra questi composti vi sono i polifenoli di tè verde e nero, gli isoflavoni di soia, la curcumina, il licopene, la vitamina D, la vitamina E, il selenio ed il calcio.

In tale progetto sperimentale ci siamo occupati di valutare in vitro l'effetto della curcumina (CUR), nota per le sue proprietà antiossidanti, combinata con un estratto ottenuto dalle foglie dell'ulivo (OLE) della cultivar Coratina, e successivamente la nostra attenzione si è focalizzata sullo studio dell'azione combinata dei curcuminoidi e dell'oleuropeina, utilizzati per la prima volta in modo sinergico per studi di chemioprevenzione primaria in topi in cui viene indotto il *cancro del colon retto associato alla colite* (CAC).

La curcumina [1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione], è il principale principio attivo della spezia curcumina, viene isolata dai rizomi di una pianta della famiglia dello zenzero, la *Curcuma longa*. In commercio la disponibilità di estratti della *Curcuma longa* sono numerosi. Come dimostrato, la curcumina se coniugata con la lecitina di soia sottoforma di "phytosome" è maggiormente captabile a livello cellulare, per cui, in questo studio abbiamo utilizzato la CURCUMA-FITOSOMA della MERIVA INDENA, che aumenta di 30 volte l'assorbimento orale dei curcuminoidi in essa contenuti.

Studi degli ultimi due anni, hanno dimostrato che l'oleuropeina, il polifenolo principalmente presente nelle foglie di ulivo, inibisce la proliferazione e induce l'apoptosi in differenti linee di cellule tumorali. L'oleuropeina è un composto fenolico al quale si attribuiscono molte delle proprietà benefiche farmacologiche dell'olio di oliva o delle sue foglie. Dati di letterature dimostrano come l'utilizzo di "estratti di foglie di Ulivo" migliori la qualità dell'olio d'oliva vergine nel contenuto in tocoferolo, carotenoide e clorofilla. Inoltre, nei territori Pugliesi l'aumento della produzione di olio d'oliva, va di pari passo con l'aumento della quantità di sottoprodotti di olio d'oliva, che possono causare problemi ambientali. Pertanto, sono necessari nuovi modi per utilizzare i sottoprodotti. Ed occorre studiarne i loro effetti benefici sulla salute dell'uomo.

Poiché vari mediatori e citochine proinfiammatorie sono coinvolti nella patogenesi del cancro del colon retto la soppressione delle citochine proinfiammatorie rappresenta una strategia interessante per il trattamento del tumore al colon associato all'infiammazione. L'infiltrazione di neutrofili e altre cellule immunitarie che accompagnano l'infiammazione danneggia il tessuto colico e può innescare cambiamenti nella mucosa del colon che facilitano la progressione della displasia di basso grado e della displasia di alto grado e, infine, del carcinoma. Infatti le displasie del colon che potenzialmente conducono alle CAC si ritiene si sviluppino in seguito a ripetuti cicli di lesioni delle cellule epiteliali e di riparazione delle stesse, sotto l'azione di numerose citochine infiammatorie.

Il momento critico in cui spontaneamente la colite diventa adenocarcinoma non è monitorabile nell'uomo, dati i molteplici eventi molecolari sottostanti che potrebbero esserne la causa. Questa variabilità sostiene la necessità di specifici modelli animali di CAC.

Un agente genotossico, l'azossimetano (azoxymethane:AOM) e un agente proinfiammatorio, destrano solfato di sodio (DSS), sono utilizzati per produrre un modello validato di cancro colon rettale *in vivo* associato all'infiammazione. Gli animali trattati con questi agenti chimici sviluppano tumori con alterazioni istologiche e molecolari molto simili a quelle che si verificano in CAC umana, garantendoci un modello di grande valore per studi di chemioprevenzione.

Lavorando su colon murino e non umano è stato possibile asportare l'intero colon e notare anche variazioni significative, nei gruppi sperimentali, sul rapporto tra la misura della sua lunghezza e tra la misura del peso della mucosa colica nonché variazioni istologiche confrontando i tratti di colon prossimale, mediale, distale.

Obiettivo dello studio

Un corretto regime nutrizionale può rappresentare una strategia promettente per prevenire l'insorgenza di molte patologie cancerose. Il presente studio ha lo scopo di valutare gli effetti chemiopreventivi dell'uso sinergico di sostanze naturali di origine alimentare, quali la curcumina e composti fenolici contenuti nelle foglie di ulivo, sulla carcinogenesi del colon, con l'impiego di un modello di cancro coloretale indotto chimicamente in topi wild-type (topi che svilupperanno CAC: Carcinogenesi Associata alla Colite). L'utilizzo di estratti fenolici dalle foglie dell'ulivo è inoltre un valore aggiunto ecosostenibile, nell'ottica di recuperare il contenuto fenolico delle piante di ulivo del nostro territorio e poterlo utilizzare per la prevenzione di patologie gastrointestinali umane.

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.

Materiali e metodi

Come modello sperimentale *in vitro* sono state utilizzate le cellule umane di colon Caco-2.

Tra i modelli *in vivo* utilizzati per lo studio del CAC, abbiamo scelto quello murino ottenuto dalla somministrazione combinata di solfato di sodio destrano (DSS) con azossimetano 1,2-dimetilidrazina (AOM) che risulta attualmente il più versatile e standardizzato e validato nel nostro stabulario. Il mangime modificato avrà la stessa composizione del mangime della dieta standard AIN93M con la differenza che questo mangime (direttamente in formato di pellet e preparato dalla stessa azienda Mucedola Srl) sarà supplementato con il 2% di curcumina (dieta CUR) e/o lo 0.25% di oleuropeina (dieta OLE), o arricchita con entrambi i composti naturali (dieta OLE + CUR). Tutte le diete saranno isocaloriche tra di loro. Sono stati utilizzati 80 topi C57BL/6J di sesso sia maschile sia femminile ottenuti dal breeding/ allevamento presso lo stabulario dell'ENTE.

ALLEVAMENTO

Le coppie in allevamento sono state 3. Per ogni gabbia abbiamo sistemato: 1 maschio C57BL/6 con 2 Femmine C57BL/6. I neonati sono stati svezzati alla 4° settimana di vita, e sono stati identificati in modo univoco mediante tag con orecchino metallico e sistemati nelle gabbie in base alle nascite, in modo random, dividendo i maschi dalle femmine, e per un numero massimo di 5 animali per gabbia.

UNITA' SPERIMENTALI

Abbiamo sostituito il mangime standard con il mangime *speciale in due tempi*, per essere sicuri che i supplementi alimentari funzionino da agenti chemio preventivi. Il tempo di somministrazione di tutte le diete sarà di 10 settimane:

- 1) mangime speciale lo stesso giorno della iniezione i.p. di AOM
- 2) mangime speciale 14 giorni prima della iniezione i.p. di AOM

Durante tutta la sperimentazione i topi sono stati stabulati in condizioni standard di umidità e temperatura, con cicli diurni e notturni 12h/12h, ed hanno ricevuto cibo e acqua ad libitum. Ogni settimana è stato valutato il benessere animale compilando la scheda per lo *score* del grado di sofferenza e sono stati monitorati i pesi degli animali e l'intake di cibo.




Risultati per la 3° annualità del progetto

I primi due anni di sperimentazione per tale progetto sono stati incentrati sulle indagini *in vitro* con cellule umane di carcinoma del cancro del colon ed i risultati rendicontati. La parte esecutiva sui modelli murini ha riportato nel terzo anno dei ritardi di 3-4 mesi causa emergenza Covid-19. I sacrifici finali di tutti gli animali dei diversi gruppi sperimentali sono avvenuti nel mese scorso, le indagini di laboratorio sono parziali e/o ancora in atto per cui non è possibile dare informazioni validate sui risultati finali *in vivo*.

Il livello intracellulare dei ROS *in vitro* è stato misurato con l'utilizzo di una sonda fluorescente nota come dihydrorhodamine-123 (10µM). La sonda dihydrorhodamine-123, in condizioni neutre, non è fluorescente; la sua fluorescenza aumenta quando è ossidata in presenza di specie reattive. Analizzando i dati rispetto alla condizione tBHP, si può osservare che la curcumina ha un effetto antiossidante a tutte e tre le condizioni utilizzate. Sono stati condotti esperimenti analoghi per valutare il potere antiossidante dell'estratto ottenuto dalle foglie d'ulivo. In particolare, le cellule sono state trattate O/N a concentrazioni crescenti di OLE (0,001mg/ml, 0,01mg/ml, 0,1mg/ml).

Dall'analisi integrata di tutte le condizioni (fig.) si osserva che la curcumina 10µM e l'OLE 0,1mg/ml, hanno un effetto combinato statisticamente significativo rispetto ai singoli trattamenti.

Il modello murino AOM/DSS è stato rappresentativo per il nostro studio ed ha mimato la patologia del Carcinoma ColoRettaile associato ad infiammazione che si sviluppa nell'uomo. Alla 10° settimane di sperimentazione le osservazioni macroscopiche sui tessuti di colon, i giorni dei sacrifici degli animali, hanno evidenziato la presenza di neoplasie a livello di colon mediale e colon distale, con mucosa ispessita lungo tutto il tratto del colon. Il numero dei polipi ed il loro volume è risultato maggiore nei topi alimentati con lo standard verso quelli alimentati con le diete supplementate con curcumina, ole, e ole+ cur.

| Colon topo -STD | Colon topo- CUR | Colon topo - CUR+OLE |
|---|--|---|
|  |  |  |

Al sacrificio, è stato asportato il colon, ne è stata misurata la sua lunghezza ed il peso, è stato pulito (dalle feci) e tagliato lungo l'asse longitudinale e conservato in formalina per le indagini istologiche

per determinare lo score di displasia. Il restante tessuto di colon è stato campionato e congelato a -80°C per indagini con Western Blot. Per meglio comprendere i pathway attivati dalla curcuma e dall'OLE, ci proponiamo di valutare gli stessi marcatori utilizzati in vitro per valutare stress ossidativo e segnali pre-apoptotici, tramite analisi dei livelli di espressione di: p53 e del suo modulatore MDM2 / p-p53 / NF-kB / p38-MAPK / COX-2 / Caspasi-3.

Per valutare l'effetto dei composti naturali sul modello di CAC e confrontare tra loro i gruppi sperimentali è stato effettuato un prelievo di sangue dalla vena orbitale oculare, previo anestetico locale, a tre tempi: il tempo zero (prima della siringa i.p. di AOM), al tempo T1 (dopo 4 settimane dalla siringa di i.p.) al tempo T2 (il giorno del sacrificio). Sul siero effettueremo il duo-set-kit ELISA per dosare alcuni indici di infiammazione intestinale, quali CX-L1-KC e Lipocalina.

Publicazioni:

- 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.
- A Specific Mutation in Muc2 Determines Early Dysbiosis in Colitis-Prone Winnie Mice
- Quercetin-Induced miR-369-3p Suppresses Chronic Inflammatory Response Targeting C/EBP-beta
- Safety and efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs to reduce ileus after colorectal surgery
- Iron Overload Mimicking Conditions Skews Bone Marrow Dendritic Cells Differentiation into MHCII^{low}CD11c⁺CD11b⁺F4/80⁺ Cells G Verna, M Liso, S De Santis, M Dicarolo, E Cavalcanti, A Crovace, A Sila, P Campiglia, A Santino, A Lippolis, G Serino, A Fasano, M Chieppa *International Journal of Molecular Science*
- Role of microRNAs in the regulation of dendritic cell generation and function V. Scalavino, M. Liso, G. Serino. *International Journal of Molecular Science*
- A Specific Mutation in Muc2 Determines Early Dysbiosis in Colitis-Prone Winnie Mice "M Liso, S De Santis, G Verna, M Dicarolo, M Calasso, A Santino, I Gigante, R Eri, S Raveenthiraraj,
- A Sobolewski, V Palmitessa, A Lippolis, M Mastronardi, R Armentano, G Serino, M De Angelis and M Chieppa" *Inflamm Bowel Disease*.
- Winnie-APC^{Min/+} mice: a spontaneous model of colitis-associated colorectal cancer combining genetics and inflammation. S De Santis, G Verna, G Serino, R Armentano, E Cavalcanti, M Liso, M Dicarolo, S Coletta, M Mastronardi, A Lippolis, A Tafaro, A Santino, A Pinto, P Campiglia, AY Huang, F Cominelli, TT Pizarro, M Chieppa. *International Journal of Molecular Science*
- miR-369-3p modulates inducible nitric oxide synthase and is involved in regulation of chronic inflammatory response. Serino et al. *Scientific Reports*
- Remote Monitoring Empowerment of Patients with IBDs during the SARS-CoV-2 pandemic. M Mastronardi, M Curlo, M Polignano, N Vena, D Rossi, G Giannelli. *Healthcare*.

Progetto 19/2019: "Studio degli effetti di polifenoli estratti da due varietà di uva sul profilo lipidomico cellulare e sulle diverse frazioni delle LDL sieriche; possibili applicazioni nella sindrome metabolica"

Responsabile Scientifico: dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: Valeria Tutino, Isabella Gigante, Valentina De Nunzio, Maria Gabriella Caruso, Nicola Veronese, Francesco Russo, Antonella Orlando, Rosa Anna Milella (collaboratore esterno)

Background

L'alimentazione occupa un ruolo centrale nel contrastare le malattie legate al metabolismo e la Dieta Mediterranea si pone in prima fila come un modello equilibrato di alimentazione, capace di prevenire l'insorgenza della sindrome metabolica [1], una condizione caratterizzata dalla coesistenza di diversi fattori di rischio (obesità, ipertensione, ipercolesterolemia, insulino-resistenza) che predispongono a malattie cardiovascolari e al diabete. Diete come quella Mediterranea, ricche di polifenoli (flavonoidi e non flavonoidi), sono in grado di esercitare un'elevata azione anti-infiammatoria, antitrombotica ed antiproliferativa. Tra la frutta con un elevato contenuto di polifenoli ritroviamo l'uva, importante pilastro della Dieta Mediterranea, la cui produzione si concentra prevalentemente nella regione Puglia e che fa dell'Italia uno dei principali produttori di uva da tavola al mondo. Numerosi sono gli studi che dimostrano come i polifenoli dell'uva esercitano un'importante azione di protezione dall'insorgenza delle malattie cardiovascolari, neurodegenerative e dal cancro [2]. Poche informazioni si hanno invece sugli effetti sulla salute derivanti dal consumo di uva da tavola.

Per molto tempo gli effetti benefici dei polifenoli sulla salute sono stati attribuiti esclusivamente alla loro azione antiossidante diretta, tuttavia, negli ultimi anni è emerso che i polifenoli possono interagire con i meccanismi di segnalazione intracellulare, possono modulare l'attività dei fattori di trascrizione e conseguentemente influenzare l'espressione dei geni. I polifenoli assunti con la dieta sono in grado di influenzare la composizione degli acidi grassi contenuti nelle membrane cellulari [3,4], suggerendo che lo studio delle molecole lipidiche nelle membrane cellulari (analisi lipidomica) può essere considerato un valido approccio per valutare lo stato nutrizionale di un individuo.

Inoltre, poiché un ruolo importante nell'insorgenza di malattie dismetaboliche viene sicuramente svolto dai livelli sierici delle diverse frazioni delle Lipoproteine a Bassa Densità (LDL), la presenza, nel siero, delle frazioni più piccole delle LDL, come la frazione 3 e la frazione 4, è stata spesso associata all'insorgenza di patologie cardiovascolari e all'infarto del miocardio [5,6].

Obiettivi dello studio:

Il principale obiettivo dello studio è valutare gli effetti di una miscela di polifenoli estratti da 2 varietà di uva da tavola sul profilo lipidomico di membrana e sui livelli delle diverse frazioni di LDL, e di comprendere i meccanismi molecolari che sostengono gli effetti salutistici dell'uva da tavola.

Risultati

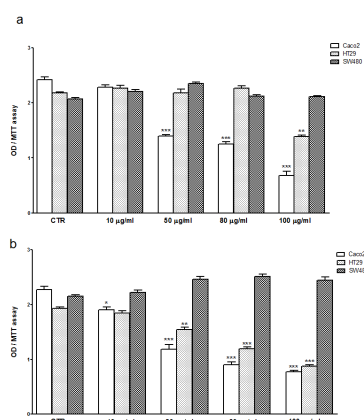
Studio in vitro: Lo studio *in vitro* ha permesso di valutare gli effetti anti-infiammatori ed anti-proliferativi di una miscela di polifenoli, estratti da 2 varietà di uva da tavola, su 3 linee cellulari umane a diverso grado di differenziazione. Inoltre, sulle cellule trattate con gli estratti polifenolici dell'uva, è stata effettuata l'analisi lipidomica delle membrane cellulari.

Nel corso del 2019, primo anno del progetto, è stata effettuata la caratterizzazione degli estratti delle 2 varietà di uva, l'Autumn Royal e l'Egnatia e in seguito sono state studiate le loro capacità antiossidante, anti-proliferativa e anti-infiammatoria.

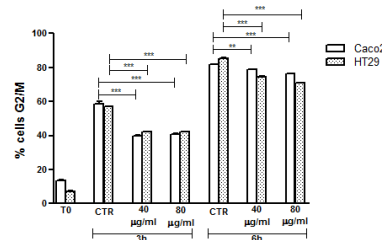
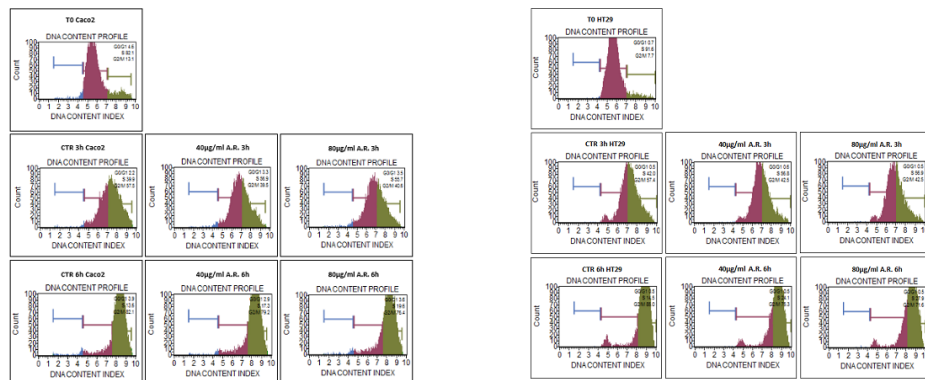
La tabella mostra i polifenoli estratti, le loro concentrazioni e la capacità antiossidante totale della miscela di polifenoli delle 2 varietà di uva.

| | Autumn Royal | Egnatia |
|--------------------------------|--------------|----------------|
| TPC(mg GAE/g dw) | 63.17 ± 1.97 | 46.21 ± 1.46* |
| Df3G | 1.12 ± 0.03 | 0.33 ± 0.02 * |
| Cy3G | 0.26 ± 0.01 | 0.09 ± 0.001 * |
| Pt3G | 1.31 ± 0.03 | 0.57 ± 0.04 * |
| Pn3G | 1.68 ± 0.05 | 1.75 ± 0.05 |
| Mv3G | 11.06 ± 0.22 | 6.36 ± 0.19 * |
| Mv3-coumaroyl-G | 5.54 ± 0.16 | 4.03 ± 0.12 * |
| Mv3G EQ1 | 0.38 ± 0.03 | 0.21 ± 0.01 * |
| Mv3G EQ2 | 0.62 ± 0.05 | 0.48 ± 0.03 |
| Mv3G EQ3 | 0.63 ± 0.05 | 0.75 ± 0.06 |
| ∑ Anthocyanins (mg Mv EQ/g dw) | 22.63 ± 0.68 | 14.57 ± 0.44 * |
| Flavonols(mg querc EQ/g dw) | 1.78 ± 0.05 | 0.28 ± 0.02 * |
| Flavanols (mg cat EQ/g dw) | 3.58 ± 0.11 | 2.44 ± 0.07 * |
| DPPH(μM TE /g dw) | 241.7 ± 7.7 | 133.2 ± 6.4* |
| ABTS (μM TE /g dw) | 610.5 ± 5.2 | 298.3 ± 3.7* |
| ORAC (μM TE /g dw) | 602.9 ± 21.5 | 399.4 ± 33.8* |

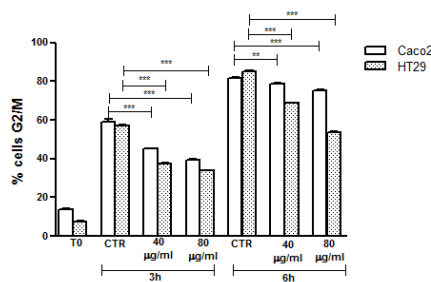
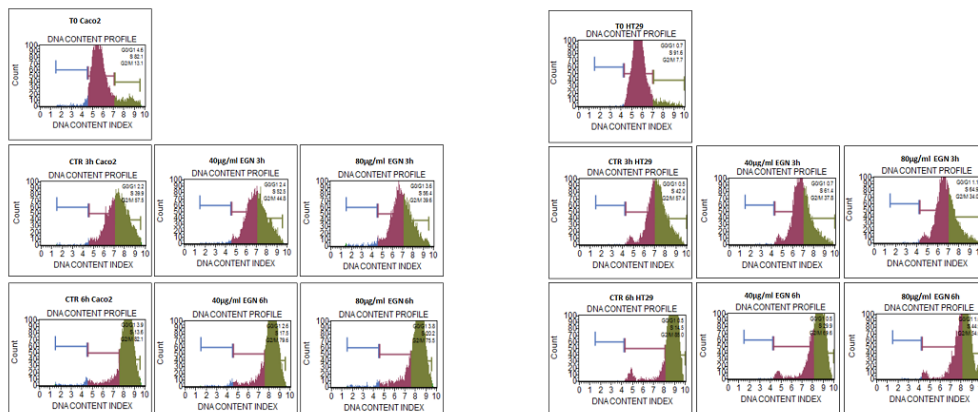
La varietà Autumn Royal ha mostrato una più alta capacità antiossidante rispetto all'Egnatia, mentre quest'ultima ha mostrato una maggiore attività antiproliferativa, in particolare con la linea cellulare Caco2. Nella figura seguente, Panel a: MTT con Autumn Royal e Panel b: MTT con Egnatia.



Sono stati anche studiati gli effetti dei 2 estratti polifenolici sul ciclo cellulare delle cellule trattate:
Autumn Royal



Egnatia



Entrambi gli estratti polifenolici erano in grado di influenzare il ciclo cellulare, bloccando le cellule in fase S del ciclo.

Le cellule trattate con gli estratti polifenolici di Autumn Royal e Egnatia sono state sottoposte ad analisi lipidomica. La tabella che segue mostra la media percentuale degli acidi grassi ritrovati nelle membrane delle cellule Caco2 (panel A) e SW480(panel B) trattate per 48 ore con le due varietà di uva alle concentrazioni di 20, 50, and 80 µg/ml

Tabella

a

| Caco2 | | Autumn Royal | | | Egnatia | | |
|---|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fatty Acids (%) | CTR | 20 µg/ml | 50 µg/ml | 80 µg/ml | 20 µg/ml | 50 µg/ml | 80 µg/ml |
| Palmitic acid (C16:0) | 25.57±1.13 | 26.22±0.48 | 26.24±0.46 | 27.29±0.42* | 27.57±0.40* | 28.91±0.33* | 27.19±0.45* |
| Stearic acid (C18:0) | 12.98±1.72 | 13.54±0.54 | 14.73±0.80* | 16.59±0.63* | 16.08±0.84* | 19.32±0.49* | 19.77±0.69* |
| Palmitoleic acid (C16:1n7) | 20.67±1.59 | 19.23±0.31* | 18.67±0.48* | 16.41±0.44* | 15.90±0.67* | 15.08±0.74* | 11.66±0.58* |
| Oleic acid (C18:1n9) | 17.10±0.68 | 15.79±0.70* | 14.59±0.56* | 14.29±0.75* | 15.26±0.41* | 14.50±0.61* | 13.65±0.47* |
| Saturated fatty acids (SFAs) | 42.62±2.52 | 43.01±0.71 | 45.07±0.10* | 48.25±0.30* | 46.22±0.78* | 52.31±0.57* | 50.71±0.69* |
| Monounsaturated fatty acids (MUFAs) | 43.66±2.47 | 40.92±0.64* | 41.59±0.67* | 36.27±0.58* | 37.38±0.99* | 33.30±0.49* | 30.30±0.68* |
| Palmitoleic acid/Palmitic acid ratio (SCD1) | 0.81±0.09 | 0.73±0.02* | 0.71±0.02* | 0.60±0.01* | 0.57±0.02* | 0.52±0.02* | 0.43±0.02* |
| Oleic acid/Stearic acid ratio (SCD1) | 1.34±0.21 | 1.16±0.09* | 0.99±0.06* | 0.86±0.07* | 0.95±0.08* | 0.75±0.03* | 0.69±0.04* |
| Total SCD1 | 1.07±0.31 | 0.95±0.23 | 0.85±0.15* | 0.73±0.14* | 0.76±0.20* | 0.63±0.12* | 0.56±0.14* |

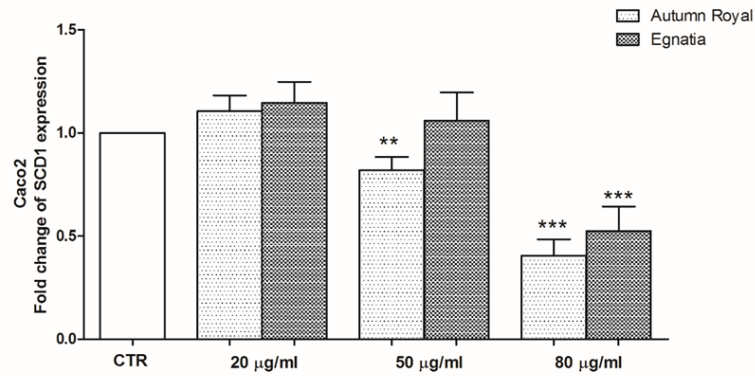
b

| SW480 | | Autumn Royal | | | Egnatia | | |
|---|------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fatty Acids (%) | CTR | 20 µg/ml | 50 µg/ml | 80 µg/ml | 20 µg/ml | 50 µg/ml | 80 µg/ml |
| Palmitic acid (C16:0) | 24.64±0.54 | 24.15±0.32 | 26.44±0.36* | 26.82±0.24* | 25.15±0.28 | 24.49±0.85 | 24.53±0.54 |
| Stearic acid (C18:0) | 13.73±2.48 | 15.03±2.49 | 14.97±2.49 | 18.09±1.58* | 14.32±2.17 | 16.61±0.48* | 17.29±0.76* |
| Palmitoleic acid (C16:1n7) | 5.42±1.06 | 4.63±1.18 | 4.96±1.18 | 4.99±1.01 | 4.74±1.16 | 4.81±1.72 | 4.47±1.78 |
| Oleic acid (C18:1n9) | 24.13±1.55 | 23.06±0.53 | 21.93±0.39* | 20.52±2.01* | 23.89±0.65 | 23.67±0.67 | 20.67±1.96* |
| Saturated fatty acids (SFAs) | 43.48±0.99 | 44.87±0.66* | 47.14±0.64* | 48.80±0.41* | 42.86±0.30 | 43.60±0.65 | 45.42±0.48* |
| Monounsaturated fatty acids (MUFAs) | 40.05±2.44 | 38.17±0.34 | 34.34±0.69* | 32.61±0.58* | 39.15±0.63 | 37.34±0.98* | 36.37±1.46* |
| Palmitoleic acid/Palmitic acid ratio (SCD1) | 0.22±0.04 | 0.19±0.04 | 0.19±0.04 | 0.18±0.03 | 0.18±0.04 | 0.19±0.07 | 0.18±0.07 |
| Oleic acid/Stearic acid ratio (SCD1) | 1.81±0.39 | 1.58±0.32 | 1.50±0.31 | 1.16±0.06* | 1.71±0.37 | 1.42±0.07 | 1.21±0.10* |
| Total SCD1 | 1.02±0.86 | 0.88±0.75 | 0.84±0.72 | 0.66±0.50 | 0.95±0.83 | 0.81±0.64 | 0.68±0.53 |

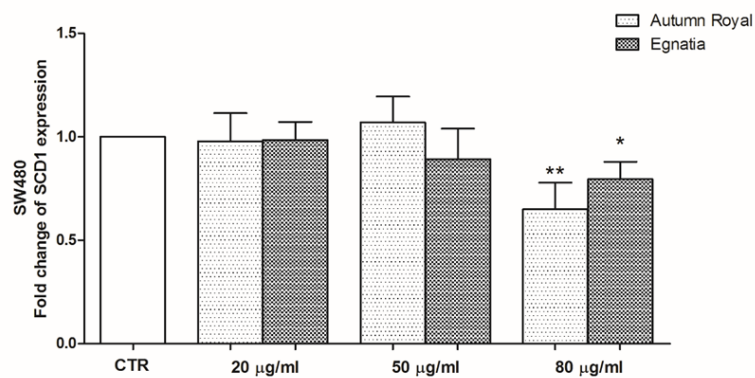
Mean value ± Standard Deviation (SD) of three consecutive experiments. P-value was determined by ANOVA with Dunnett's post-test. *P<0.05 versus the control group (CTR).

I dati del profilo lipidomico di membrana mostrano che i polifenoli estratti dalle 2 varietà di uva sono in grado di influenzare la fluidità della membrana delle cellule, che viene regolata dall'enzima Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1). Il trattamento con gli estratti portava ad una riduzione dei livelli dell'enzima SCD1, sia nelle Caco2 (panel a) che nelle SW480 (panel b)

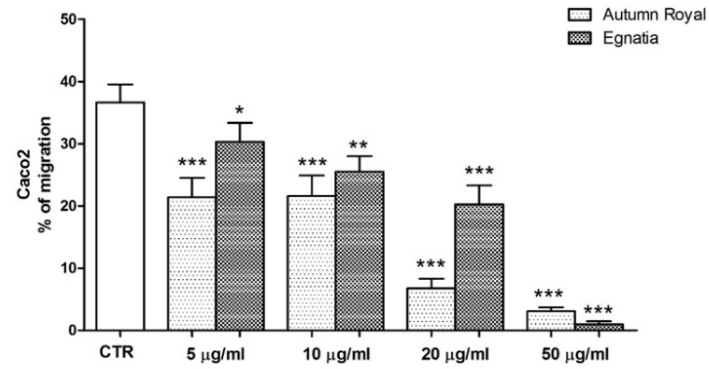
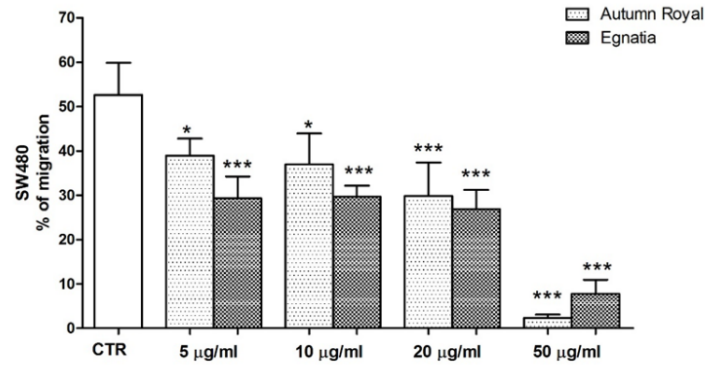
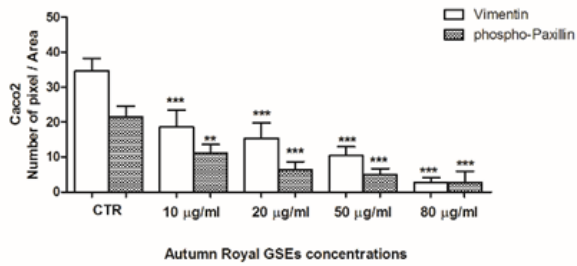
a



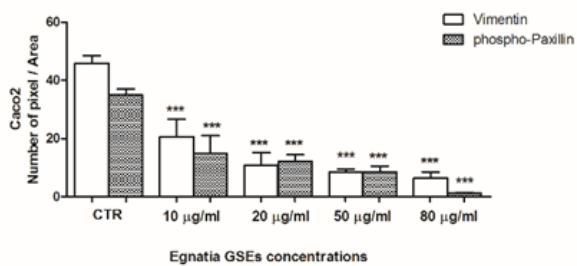
b



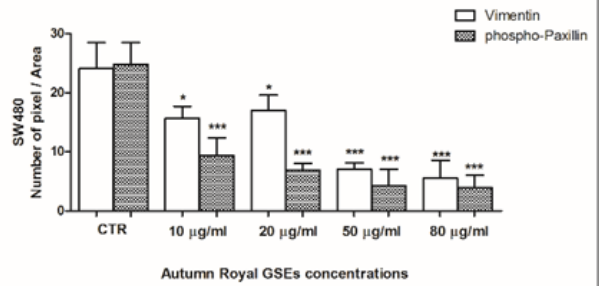
Le figure che seguono mostrano che entrambi gli estratti d'uva inibivano la migrazione cellulare e questa inibizione era associata alla riduzione dei livelli delle proteine coinvolte nella riorganizzazione del citoscheletro (Vimentina e fosfo-Paxillina).

a**b****a**

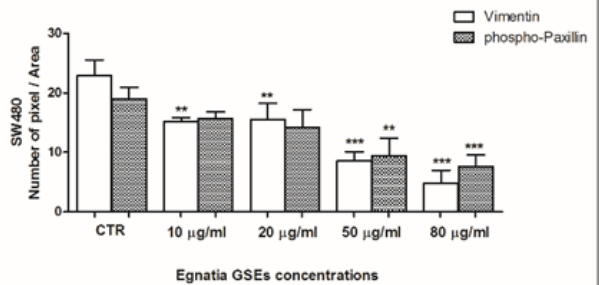
Autumn Royal GSEs concentrations



Egnatia GSEs concentrations

b

Autumn Royal GSEs concentrations



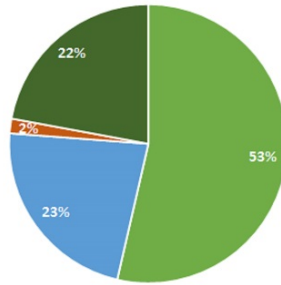
Egnatia GSEs concentrations

NON-FLAVONOIDS

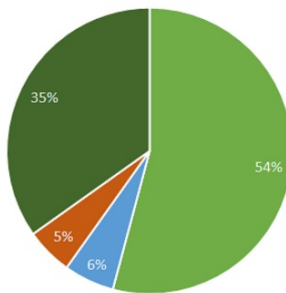
| Phenolic acids |
|--|
| shikimic acid, methyl gallic acid_isomer 1, methyl gallic acid_isomer 2, 5-hydroxyferulic acid, dihydroxybenzoic acid glucoside, hydroxybenzoic acid glucoside, feruloyltartaric acid, vanillic acid, glucoside, gallic acid glucoside, ferulic acid glucoside, syringic acid glucoside, <i>cis-p</i> -coumaroyltartaric acid, <i>trans-p</i> -coumaroyltartaric acid, <i>trans</i> -caffeoyltartaric acid |

| Stilbenes |
|--|
| <i>trans</i> -resveratrol, piceatannol, <i>cis</i> -piceid, <i>trans</i> -piceid, <i>E</i> -astringin, <i>Z</i> -astringin, pallidol, resveratrol dimer, <i>Z</i> - <i>e</i> -viniferin, <i>Z</i> - <i>ω</i> -viniferin, <i>E</i> - <i>e</i> -viniferin, <i>d</i> -viniferin, pallidol-3- <i>O</i> -glucoside, <i>a</i> -viniferin, <i>Z</i> -miyabenol C, <i>E</i> -miyabenol C, resveratrol tetramer 1, (H-ampelopsin/isohopeaphenol/vaticanol C/vitisin B), resveratrol tetramer 2, (H-ampelopsin/isohopeaphenol/vaticanol C) |

Autumn Royal



Egnatia



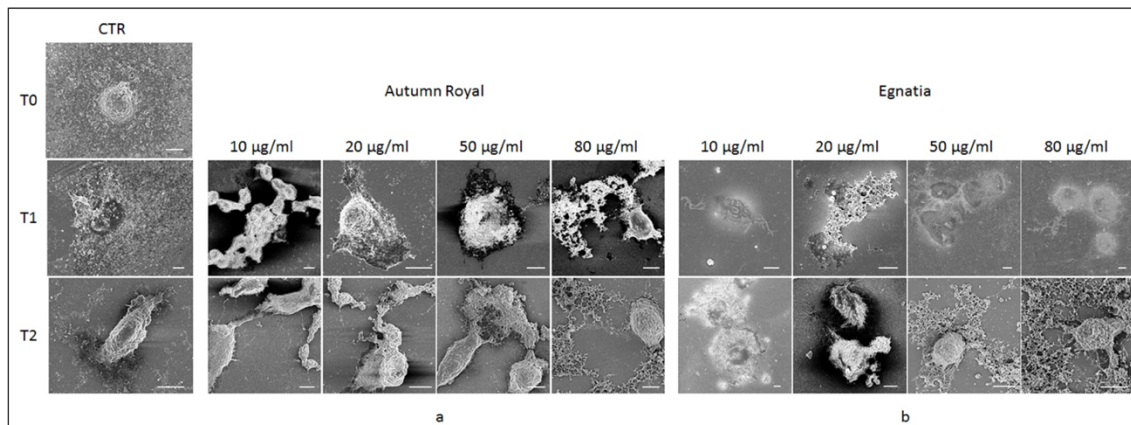
FLAVONOIDS

| Flavonols & Flavanonols |
|---|
| Kaempferol, quercetin, isorhamnetin, myricetin, syringetin, quercetin-pentoside, taxifolin-pentoside, kaempferol-3- <i>O</i> -galactoside, kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside, dihydroquercetin-3- <i>O</i> -rhamnoside, tetrahydroxyflavanone-hexoside 1, tetrahydroxyflavanone-hexoside 2, kaempferol-3- <i>O</i> -glucuronide, quercetin-3- <i>O</i> -galactoside, quercetin-3- <i>O</i> -glucoside, quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide, isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside, myricetin-3- <i>O</i> -glucoside, myricetin-3- <i>O</i> -glucuronide, laricitrin-3- <i>O</i> -glucoside, laricitrin-glucuronide, syringetin-3- <i>O</i> -glucoside, tetrahydroxydimethoxyflavanone-hexoside, rutin (quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside), isorhamnetin <i>p</i> -coumaroylglucoside, isorhamnetin <i>p</i> -coumaroylglucoside, quercetin-diglucoside, dihydroquercetin- <i>O</i> -hexoside 1, dihydroquercetin- <i>O</i> -hexoside 2 |

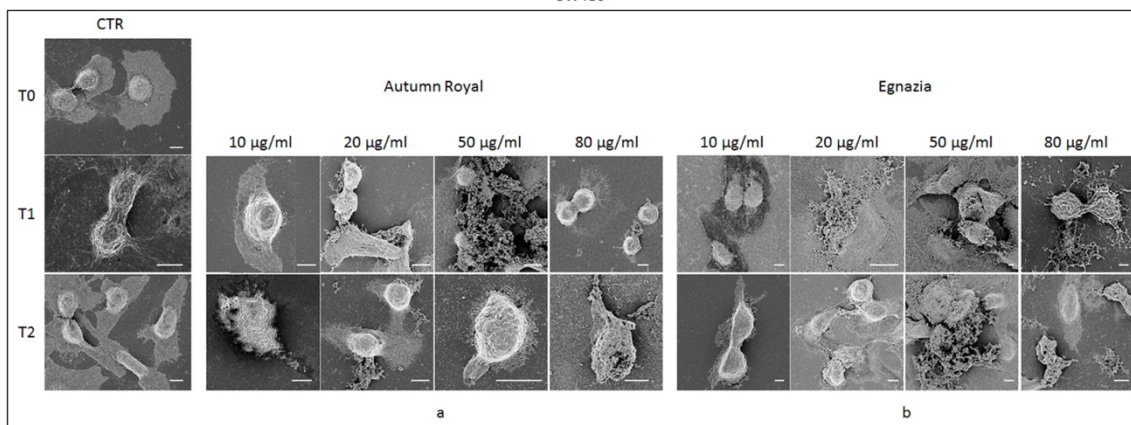
| Flavan-3-ols & Proanthocyanidins |
|---|
| (-)-epicatechin, (+)-catechin, (epi)gallocatechin isomer, (-)-epicatechin gallate, procyanidin B3/B4/B5, procyanidin B1, procyanidin B2, (epi)gallocatechin-catechin 1, (epi)gallocatechin-catechin 2, procyanidin T2, T3 (T4), C1_A, procyanidin T2, T3 (T4), C1_B, procyanidin T2, T3 (T4), C1_C, prodelphinidin T2, T3_A, prodelphinidin T2, T3_B, prodelphinidin T1 |

Nell'ambito dello studio *in vitro*, le due linee cellulari CaCo2 e SW480, trattate con concentrazioni crescenti di Autumn Royal ed Egnatia, per 24 (T1) e 48 (T2) ore, sono state analizzate con il FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope). Rispetto alle cellule controllo (CTR), le cellule trattate con la varietà Autumn Royal, mostravano cambiamenti nella morfologia, sia a livello citoplasmatico che nucleare. Questi effetti erano presenti anche a basse concentrazioni di estratto ed erano evidenti in entrambe le linee cellulari studiate. Per la varietà Egnatia, erano necessarie concentrazioni più alte per osservare le stesse alterazioni morfologiche su entrambe le linee cellulari. Nelle figure seguenti è possibile osservare chiari segni di apoptosi indotti dagli estratti, in particolare si possono apprezzare i cambiamenti morfologici sulla membrana plasmatica.

Caco2



SW480



Studio clinico

Per quanto riguarda lo studio clinico previsto dal progetto, da settembre a dicembre 2019 sono stati reclutati 40 soggetti, randomizzati in due gruppi, di cui un gruppo controllo, che riceveva solo consigli dietetici, e un gruppo di trattamento a cui veniva somministrata uva (varietà Autumn Royal 5g per kg di peso corporeo). Il trattamento con uva durava 3 settimane.

Nel corso del 2020 e 2021, (seconda e terza annualità del Progetto) saranno effettuate le analisi lipidomiche, nonché lo studio del pattern sierico delle LDL e tutte le indagini molecolari finalizzate allo studio dei miRNA plasmatici e dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e nei processi infiammatori.

La tabella che segue mostra le caratteristiche cliniche dei soggetti arruolati nel trial clinico valutate a T0, a T1 (dopo 3 settimane) e a T2 (dopo 3 settimane dalla fine del trattamento)

Tabella

| | Soggetti (n=40) | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| | Controllo (n=20) | Trattamento (n=20) |
| Sesso | | |
| Maschio | 4 | 8 |
| Femmina | 16 | 12 |
| Età (mean ± SD) | 43.53±10.14 | 47.19±10.48 |
| Glicemia(mean ± SD) | | |
| T0 | 80.84±6.39 | 80.84±6.39 |
| T1 | 83.67±7.49 | 80.18±5.98 |
| T2 | 80.00±9.81 | 77.41±10.67 |
| AST(mean ± SD) | | |
| T0 | 19.00±4.15 | 19.00±4.15 |
| T1 | 18.60±6.50 | 18.59±3.65 |
| T2 | 19.07±4.33 | 19.71±5.64 |
| ALT (mean ± SD) | | |
| T0 | 20.06±8.78 | 20.06±8.78 |
| T1 | 21.87±11.03 | 19.59±6.74 |
| T2 | 19.93±7.96 | 18.53±7.19 |
| Gamma-GT (mean ± SD) | | |
| T0 | 17.41±8.93 | 17.41±8.93 |
| T1 | 15.80±7.99 | 15.94±6.60 |
| T2 | 15.47±7.68 | 14.65±6.65 |
| Colesterolo (mean ± SD) | | |
| T0 | 195.0±35.35 | 195.0±35.35 |
| T1 | 182.1±27.93 | 193.5±36.92 |
| T2 | 188.9±33.96 | 198.8±41.85 |
| HDL (mean ± SD) | | |
| T0 | 54.09±12.12 | 54.09±12.12 |
| T1 | 51.40±10.62 | 55.29±11.79 |
| T2 | 51.33±11.60 | 54.88±13.13 |
| LDL (mean ± SD) | | |
| T0 | 123.1±29.74 | 123.1±29.74 |
| T1 | 115.1±23.65 | 124.7±36.27 |
| T2 | 123.1±27.33 | 127.7±37.74 |
| Trigliceridi (mean ± SD) | | |
| T0 | 89.06±68.90 | 89.06±68.90 |

| | | |
|-------------------|-------------|-------------|
| <i>T1</i> | 76.00±36.03 | 67.35±25.49 |
| <i>T2</i> | 72.53±45.29 | 81.06±49.53 |
| PCR-r (mean ± SD) | | |
| <i>T0</i> | 0.14±0.26 | 0.14±0.26 |
| <i>T1</i> | 0.13±0.36 | 0.30±0.76 |
| <i>T2</i> | 0.24±0.67 | 0.10±0.26 |

Lavori scientifici pubblicati nell'ambito del Progetto n° 19:

- 1) TUTINO V, GIGANTE I, SCAVO MP, REFOLO MG, DE NUNZIO V, MILELLA RA, CARUSO MG, NOTARNICOLA M. Stearoyl-CoA desaturase-1 enzyme inhibition by grape skin extracts affects membrane fluidity in human colon cancer cell lines. *Nutrients* 2020; 12(3),693
- 2) GIGANTE I, MILELLA RA, TUTINO V, DEBIASE G, NOTARANGELO L, GIANNANDREA MA, DE NUNZIO V, ORLANDO A, D'ALESSANDRO R, CARUSO MG, NOTARNICOLA M. Autumn Royal and Egnatia grape extracts differently modulate cell proliferation in human colorectal cancer cells. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2020 Apr 20. doi: 10.2174/1871530320666200421102418
- 3) TUTINO V, GIGANTE I, MILELLA RA, DE NUNZIO V, FLAMINI R, DE ROSSO M, SCAVO MP, DEPALO N, FANIZZA E, CARUSO MG, NOTARNICOLA M. Flavonoid and non-flavonoid compounds of Autumn Royal and Egnatia grape skin extracts affect membrane PUFA's profile and cell morphology in human colon cancer cell lines. *Molecules*. 2020 Jul 23;25(15):3352. doi: 10.3390/molecules25153352.

Lavori scientifici prodotti nell'ambito delle collaborazioni con altri gruppi di ricerca (biennio 2019 - 2020)

- 1) ROTOLO O, ZINZI I, VERONESE N, CISTERNINO AM, REDDAVIDE R, INGUAGGIATO R, LEANDRO G, NOTARNICOLA M, TUTINO V, DE NUNZIO V, DE LEONARDIS G, GUERRA V, DONGHIA R, FUCILLI F, LICINIO R, MASTROSIMINI A, MAMMONE RINALDI C, DADDABBO T, GIAMPAOLO N, IACOVAZZI PA, GIANNICO S, CARUSO MG. Women in L.O.V.E.: Lacto-Ovo-VEgetarian diet rich in omega-3 reduces hot flushes and nervousness. A randomized controlled trial. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2019, 27.
- 2) CARUSO MG, VERONESE N, NOTARNICOLA M, CISTERNINO AM, REDDAVIDE R, INGUAGGIATO R, GUERRA V, DONGHIA R, LOGROSCINO A, ROTOLO O, CHILOIRO M, LEANDRO G, DE LEONARDIS G, TUTINO V, MISCIAGNA G, BONFIGLIO C, GUERRA R, OSELLA AR. Fatty liver and mortality: a cohort population study in South Italy. *BMJ Open* 2019 ;9:e027379.
- 3) MIRIZZI A, FRANCO I, LEONE MC, BONFIGLIO C, COZZOLONGO R, NOTARNICOLA M, GIANNUZZI V, TUTINO V, DE NUNZIO V, BRUNO I, BUONGIORNO C, CAMPANELLA A, DEFLORIO V, PASCALE A, PROCINO F, SORINO P, OSELLA AR. Effects of Some Food Components on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Severity: results from a Cross-Sectional Study. *Nutrients* 2019; 11(11),2744.
- 4) VERONESE N, CISTERNINO AM, SHIVAPPA M, HEBERT JR, NOTARNICOLA M, REDDAVIDE R, INGUAGGIATO R, GUERRA V, LOGROSCINO A, ROTOLO O, CHILOIRO M, LEANDRO G, DE LEONARDIS G, TUTINO V, MISCIAGNA G, FONTANA L CARUSO MG. Dietary inflammatory index and mortality: a cohort longitudinal study in a Mediterranean area. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 2020; 33(1), pp. 138-146
- 5) VERONESE N, DEMURTAS J, PESOLILLO G, CELOTTO S, BARNINIS T, CALUSI G, CARUSO MG, NOTARNICOLA M, REDDAVIDE R, STUBBS B, SOLMI M, MAGGI S, VAONA A, FIRTH J, SMITH L, KOYANAGI A, DOMINGUEZ L, BARBAGALLO M. Magnesium and health outcomes: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational and intervention studies. *European J of Nutrition* 2020; 9(1), pp. 263-272
- 6) VERONESE N, NOTARNICOLA M, CISTERNINO AM, REDDAVIDE R, INGUAGGIATO R, GUERRA V, DONGHIA R, ROTOLO O, ZINZI I, LEANDRO G, TUTINO V, MISCIAGNA G, CARUSO MG and MICOL GROUP. Trends in adherence to the Mediterranean diet in South Italy: a cross sectional study. *NMCD* 2020; 30(3), pp. 410-417
- 7) CIOCCOLONI G, AQUINO A, NOTARNICOLA M, CARUSO MG, BONMASSAR E, ZONFRILLO M, CAPORALI S, FARAONI I, VILLIVA' C, FUGGETTA MP, FRANZESE O. Fatty acid synthase inhibitor orlistat impairs cell growth and down-regulates PD-L1 expression of a human T-cell leukemia line. *Journal of Chemotherapy* 2020; 32(1), pp. 30-40
- 8) SCAVO MP, DEPALO N, TUTINO V, DE NUNZIO V, INGROSSO C, RIZZI F, NOTARNICOLA M, CURRI ML, GIANNELLI G. Exosomes for diagnosis and therapy in gastrointestinal cancers. *IJMS* 2020; 21(1),367.
- 9) ORLANDO A, TUTINO V, NOTARNICOLA M, RIEZZO G, LINSALATA M, CLEMENTE C, PROSPERO L, MARTULLI M, D'ATTOMA B, DE NUNZIO V, RUSSO F. Improved symptom profiles and minimal

inflammation in IBS-D patients undergoing a long-term low-FODMAP diet: a lipidomic perspective. *Nutrients* 2020, 12, 693; doi:10.3390/nu12030693

- 10) BONFIGLIO C, LEONE CM, SILVEIRA LVA, GUERRA R, MISCIAGNA G, CARUSO MG, BRUNO I, BUONGIORNO C, CAMPANELLA A, GUERRA VMB, NOTARNICOLA M, DEFLEORIO V, FRANCO I, BIANCO A, MIRIZZI A, ABALLAY LR, CISTERNINO AM, SORINO P, PESOLE PL, OSELLA AR. [Remnant cholesterol as a risk factor for cardiovascular, cancer or other causes mortality: A competing risks analysis.](#)
- 11) OSELLA AR et al. The effect of the Mediterranean Diet on lifespan. A treatment-effect survival analysis of a population-based prospective cohort study. *International Journal of Epidemiology* 2020, *in press*

Progetto 18/2019: “Malattia infiammatoria intestinale cancro del colon-retto e microbiota intestinale, quali correlazioni”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Grazia Serino (analisi molecolari), Angela Tafaro (sperimentazione animale), Marcello Chieppa (analisi campioni umani), Pesole Pasqua Letizia (analisi campioni umani), Mauro Mastronardi (dati clinici endoscopici)

Background

I tumori del colon-retto rappresentano, nel mondo, la seconda causa di morte. In Italia ogni anno circa 34 000 persone si ammalano. È stato ormai definito che i fattori di rischio includono la dieta, l'obesità, il fumo, l'alcool e una scarsa attività fisica. Un altro fattore di rischio è rappresentato dalle malattie infiammatorie croniche intestinali che comprendono la malattia di Crohn e la colite ulcerosa. È riportato infatti che circa l'1% dei pazienti con CRC ha una storia clinica di rettocolite ulcerosa ed il rischio di sviluppare CRC è direttamente connesso con la gravità del danno della mucosa intestinale e con l'estensione del processo infiammatorio tuttavia il rischio di sviluppare CRC nei soggetti con la malattia di Crohn risulta minore rispetto ai soggetti con rettocolite ulcerosa. Il microbiota intestinale svolge un ruolo importante nel mantenimento dell'omeostasi intestinale. Dati metagenomici recenti hanno dimostrato che la maggior parte delle specie componenti non è presente nello stesso tempo e nella stessa persona, ma, alcune specie sono abbondanti in individui sani, mentre altre sono meno rappresentate. Il microbiota intestinale inoltre influenza la proliferazione delle cellule epiteliali e l'apoptosi delle cellule ospiti. Sebbene le interazioni intime tra microbiota e cellule ospiti non siano del tutto chiare, un meccanismo importante sembra implicare acidi grassi a catena corta (SCFA), derivanti dalla fermentazione di polisaccaridi indigeribili (fibre), come butirrato, acetato e propionato con un importante ruolo antinfiammatorio. Gli SCFA supportano anche l'omeostasi intestinale nel colon normale, aiutando la riparazione intestinale attraverso la promozione della proliferazione e differenziazione cellulare. Tuttavia, gli SCFA sembrano inibire la proliferazione delle cellule cancerogene. Inoltre, il microbiota intestinale stimola lo sviluppo di componenti del sistema immunitario aspecifico e specifico, subito dopo la nascita e durante l'intera vita e agisce da barriera anti-infettiva inibendo l'adesione dei patogeni e successiva colonizzazione del substrato cellulare e dalla produzione di batteriocine e di altri metaboliti tossici.

Negli ultimi anni, però, si è fatta avanti l'idea che la flora batterica intestinale possa svolgere un ruolo importante nello sviluppo di diverse malattie e nella cancerogenesi. La disbiosi è stata dimostrata essere associata alla tumorigenesi intestinale. L'alterazione della complessità e dello stato eubiotico del microbiota potrebbe promuovere disordini autoimmuni e infiammatori intestinali ed extraintestinali (diabete di tipo I, artrite reumatoide, spondilosi anchilosante, IBD, malattia polmonare, atopia, steatosi epatica non alcolica, obesità, aterosclerosi, carcinogenesi, ecc.) sebbene i meccanismi coinvolti non siano ben compresi. Tuttavia, la correlazione tra microbiota intestinale, malattie intestinali autoimmuni / infiammatorie deve essere ancora approfonditamente indagata.

Obiettivo dello studio

L'obiettivo di questo progetto di ricerca è quello di valutare tramite l'utilizzo di modelli murini di trapianto fecale (FMT) le correlazioni tra microbiota intestinale, cancerogenesi del tumore del colon retto e patologia infiammatoria intestinale. In particolare, lo studio si propone di:

- valutare dal punto di vista morfologico e molecolare la progressione della patologia infiammatoria intestinale in topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale di feci provenienti da topi Winnie-APCmin .

- valutare il profilo di espressione di miRNA in tessuti e feci di topi Winnie (e controlli) sottoposti a trapianto fecale al fine di individuare biomarkers specifici della patologia e della risposta immunitaria
- validare i dati ottenuti su un campione di pazienti affetti da IBD che hanno sviluppato un tumore del colon-retto.

Materiali e metodi

Nello studio proposto utilizzeremo diversi modelli murini: topo APC^{Min/+} che contiene una mutazione puntiforme nel gene della poliposi adenomatosa coli (Apc) e sviluppa solo lesioni precancerose intestinali (adenomi benigni) che fornisce un eccellente sistema in vivo per indagare gli eventi molecolari coinvolti nel processo infiammatorio che possono contribuire alla tumorigenesi multistep e alla carcinogenesi; topo Winnie -/- topo con la mutazione omozigosi, modelli murini di Colite Ulcerosa, topo Winnie-APC^{Min} che combina entrambe le mutazioni e presenta lesioni pre-cancerose a partire dalle 5 settimane di età (manoscritto in sottomissione), e topi wild-type (WT) che rappresenteranno il controllo. In particolare, effettueremo trapianti fecali da topo donatore Winnie-APC^{Min} in topi Winnie e topi normali. Valuteremo quindi una serie di markers della cancerogenesi e dell'infiammazione intestinale al fine di chiarire quali sono i pathways attivati e disattivati in seguito al transfer fecale sia nel modello di controllo che nel modello indicato come Winnie. In linea con le priorità del nostro istituto nell'ambito della medicina di precisione, i risultati di questo studio potrebbero fornire il razionale per lo studio dell'associazione tra tumori intestinali ed il microbiota. Gli esperimenti vedranno impiegati modelli murini di trapianto fecale di microbiota come fase pre-clinica per futuri approcci clinici sperimentali.

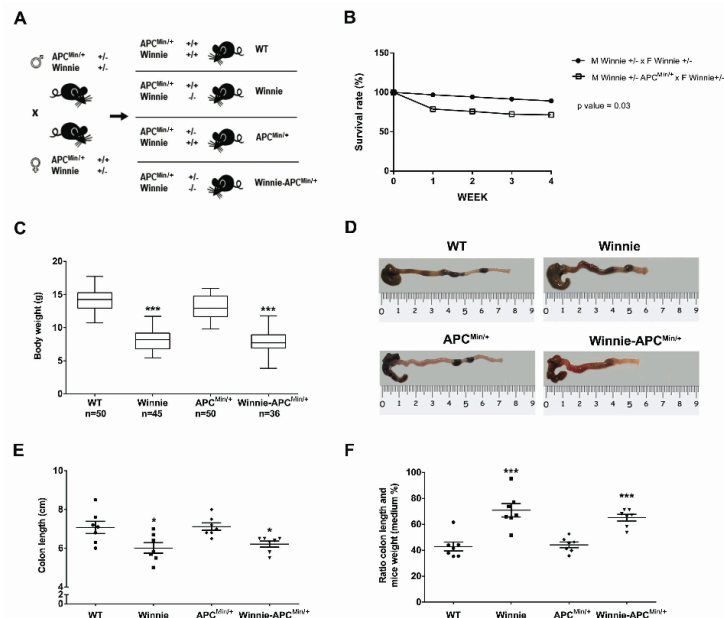
Risultati / stato di avanzamento per la 1^a annualità del progetto

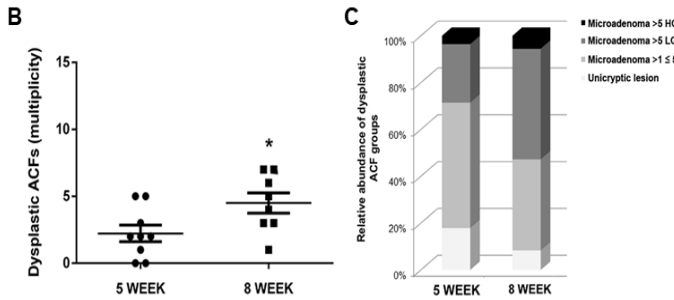
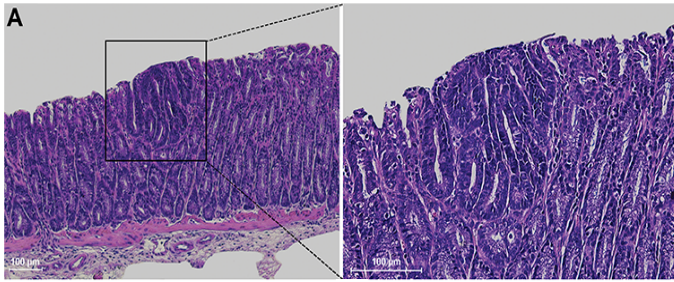
Abbiamo ottenuto l'autorizzazione per la sperimentazione animale (Autorizzazione 740/2019-PR) con inizio il 7/11/2019. Lo studio è basato sul disegno sperimentale descritto nella figura 1A. I risultati hanno evidenziato come i topi Winnie-APC^{Min} fossero vitali (Figura 1B), ma con caratteristiche simili al ceppo parentale Winnie (Figura 1 C-F).

L'analisi istologica ha evidenziato la comparsa di foci adenomatosi (ACF) nel modello Winnie-APC^{Min}, in accordo con la nostra iniziale ipotesi di un asse tra infiammazione e predisposizione allo sviluppo di cancro del colon retto.

Inaspettatamente, gli ACF erano evidenti già a partire dalle 5 settimane di età (Figura 2).

Questo risultato, caratterizza il modello Winnie-APC^{Min} come uno dei pochi modelli murini disponibili di tumore del colon retto spontaneo e l'unico, al meglio delle nostre conoscenze, modello murino di tumore pediatrico intestinale.





I risultati dello studio sono stati pubblicati su International Journal of Molecular Sciences in un articolo dal titolo: “Winnie-APC^{Min/+} Mice: A Spontaneous Model of Colitis-Associated Colorectal Cancer Combining Genetics and Inflammation”

Le nostre analisi si sono quindi indirizzate verso lo studio del microbiota intestinale nel tentativo di individuare delle specie batteriche in grado di aumentare o ridurre il rischio di sviluppare tumore intestinale. Abbiamo collezionato le feci del modello Winnie-APC^{min} e delle specie parentali e le abbiamo inviate per effettuare le analisi sul 16S batterico per individuare l’abbondanza relativa delle diverse specie batteriche nelle feci dei modelli murini analisi Winnie-APC^{min}, Winnie, APC^{min} e WT. I risultati delle analisi biostatistiche saranno finalizzati nelle prossime settimane e contiamo di poter sottoporre uno studio dal titolo “Dysbiosis triggers ACF development in genetically predisposed subject” su una rivista scientifica entro la fine del 2020.

Publicazioni:

- A case report of esophageal actinomycosis in an immunocompetent patient and review of the literature. Palmitessa Valeria, Renato Cuppone, Rosa Monno, Luciana Fumarola, Lippolis Antonio. New Microbiologica
- The Activation Status of the TGF-β Transducer Smad2 Is Associated With a Reduced Survival in Gastrointestinal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. Ilaria Girolami, Nicola Veronese, Lee Smith, Caruso Maria Gabriella, Reddavid Rosa, Leandro Gioacchino, Jacopo Demurtas, Alessia Nottegar. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
- Safety of hospital discharge before return of bowel function after elective colorectal surgery EuroSurg Collaborative. British Journal of Surgery

Progetto n. 16/2019: Endoscopic performance and patterns of narrow-band imaging in detecting dysplasia during follow-up of precancerous gastric conditions

Responsabile: dott.ssa Alba PANARESE

Partecipanti: dr. Endrit Shahini – specialista gastroenterologo ed endoscopista digestivo-, dr. Raffaele Armentano- dirigente medico specialista in anatomia patologica-

Background

La diagnosi endoscopica delle lesioni precancerose e cancerose iniziali del tratto digestivo è un argomento molto attuale e oggetto di dibattito nella comunità scientifica internazionale. Soprattutto, per il tratto gastrico, negli ultimi anni, si è accesa una forte discussione scientifica, che nel 2019 ha visto aumentare le pubblicazioni e moltiplicare gli interrogativi, per i quali si attendono risposte condivise.

L’outcome comune è ridurre l’incidenza di mortalità per cancro gastrico e aumentare la percentuale relativa di neoplasia gastrica precoce vs neoplasia gastrica avanzata. La prima suscettibile di trattamento curativo, peraltro, meno invasivo perché endoscopico. La seconda suscettibile di trattamento chirurgico, quando possibile, e con sopravvivenza a 5 anni inferiore al 50%.

L’applicazione delle classificazioni che rendono possibile la descrizione delle lesioni neoplastiche precoci gastriche si scontra con il background conoscitivo e la difficoltà di definizione dovuta anche alla disponibilità di dispositivi aggiornati e di materiale diagnostico adeguato. Inoltre, è tutt’altro che raggiunta l’intesa diagnostica multidisciplinare in fase di screening e sorveglianza.

Il nostro studio sulla ricerca di pattern morfologici che consentano la diagnosi di lesioni neoplastiche precoci gastriche si inserisce in questo contesto scientifico

Obiettivo dello studio

L'obiettivo principale del primo studio del filone di ricerca sulla displasia nel segmento gastrico è stato la valutazione della diagnosi di displasia nei soggetti con gastrite cronica atrofica prima e dopo eradicazione dell'*Helicobacter pylori* (HP), utilizzando la cromoesoscopia virtuale (NBI) e la magnificazione. Considerando la difficoltà all'applicazione delle classificazioni endoscopiche proposte per la descrizione della gastrite cronica atrofica, della metaplasia intestinale e displasia, questo outcome è stato considerato come primo step.

L'outcome individuato nel 2017, anno in cui il protocollo è stato realizzato, è risultato interessante anche alla luce delle pubblicazioni che, successivamente al 2017, sono state effettuate nel settore internazionale di riferimento.

Il nostro studio ha avuto, inoltre, l'obiettivo di individuare e valutare altre variabili significative nella descrizione della gastrite cronica atrofica, come, in primis, l'autoimmunità.

Materiali e metodi

Il nostro studio è osservazionale, prospettico, condotto presso l'Istituto "De Bellis" da giugno 2017 ad aprile 2019. Abbiamo arruolato 85 soggetti consecutivi, da una coorte di 156 pazienti esterni, che sono stati sottoposti a gastroscopia di alta qualità con/senza cromoesoscopia virtuale (narrow band imaging –NBI-) usando gli strumenti Olympus GIF-HQ190® - Evis Exera III processor® (Olympus Tokyo, Japan). Gli steps di arruolamento sono descritti nella Figure 1.

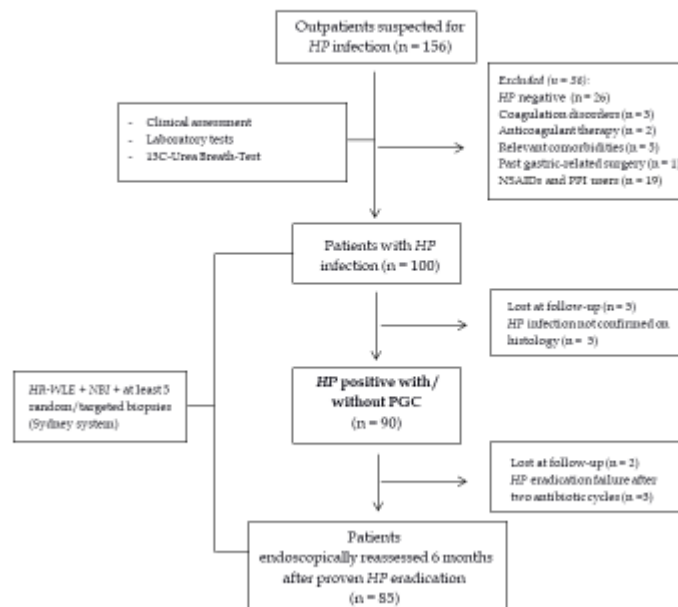


Figure 1. Diagramma di flusso della selezione dei pazienti. HP, *Helicobacter Pylori*; NSAIDs, Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs; PPI, Proton Pump Inhibitor; HR-WLE, High Resolution-White Light Endoscopy; NBI, Narrow Band Imaging.

Nei soggetti con sospetta componente autoimmune è stato effettuato il dosaggio degli anticorpi anti-cellule parietali gastriche e anti fattore intrinseco, usando tecniche di immunofluorescenza.

Le procedure endoscopiche sono state effettuate da un'endoscopista esperto. La revisione statistica dei dati è stata portata a termine da un esperto di statistica biomedica. Partendo dai dati precedentemente pubblicati, abbiamo calcolato che, per l'analisi dell'outcome primario usando la funzione $ss2 \times 2$ contenuta nel programma $exact2 \times 2$, la grandezza campionaria di 48 soggetti (24 controlli e 24 trattati) avrebbe assicurato un potere di 0.82 e un livello di significatività di 0.05. Quindi, il nostro obiettivo è stato di arruolare almeno 48 soggetti. Abbiamo completato lo studio dopo aver arruolato 85 soggetti, che sono stati valutati endoscopicamente con luce bianca ad alta definizione (HR-WLE) e NBI, e con campionamento biptico gastrico secondo il Sydney System, prima dell'eradicazione dell'HP e sei mesi dopo l'eradicazione, confermata dall'urea breath test (UBT). Lo scopo è stato di determinare il potere diagnostico dell'HR-WLE con NBI nell'individuare le lesioni neoplastiche precoci dello stomaco, durante un tempo di sorveglianza breve e, soprattutto, dopo eradicazione dell'HP.

I criteri di inclusione sono stati: l'età ≥ 18 anni, l'indicazione alla gastroscopia per sintomi cronici HP-correlati (i.e. dolore addominale, dispepsia, or anemia), con positività dell'UBT e diagnosi istologica di gastrite HP-correlata con/senza lesioni neoplastiche precoci.

I criteri di esclusione sono stati: precedenti resezioni gastriche o diagnosi di cancro gastrico, impossibilità a effettuare almeno cinque biopsie, comorbidità rilevanti (cardiache, respiratorie, insufficienza renale cronica, epatopatie

corniche e condizioni psichiatriche), terapie anticoagulanti/ disordini coagulativi, uso di antifiammatori e uso cronico di inibitori di pompa protonica, abitudine tabagica. Le comorbidità autoimmuni non sono state considerate criterio di esclusione.

Tutte le lesioni gastriche sono state studiate in HR-WLE e NBI. Abbiamo effettuato in tutti i casi 5 prelievi biotici e, sulle lesioni visibili, suggestive di metaplasia intestinale/displasia, biopsie target.

Inoltre, in corso di gastroscopia, sono state acquisite almeno cinque immagini diverse da un operatore esperto, a cui non era nota la diagnosi istologica e che formulava diagnosi di normalità/atrofia/metaplasia intestinale/displasia utilizzando la classificazione “Endoscopic Grading of Gastric Intestinal Metaplasia (EGGIM)” formulata da Pimentel-Nunes et al. nel 2016.

L’esame istologico è stato considerato il gold standard per la diagnosi di displasia e metaplasia intestinale. L’OLGA e l’OLGIM system sono stati considerati per la stadiazione della atrofia e metaplasia intestinale della mucosa gastrica. Invece, per la valutazione della displasia sono state considerate le categorie descritte dalla WHO classification: negativo per neoplasia intraepiteliale/displasia, indefinito per neoplasia intraepiteliale/displasia, basso grado per neoplasia intraepiteliale/displasia, alto grado per neoplasia intraepiteliale/displasia, e neoplasia invasiva intraepiteliale/carcinoma intramucoso. In tutti i pazienti l’eradicazione dell’HP è stata determinata con UBT e confermata dall’istologia.

Per quanto concerne l’analisi statistica, la distribuzione normale delle variabili continue è stata effettuata con Shapiro-Wilk test e i dati sono stati espressi come media \pm standard deviation. Le variabili sono state espresse come percentuali e confrontate usando il Chi-squared test o il Fisher’s exact test, quando necessario. La probabilità di diagnosticare la displasia gastrica dopo eradicazione dell’HP è stata valutata usando l’analisi logistica univariata e multivariata. L’associazione tra ogni variabile e l’outcome (diagnosi di displasia) è stata testata usando il test del rapporto di verosimiglianza. Per ogni variabile inclusa nel modello multivariato, abbiamo calcolato gli odds ratio, con intervallo di confidenza del 95% e livello di significatività, fissato a $P < 0.05$. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate usando il software SPSS 23.0 (SPSS, Chicago, IL, United States).

Risultati / stato di avanzamento del progetto

Le caratteristiche cliniche degli 85 soggetti arruolati sono descritte nella tabella 1.

Table 1. Caratteristiche demografiche e cliniche dei soggetti sottoposti a eradicazione dell’*Helicobacter pylori* (HP).

| Parameters | Patients (n = 85) |
|--|--------------------------|
| Age, mean (SD), years | 56.1 (12.3) |
| Gender, n (%) | |
| Female | 53 (62.4) |
| BMI, mean (SD), Kg/m² | 25.1 (2.2) |
| Alcohol users (12-24 g/dL /die), n (%) | 27 (31.8) |
| Previous smokers, n (%) | 12 (14.1) |
| Drug users, n (%) | 23 (27.1) |
| Family history of gastric cancer, n (%) | 4 (4.7) |
| Family history of other cancer, n (%) | 9 (10.6) |
| Autoimmune comorbidity | |
| Autoimmune atrophic gastritis | 12 (14.1) |
| Autoimmune thyroiditis | 6 (7.1) |
| Type-1/2 diabetes mellitus | 3 (3.5) |

| | |
|--|-----------|
| Skin psoriasis | 1 (1.2) |
| Rheumatoid arthritis | 1 (1.2) |
| Sjögren syndrome | 1 (1.2) |
| A. thyroiditis + vitiligo | 1 (1.2) |
| A. thyroiditis + Crohn's disease | 1 (1.2) |
| A. thyroiditis + Sjögren syndrome | 1 (1.2) |
| APCA and/or AIF antibody positivity | 12 (14.1) |
| Endoscopy indication, n (%) | |
| Gastroesophageal reflux | 17 (20) |
| Recurrent abdominal pain | 12 (14.1) |
| Dyspepsia | 41 (48.2) |
| Unexplained anemia | 15 (17.7) |
| HP eradication scheme, n (%) | |
| Quadruple [†] | 53 (62.4) |
| Modified triple ^{††} | 28 (32.9) |
| Triple ^{†††} | 3 (3.6) |
| Sequential ^{††††} | 1 (1.2) |
| HP eradication cycles, n (%) | |
| One-cycle | 71 (83.5) |
| Two-cycles | 14 (16.5) |

I dati sono espressi come numero di pazienti e percentuali (in parentesi); BMI, Body Mass Index; SD, Standard deviation; APCA, anti-Parietal Cell Antibody; AIF, anti-Intrinsic Factor; *HP*, Helicobacter pylori; PPI, Proton Pump Inhibitor; [†]Bismuth + Metronidazole + Tetracycline + PPI; ^{††}Amoxicillin + Levofloxacin + PPI; ^{†††}Amoxicillin + Clarithromycin + PPI; ^{††††}Amoxicillin + Clarithromycin + PPI Amoxicillin (5 days), then Clarithromycin + Metronidazole (5 days) + PPI.

Alla prima gastroscopia la maggior parte dei soggetti (71.8%) presentava gastrite cronica atrofica (panatrofia, atrofia "corpus predominant" e atrofia "antrum predominant"), e la minoranza (22.4%) aveva atrofia focale antrale. L'80% dei pazienti aveva un grado di atrofia meno avanzato (0-2 e 3-4) nella scala dell'EGGIM; l'istologia era moderato/grave e lieve nel 77.6% e nel 22.4% dei pazienti rispettivamente; il 45.8% dei pazienti aveva anche iperplasia del MALT. Abbiamo osservato che 15 soggetti (17.6%) avevano displasia di basso grado su biopsie random. Dei 49 soggetti con panatrofia o atrofia "corpus predominant", 11 (22.4%) erano positivi agli anticorpi anticellule parietali gastriche o agli anticorpi anti-fattore intrinseco. Nel 100% dei casi l'infiltrazione istologica mononucleare o polimorfonucleare è scomparsa o si è drasticamente ridotta dopo eradicazione.

Inoltre, la proporzione degli stadi OLGA e OLGIM, e quella dei soggetti con diagnosi istologica di displasia di basso grado su biopsie random non è cambiata significativamente dopo l'eradicazione dell'HP (17.6% vs. 10.6%, p=0.19). La detection della displasia di basso grado sulle lesioni visibili è aumentata significativamente dopo l'eradicazione dell'HP (0% vs. 22.3%, p<0.001).

Publicazioni:

- Curriculum for endoscopic submucosal dissection training in Europe: European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Position Statement. Pedro Pimentel-Nunes, Mathieu Pioche, Eduardo Albéniz, Frieder Berr, Pierre Deprez, A. Ebigbo, Pieter Dewint, Aryn Haji, Panarese Alba, Bas L. A. M. Weusten, Evelien Dekker, James E. East, David S. Sanders, Gavin Johnson, Marianna Arvanitakis, Thierry Ponchon, Mário Dinis-Ribeiro, Raf Bisschops. ENDOSCOPY
- Endoscopic submucosal dissection: Italian national survey on current practices, training and outcomes. Roberta Maselli, Federico Iacopini, Francesco Azzolini, Lucio Petruzzello, Mauro Manno, Luca De Luca, Paolo Cecinato, Giancarla Fiori, Teresa Staiano, Erik Rosa Rizzotto, Stefano Angeletti, Angelo Caruso, Franco Coppola, Gianluca Andrisani, Edi Viale, Guido Missale, Panarese Alba, Alessandro Mazzocchi, Paola Cesaro, Mariachiara Campanale, Pietro Occhipinti, Ottaviano Tarantino, Cristiano Crosta, Piero Brosolo, Sandro Sferrazza, Emanuele Rondonotti, Arnaldo Amato, Lorenzo Fuccio, Guido Costamagna, Alessandro Repici. Digestive Endoscopy
- Mucin phenotype of Differentiated Early Gastric Cancer: an immunohistochemistry study supporting therapeutic decision making. Cavalcanti Elisabetta, Francesco De Michele, Lantone Giulio, Panarese Alba, Caruso Maria Lucia. Cancer Management and Research
- Are immunohistochemical markers useful in gastric cancer phenotypic classification? F. Di Pinto, R. Armentano, G. Arborea, N. Schena, R. Donghia, AM Valentini. Oncology.
- Letter: Covid-19, and vitamin D. Alba Panarese and Endrit Shahini. Aliment Pharmacol Ther.
- Safety in digestive endoscopy procedures in the covid era recommendations in progres of the italian society of digestive endoscopy "G Galloro, A Pisani, RM Zagari, A Lamazza, G Cengia, E Ciliberto, RL Conigliaro, P Da Massa Carrara, B Germanà, L Pasquale. Digestive and Liver Disease

Progetto n. 11/2020: Markers tissutali e sierici nella diagnosi differenziale tra le patologie benigne e maligne del pancreas.

Responsabile: dott.ssa Anna Maria Valentini

Partecipanti: dott A Lippolis, Dott.ssa G Arborea, dott A Pisani, Dott O Burattini, Dott.ssa PA Iacovazzi, Dott. N Schena

Background:

Il carcinoma pancreatico è la settima causa di morte per neoplasia nel mondo e, nonostante i progressi nella diagnosi e nei trattamenti, la sopravvivenza a 5 anni rimane del 9%. Nell'Europa occidentale ha un'incidenza di 7.7 casi x 100.000, praticamente uguale al tasso di mortalità che è pari a 7.6 x 100.000. L'adenocarcinoma duttale pancreatico (PDAC) rappresenta l'85% -90% delle neoplasie pancreatiche. Quando viene rilevata una massa pancreaticata, grazie agli attuali miglioramenti delle tecniche di imaging e del campionamento dei tessuti, è possibile effettuare una diagnosi definitiva di PDAC nella maggior parte dei pazienti. Tuttavia, esistono ancora alcune sfide nel distinguere la malattia maligna da quella benigna. Ciò è particolarmente vero per la pancreatite cronica che può mimare un adenocarcinoma sia in imaging che per l'aumento del CA 19-9 sierico. Di conseguenza, i pazienti a volte subiscono importanti resezioni chirurgiche epatopancreaticobiliari per condizioni che risultano essere benigne. E' stato riportato che i pazienti sottoposti a pancreaticoduodenectomia, per una condizione benigna, presentano un calo del 17% della sopravvivenza a lungo termine. Pertanto, è stata posta una grande attenzione al progresso e allo sviluppo di tecniche diagnostiche per il carcinoma pancreatico. Inoltre, poiché i sintomi iniziali non sono specifici, la diagnosi di PDAC è generalmente ritardata e la maggior parte dei tumori non è operabile al momento della diagnosi. Pertanto, l'ecografia endoscopica con aspirazione con ago sottile (EUS-FNA), grazie ad un basso tasso di complicanze e alla capacità di ottenere un campione di tessuto, ha guadagnato il favore come modalità diagnostica per il carcinoma del pancreas. L'uso di EUS-FNA è supportato da un'alta sensibilità e specificità. Tuttavia, permangono difficoltà nell'ottenere campioni di tessuto adeguati che consentano una diagnosi di certezza. Fattori come la dimensione del tumore, la posizione del tumore, il calibro dell'ago, la tecnica utilizzata, l'esperienza dell'endoscopista contribuiscono tutti alla capacità di raccogliere un'adeguata biopsia. Pertanto, risulta evidente come la diagnosi differenziale tra PDAC e patologie benigne sia un problema ancora maggiore su campioni derivanti da EUS-FNA per la esiguità del materiale tissutale a disposizione. Di conseguenza, numerosi studi sono stati dedicati all'esplorazione di markers immunoistochimici (IIC) che possano contribuire a mitigare il problema della esiguità del campione. Nonostante l'identificazione di numerosi marcatori IIC utili per la diagnosi di adenocarcinoma pancreatico, nessun marcatore ha dimostrato di avere un valore diagnostico sufficientemente

elevato da poter essere utilizzato da solo. Di conseguenza, diversi studi si sono concentrati sulla combinazione di marcatori IHC all'interno di un panel al fine di aumentare la sensibilità e la specificità del test.

Recenti studi hanno dimostrato che l'espressione immunohistochimica di S100P (S100 calcium-binding Protein P), IMP3 (insulin-like growth factor 3 mRNA binding protein 3), maspina, e la non espressione del prodotto del gene von Hippel-Lindau (pVHL) sono significativamente correlate con il PDAC. Tuttavia, sono pochi gli studi che utilizzano il valore diagnostico di questi anticorpi nella diagnosi differenziale tra PDAC e tessuto pancreatico normale / reattivo su campioni provenienti da FNA.

Recentemente è stato dimostrato in uno studio effettuato su Tissue Macroarray (TMA), non su campioni di FNA, che la diagnosi differenziale tra patologie benigne e PDAC si può avvalere della combinazione di TFFs (trefoil factors) e CA19-9 tissutali e sierici.

Obiettivi:

Validazione della metodica immunohistochimica relativa ai marcatori S100P, IMP3, Maspina, pVHL, TFF1-3 su 20 campioni chirurgici di adenocarcinoma pancreatico appartenenti alla istoteca del Servizio di Anatomia Patologica; arruolamento pazienti (circa 100) sottoposti a EUS-FNA per patologia pancreatica in regime di ricovero presso l'IRCCS "S de Bellis" e concomitante studio prospettico per la indagine tissutale di S100P, IMP3, Maspina, pVHL, TFF1-3 e sierica di TFF1-3 e CA19-9; valutazione del valore diagnostico dei marcatori tissutali e sierici al fine di una loro utilizzazione nella pratica clinica nella diagnosi differenziale tra patologie benigne e maligne del pancreas.

Materiali e Metodi:

La metodica immunohistochimica sarà utilizzata per la determinazione della espressione tissutale di IMP3, S100P, Maspina, pVHL e TFF1-3. La determinazione dei livelli sierici di TFF1-3 e CA19-9 sarà eseguita utilizzando rispettivamente la tecnica ELISA su micropiastra e il metodo in chemiluminescenza.

Allo scopo sarà prelevato per ogni paziente un campione di siero in aggiunta a quelli normalmente utilizzati per la routine diagnostica oncologica. I campioni sierici dello studio saranno conservati a -80°C presso il Laboratorio di patologia clinica.

Stato di avanzamento:

Sono stati selezionati i campioni chirurgici di adenocarcinoma pancreatico appartenenti alla istoteca del servizio di Anatomia Patologica e per ognuno sono state allestite fette in paraffina dello spessore di 4 micron per la validazione della metodica immunohistochimica e per la verifica della performance degli anticorpi in studio.

Pubblicazioni:

- Primary lymph node gastrinoma: a case report and review of the literature. Cavalcanti, Stasi, Coletta, Lorusso, Mammone Rinaldi and Armentano. World Journal of Surgical Oncology
- Prognostic Value of Peri-Nuclear Anti Neutrophil Cytoplasmic Antibodies in Subjects With Primary Sclerosing Cholangitis. V Guglielmi, P Giorgio, V Guerra, A Sonnante, M Tutino, R Donghia, A Pisani. Minerva Medica

Progetto n. 9/2020: Nuovi target molecolari nella diagnostica dei GEP-NET

Responsabile: dott. Raffaele Armentano

Partecipanti: Elisabetta Cavalcanti, Sergio Coletta, Grazia Serino

Background

I tumori neuroendocrini (NET) sono tumori rari ed eterogenei con un ampio spettro di caratteristiche cliniche e biologiche (1). Negli ultimi anni, sono stati condotti numerosi studi per comprendere meglio la patogenesi dei NET, il sistema di classificazione e la classificazione in base al sito di origine, ai tipi di cellule e alle caratteristiche patologiche. Nonostante la nuova classificazione (WHO 2010/2017), la bassa incidenza, l'eterogeneità del tumore, i sintomi non specifici, le nomenclature e le classificazioni indefinite, i NET rimangono una malattia imprevedibile pertanto i casi di basso grado possono presentare inaspettatamente spesso malattie avanzate alla diagnosi. In effetti, l'assenza di sintomi patognomici

rende difficile la diagnosi; rimangono asintomatici per anni e vengono scoperti solo quando sono già metastatici. I NET sono comunemente localizzati nel tratto gastrointestinale, nel pancreas e nel polmone con tassi di incidenza che aumentano da 1,52 a 7,41 casi per 100.000 abitanti. Secondo l'ultima classificazione WHO, i NET sono classificati in base agli aspetti morfologici e alla valutazione della proliferazione in due categorie principali: ben differenziati (WD) e scarsamente differenziati (PD). Sul piano anatomico-patologico i GEP NET sono classificati in G1-G2-G3 in base all'indice di proliferazione Ki-67 e all'indice mitotico, ma tutti con approcci di prognosi, esito e trattamento diversi. Di recente, una nuova classificazione dei tumori neuroendocrini del pancreas (WHO 2017) ha aggiunto un nuovo gruppo chiamato "NET G3" che include pazienti con un alto indice di proliferazione e morfologia ben differenziata; ma questo termine è attualmente limitato ai pazienti con NET pancreatici (pNET). Attualmente nonostante la loro nuova classificazione (WHO 2010/2017), il comportamento clinico dei NET è altamente imprevedibile ed al momento è difficile definire le caratteristiche biologiche, patologiche o cliniche che potrebbero essere in grado di caratterizzare il tumore e di definire la prognosi e la risposta ai trattamenti nei tre gruppi G1, G2 e G3. Nei nostri studi precedenti, abbiamo evidenziato l'importanza di una migliore caratterizzazione della classificazione NET per fornire anche indicazioni prognostiche e terapeutiche affidabili. In particolare, gli approcci farmacologici che utilizzano anticorpi anti-PD-1 possono diventare la scelta più appropriata per il trattamento di casi G3 con prognosi sfavorevole, mentre per i casi G1 / G2 i farmaci anti-angiogenici potrebbero essere un'ottima scelta terapeutica, come dimostrato in un altro nostro recente studio, il PDGFR α rappresenta un bersaglio efficace per un nuovo trattamento anti-angiogenico nei WD-GEP-NEN, in particolare nei casi G2. L'attuale progetto, attraverso un miRNA profiling si pone l'obiettivo di definire meglio i differenti profili molecolari, la prognosi ed il trattamento più adeguato, dato che i tradizionali farmaci per i NET hanno mostrato un'efficacia limitata. In particolare, i microRNA sono una nuova classe di piccoli RNA non codificanti che regolano negativamente l'espressione genica a livello post- trascrizionale inibendo la traduzione di mRNA specifici. Studi recenti hanno suggerito che incrementi o decrementi nell'espressione delle miRNA sono correlati alla regolazione di oncogeni o soppressori tumorali e perciò possono esplicare una funzione importante nello sviluppo del cancro, nella progressione della malattia e nella sua prognosi. Pertanto, a supporto dello studio del profilo di espressione genica e molecolare la messa appunto della biopsia liquida per i NET sarebbe **utile per seguire l'evoluzione della malattia** e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Obiettivo dello studio

Anche se le terapie mirate hanno notevolmente cambiato il trattamento del cancro negli ultimi 10 anni, sono stati messi in luce diversi nuovi problemi e sfide, tra cui l'eterogeneità del tumore e l'evoluzione molecolare, i costi e i limiti delle biopsie, la mancanza di farmaci efficaci contro la maggior parte delle alterazioni genomiche, i limiti tecnici dei test molecolari, l'eventuale rimborso di queste indagini e gli ostacoli di carattere normativo. Oggi, uno dei temi biologici più importanti è l'eterogeneità intratumorale. Quasi tutti i tumori trattati acquisiscono resistenza alla terapia, come risultato dell'eterogeneità tumorale, dell'evoluzione clonale e della selezione. I NET presentano un'enorme eterogeneità ed attualmente le decisioni terapeutiche sono prese considerando solo le caratteristiche morfologiche della neoplasia, senza alcuna conoscenza della genetica del tumore. Per di più, i tumori evolvono e durante la loro progressione possono presentarsi dei subcloni, con alterazioni molecolari differenti tra il tumore primario e le metastasi o le recidive. In particolare, nei NET l'enorme eterogeneità e la mancanza di conoscenza circa la composizione genetica del tumore fanno sì che spesso le ragioni della resistenza primaria o lo sviluppo di resistenza secondaria non sono spiegabili. Pertanto, l'obiettivo dello studio è quello di caratterizzare un 'signature' di miRNAs e di alterazioni molecolari coinvolte nella differenziazione delle caratteristiche clinico patologiche e molecolari nei pazienti GEP NET. Quindi, poiché i marcatori correlati alla terapia possono variare durante la progressione del tumore, l'identificazione di marcatori in diversi momenti temporali può fornire informazioni fondamentali per la corretta gestione clinica del paziente. Pertanto, a supporto dello studio del profilo di espressione genica e molecolare questo studio prevede in conclusione la messa appunto della biopsia liquida per i NET. Tutto questo sarebbe **utile per seguire l'evoluzione della malattia** e l'identificazione di nuove strategie terapeutiche basate sull'utilizzo di farmaci a bersaglio molecolare.

Risultati / stato di avanzamento per la prima annualità del progetto

Nel primo anno è stata allestita la casistica dei casi NET pervenuti all'IRCCS de Bellis dal gennaio 2006 a dicembre 2019, sono stati arruolati 90 pazienti: 48 M e 42 F e comprendono NET dell'apparato GEP: 27.7% stomaco, 14.4 % fegato, 2 % colecisti, 7.8 % colon, 12.2 % pancreas, 26.7% piccolo intestino, 7.78 % appendice e 3.33 % ampolla di Vater. Tutti i casi sono stati rivisti e classificati secondo la WHO 2017 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 sono stati selezionati i campioni prelevati da pazienti con GEP-NET ben differenziati (grado G1 e G2) e si è proceduto con l'estrazione dei campioni di miRNA dai blocchetti inclusi in paraffina utilizzando il miRNeasy FFPE kit (Qiagen). La concentrazione del campione estratto è stata determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop. I dati di espressione totale dei miRNAs ottenuti dall'analisi mediante microarray (Cavalcanti E. et al. *Frontiers in Oncology*, ;10:1187, 2020) sono stati rielaborati ed è stata individuata la lista di miRNAs differenzialmente espressi tra in pazienti con grado G2 e i pazienti con grado G1. Inoltre, è stata identificata una lista di 24 miRNAs specifica dei GEP-NETs ben differenziati.

È in corso la validazione dei dati ottenuti da microarray mediante l'utilizzo della Real-Time PCR.

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 nell’anno 2020 sono i seguenti:

Progetto n. 19/2018: “Epidemiologia e Farmacovigilanza delle infezioni da *Helicobacter pylori*”

Responsabile: dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: dott.ssa Valeria Palmitessa

Introduzione:

Helicobacter pylori è un batterio microaerofilo gram negativo che colonizza la mucosa gastrica. L’infezione da *H. pylori* correla con lo sviluppo di gastrite e ulcera duodenale, ed anche con malt linfoma, cancro gastrico. Sebbene spesso l’infezione decorra in maniera asintomatica l’eradicazione dell’infezione da *H. pylori* è fortemente raccomandata dalle Linee Guida Internazionali di gastroenterologia al fine di prevenire manifestazioni cliniche più gravi quali ulcera peptica e carcinoma gastrico. La strategia “*test and treat*” è molto efficace per raggiungere lo scopo. La *first line therapy* si avvale di un inibitore della pompa protonica più claritromicina e amoxicillina o levofloxacina più amoxicillina. Tuttavia, queste terapie sono inefficaci in oltre il 20% dei casi a causa dell’incremento delle resistenze agli antibiotici in *H. pylori* (5). La resistenza al trattamento è determinata da:

- a) pattern di resistenza caratterizzanti ceppi circolanti in specifiche aree geografiche derivanti dalla pressione selettiva esercitata dalle terapie antibiotiche di comune uso nella popolazione
- b) resistenze specifiche determinate dall’utilizzo di terapie eradicanti fallimentari che selezionano *H. pylori* resistenti agli antibiotici di prima e seconda linea.
- c) scarsa compliance del paziente che non tollera terapie eradicanti
- d) altri fattori: come recentemente riportato in letteratura, la produzione di biofilm da parte del batterio per esempio, riduce la penetrazione di antibiotici.

La ricerca sarà volta alla conoscenza della diffusione dell’infezione da *H. pylori* nel bacino di utenza dell’IRCCS e alla valutazione dei suoi pattern di resistenza, al fine di fornire al comparto clinico dati epidemiologici e la possibilità di avere a disposizione un profilo di sensibilità dei ceppi di *H. pylori* agli antibiotici principalmente isolati nella popolazione in studio. Inoltre, la determinazione del profilo molecolare (genotipo resistente e presenza di geni dell’isola di patogenicità, quali CagA e VacA ed altri) permetterà di conoscere la diffusione di ceppi di *H. pylori* ad elevata patogenicità che circolano nel bacino di utenza dell’IRCCS De Bellis.

Obiettivi specifici dello studio:

Scopo principale del progetto di ricerca è caratterizzazione fenotipica, mediante tecniche colturali (E-test) e genotipica, mediante tecniche molecolari (multiplex 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.

In dettaglio quindi gli obiettivi specifici della ricerca sono:

- obiettivo specifico 1: mettere a punto e individuare tecniche di isolamento di ceppi di *H. pylori* da pazienti con diverse patologie gastriche;
- obiettivo specifico 2: effettuare saggi di sensibilità agli antibiotici, mediante metodo E-test, dei ceppi di *H. pylori* isolati al fine di valutare la dimensione del fenomeno della antibiotico-resistenza nel bacino di utenza del suddetto IRCCS;
- obiettivo specifico 3: Caratterizzare molecolare delle resistenze agli antibiotici, nonché la diffusione di ceppi di *H. pylori* esprimenti i geni dell’isola di patogenicità (cag A e vac A e / o altro), i quali sono associati a patologie gastriche più gravi come ulcera peptica e carcinoma gastrico.

Obiettivo 1: Tecniche di isolamento di ceppi di *H. pylori* isolati da pazienti con diverse patologie gastriche a carattere infettivo.

I tre campioni biotici (corpo-fondo, antro e angulus) sono stati trattati al fine di isolare i ceppi di *H. pylori* responsabili dell'infezione. L'isolamento ha permesso di costituire una ceppoteca consistente di 92 ceppi isolati e stoccati nel laboratorio della U.O.C. di patologia clinica dell'IRCCS de Bellis. Questo ha permesso di effettuare tests di sensibilità agli antibiotici mediante tecniche colturali (E-tests). Sono stati saggiati sia farmaci in uso nelle terapie di eradicazione dell'infezione di prima linea indicate a livello nazionale quali claritromicina, amoxicillina e levofloxacina che antibiotici in uso nelle terapie di eradicazione di seconda e terza linea quali metronidazolo, rifampicina e tetraciclina.

Rientra nel primo obiettivo quello di migliorare le tecniche colturali utili ad isolare il patogeno in questione soprattutto in quei casi in cui, a causa dell'uso di terapie antibiotiche empiriche di prima e seconda linea, il patogeno risulta stressato e di conseguenza il suo isolamento già di per se notoriamente indaginoso, è reso ulteriormente difficoltoso. Allo scopo quindi sono stati utilizzati specifici terreni di coltura (di arricchimento) sia in fase liquida che in fase solida, i quali hanno permesso l'isolamento da campioni provenienti da pazienti precedentemente trattati. Ci si è avvalsi anche di indagini microscopiche previa colorazione specifica al fine di valutare la densità del microrganismo nel campione biotico (dato indicativo della probabilità di buona riuscita dell'isolamento colturale). I ceppi isolati sono stati identificati biochimicamente.

L'isolamento dei ceppi patogeni è stato uno passaggio fondamentale per saggiare le caratteristiche fenotipiche di sensibilità agli antibiotici, obiettivo successivo del progetto.

Obiettivo 2: Valutazione della dimensione del fenomeno della antibiotico-resistenza nel bacino di utenza.

Nello studio l'obiettivo cardine è stato quello di effettuare uno screening della sensibilità agli antibiotici utilizzati in prima, seconda e terza linea di eradicamento. L'applicazione del metodo E-test, ha permesso di valutare i fenotipi di resistenza a sei antibiotici, mentre l'utilizzo di tecniche molecolari (amplificazione del genoma batterico e rilevamento mediante ibridazione inversa su strip di nitrocellulosa) ha permesso di discriminare quali mutazioni puntiformi sono responsabili dell'acquisizione della resistenza alla claritromicina e alla levofloxacina.

La resistenza al metronidazolo e la sua determinazione genetica è stata indagata anche analizzando la presenza di mutazioni in alcuni geni che codificano per enzimi, cofattori e carrier che potrebbero essere associati all'acquisizione di resistenza ad uno dei componenti della terapia attualmente in uso in aree geografiche come la nostra in cui la resistenza alla claritromicina supera il 20%. Allo scopo ci si è avvalsi del sequenziamento dei ceppi isolati per mettere in luce mutazioni genotipiche che conferiscono fenotipo farmaco-resistente atipico.

In particolare sono state valutate mutazioni (mutazioni della sequenza nucleotidica e mutazioni della sequenza amminoacidica) in geni che codificano per ossidoreduttasi coinvolte nel processo di attivazione del metronidazolo mediante riduzione del gruppo nitroso frxA (hp0642), della NADPH-nitroreductasi ossigeno insensibile rdxA (NADPH flavin oxidoreductase), che di cofattori quali fdxA, fdxB (ferredoxine like protein), ma anche mutazioni che riguardano costituenti di sistemi di efflusso quali dppA (hp0298) dppB (hp0299) e proteine coinvolte nella riparazione del DNA come dapF (hp0566), ed altri come trx1 che sono stati indicati in letteratura come putativi responsabili di resistenza al metronidazolo (10, 11,12).

Obiettivo 3: Caratterizzazione molecolare dei fattori di virulenza dei ceppi *H. pylori* isolati.

Alcuni Autori hanno riportato che il grado di aggressività e l'evoluzione della patologia associata all'infezione da parte dell'*Helicobacter pylori* della mucosa gastrica (ulcera peptica e carcinoma gastrico), sembra essere legata alla capacità del patogeno di esprimere determinanti di virulenza che non tutti i ceppi possiedono o esprimono. L'indirizzo della presente ricerca è rivolto anche ad indagini in questo ambito: il terzo obiettivo è quello di caratterizzare mediante sequenziamento il genoma dei ceppi isolati. Questa analisi prevede lo studio di fattori di virulenza e l'analisi del genotipo cag A, Vac A, e dell'isola di patogenicità. Lo studio si prefigge come obiettivo terziario quello quindi di indagare circa l'assetto genico dei ceppi isolati dal bacino di utenza dell'IRCCS De Bellis, in quanto l'epidemiologia di questa infezione e della sua evoluzione è correlata con la distribuzione stessa dei ceppi Cag A⁺ Vac A⁺.

Stato di avanzamento del progetto (terza annualità):

Il progetto di ricerca ha preso avvio nell'Aprile 2017. Le attività del progetto sono state suddivise in fasi. Alcune di queste fasi sono state condotte parallelamente.

Reclutamento di pazienti idonei ed isolamento dei ceppi di *H. Pylori*

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) che rispondevano ai 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, non appartenenti a fasce di popolazioni fragili, con indicazione di esofago-gastro-duodeno-scopia (EGDS) con sintomatologia variabile.

Isolamento e caratterizzazione biochimica dei ceppi di *H. pylori*.

Tre biopsie di ciascun paziente, provenienti rispettivamente da *angulus*, corpo ed antro, sono state processate mediante tecniche colturali specifiche al fine di effettuare l'isolamento di *H. pylori*. Le biopsie raccolte in glucosata al 20% sterile

sono state processate entro 2 ore dalla raccolta. L'isolamento dell'*H. pylori* prevede l'omogenizzazione del campione biotico e la semina in terreni selettivi e di arricchimento contenenti specifici fattori di crescita strettamente necessari al patogeno e batteriostatici utili a ridurre la contaminazione possibile da altri batteri e funghi che nonostante i criteri di sterilità adottati può determinare il non isolamento dei ceppi di *H. pylori*. I terreni insemizzati sono stati incubati a 37°C in microaerofilia per almeno 10 giorni. Gli isolati sono stati identificati in base alla morfologia delle colonie, colorazione di gram e reazione positiva al test dell'ureasi della catalasi e dell'ossidasi.

Sono state condotte indagini microscopiche previa colorazione di Gram al fine di valutare la presenza e la densità del microrganismo nel campione biotico (dato indicativo della probabilità di buona riuscita dell'isolamento colturale).

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 specifiche.

La popolazione risultata positiva all'infezione da *H. pylori* è stata stratificata non solo in funzione del precedente trattamento antibiotico ma anche per genere, età scoperte endoscopiche e sintomatologia. I dati ottenuti sono descritti nella sezione risultati.

Screening fenotipico di farmacoresistenza:

Per ognuno dei 92 ceppi isolati sono state effettuate le prove di sensibilità a sei antibiotici: claritromicina, levofloxacina, amoxicillina, tetraciclina, metronidazolo e rifampicina al fine di valutare la resistenza primaria ed indotta post-trattamento nei confronti dei principali antibiotici che costituiscono le attuali terapie eradicanti. La classificazione del ceppo è effettuata in funzione alla Le prove sono state condotte mediante tecnica colturale (E-test) che prevedono la semina di una sospensione batterica (1.0×10^9 CFU/ml) in Mueller Hinton Fastidious II agar e l'incubazione a 37°C in microaerofilia per 72 ore in presenza strip antibiotiche a concentrazione logaritmica crescente. La Minima Concentrazione Inibente (MIC) espressa in mg/L per ogni ceppo e per ciascun antibiotico testato è stata utilizzata per classificare il ceppo in resistente (R), sensibile (S) e intermedio (I), secondo i criteri EUCAST (13) riportati in tabella 1.

Tabella 1 breakpoint EUCAST per *H. pylori*.

Helicobacter pylori

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 9.0,

Expert Rules and
Intrinsic Resistance
Tables

Disk diffusion criteria for antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* have not yet been defined and an MIC method should be used. If a commercial MIC method is used, follow the manufacturer's instructions.

| Penicillins | MIC breakpoints (mg/L) | | | Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. |
|-------------|------------------------|--------------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | ATU | |
| Amoxicillin | 0.125 ¹ | 0.125 ¹ | | 1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. |

| Fluoroquinolones | MIC breakpoints (mg/L) | | | Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. |
|------------------|------------------------|----------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | ATU | |
| Levofloxacin | 1 ¹ | 1 ¹ | | 1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. |

| Macrolides | MIC breakpoints (mg/L) | | | Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. |
|----------------|------------------------|------------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | ATU | |
| Clarithromycin | 0.25 ¹ | 0.5 ¹ | | 1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. |

| Tetracyclines | MIC breakpoints (mg/L) | | | Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. |
|---------------|------------------------|----------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | ATU | |
| Tetracycline | 1 ¹ | 1 ¹ | | 1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. |

| Miscellaneous agents | MIC breakpoints (mg/L) | | | Notes Numbered notes relate to general comments and/or MIC breakpoints. |
|----------------------|------------------------|----------------|-----|---|
| | S ≤ | R > | ATU | |
| Metronidazole | 8 ¹ | 8 ¹ | | 1. The breakpoints are based on epidemiological cut-off values (ECOFFs), which distinguish wild-type isolates from those with reduced susceptibility. |
| Rifampicin | 1 ¹ | 1 ¹ | | |

I dati ottenuti sono stati utilizzati per descrivere la frequenza e la distribuzione delle specifiche resistenze in funzione di genere, classe di età, sintomatologia associata e conclusioni endoscopiche ed eventuali precedenti trattamenti.

Caratterizzazione molecolare della resistenza alla claritromicina e ai fluorochinoloni:

Per ognuno dei ceppi isolati è stata condotta una caratterizzazione genotipica riguardante le resistenze relative a due dei sei antibiotici (claritromicina e levofloxacina) mediante amplificazione e ibridazione su strip. Allo scopo di questa caratterizzazione ci si è avvalsi di test molecolari CE-IVD che individuano le principali mutazioni nel genoma batterico di *H. pylori* associate rispettivamente a resistenza a claritromicina e fluorochinoloni. In particolare è stato possibile rilevare mutazioni del gene *rrl* associate a resistenza alla claritromicina quali A2142C, A2142G e A2143G e le mutazioni della regione QRDR del codone 87 (N87K e T87I) e del codone 91 (D91N, D91G e D91Y) associate alla resistenza alla levofloxacina, fluorochinolone utilizzato nell'eradicazione dell'infezione da *H. pylori*.

Questa fase ha previsto 3 differenti step:

1. Estrazione del DNA da ceppi isolati e quantificazione spettrofotometrica. Gli estratti utilizzati per le fasi successive avevano una concentrazione ≥ 50 ng/ml.
2. Amplificazione mediante multiplex PCR
3. Rivelazione mediante ibridazione su strip di nitrocellulosa.

Le mutazioni trovate associate a fenotipo antibiotico resistente sono state analizzate in funzione di caratteristiche del paziente quali genere, età, precedente trattamento scoperte endoscopiche e sintomatologia associata all'infezione al fine di individuare prevalenze specifiche delle mutazioni in sottogruppi della popolazione.

Le mutazioni sono state studiate anche in funzione delle MIC associate al fine di individuare quali fossero associate a valori più alti di concentrazioni di farmaco.

Le mutazioni T87I associate a resistenza ai fluorochinoloni sono state confermate mediante sequenziamento. Allo scopo è stato condotto allineamento delle sequenze con Bionumerics v7.6 (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, Belgium) per cercare tutti gli SNPs e le mutazioni aminoacidiche nel codone 87 che conferiscono resistenza ai fluorochinoloni.

Lo stesso dicasi per l'unico caso resistente alla amoxicillina.

Caratterizzazione molecolare della resistenza al metronidazolo:

Al fine della caratterizzazione molecolare della resistenza al metronidazolo è stata condotta l'analisi di otto sequenze del genoma batterico che in letteratura sono riportate come probabilmente associate a resistenza a questo farmaco mediante whole genome sequencing usando il workflow Nextera XT library preparation al fine di caratterizzare la popolazione batterica individuata. Il sequenziamento è stato condotto usando Illumina MiniSeq. Le paired-end raw reads sono state filtrate con Trimmomatic. L'assemblaggio e lo scaffolding è stato condotto con SPAdes v. 3.11. La predizione e la determinazione dei fattori di resistenza sono state condotte usando ARG-ANNOT (14), NCBI, CARD (15), ResFinder

(16) e PladmidFinder (17, 18,19) come database di riferimento. L'assemblaggio dei genomi è stato sottomesso a BLASTn Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide sequences of CARD (<https://card.mcmaster.ca/>).

La fase di sequenziamento è stata condotta presso l'Istituto Zooprofilattico di Puglia e Basilicata sez. di Putignano.

Sono stati studiati i profili di 49 ceppi isolati.

Sono state valutate mutazioni frameshift o delezioni sia della sequenza nucleotidica che della sequenza amminoacidica. Sono state analizzate le sequenze di geni che codificano rispettivamente per ossidoreduttasi coinvolte nel processo di attivazione del metronidazolo mediante riduzione del gruppo nitroso quali NADPH-nitroreductasi ossigeno insensibile (frxA (hp0642)), NADPH flavin oxidoreductase (rdxA), i cofattori ferredoxine like protein (fdxA, fdxB), ma anche sequenze che codificano costituenti di sistemi di efflusso quali dppA (hp0298) dppB (hp0299) e proteine coinvolte nella riparazione del DNA come dapF (hp0566), ed altri come trx1.

La presenza / assenza delle mutazioni in queste sequenze è stata analizzata in funzione della resistenza al metronidazolo e della MIC.

Caratterizzazione molecolare dei fattori di virulenza:

Mediante sequenziamento è stata valutata la presenza dei seguenti fattori di virulenza presenti in 84 dei 92 ceppi isolati. I fattori di virulenza studiati sono elencati in tabella 2.

Tabella 2 fattori di virulenza per *H. pylori*.

| | Gene | PRODUCT |
|-------------------|--------------------------------|--|
| Adherence | <i>sabB/hopO</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babA/hopS</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babB/hopT</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>hopZ</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>hopZ</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babA/hopS</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babB/hopT</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babB/hopT</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>babA/hopS</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>hopZ</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>hpaA2</i> | adhesin protein |
| | <i>babB/hopT</i> | outer membrane protein adhesin |
| | <i>sabB/hopO</i> | outer membrane protein adhesin |
| <i>sabA/hopP</i> | outer membrane protein adhesin | |
| Endotoxin LPS | <i>gluP</i> | glucose/galactose transporter |
| | <i>rfaC</i> | lipopolysaccharide heptosyltransferase-1 |
| | <i>rfaJ</i> | lipopolysaccharide 12-glucosyltransferase |
| | <i>rfbM</i> | mannose-6-phosphate isomerase |
| | <i>rfbD</i> | GDP-D-mannose dehydratase |
| | <i>wbcJ</i> | GDP fucose synthase |
| | <i>kdtB</i> | lipopolysaccharide core biosynthesis protein |
| | <i>gluE</i> | UDP-glucose 4-epimerase |
| | <i>rfaJ</i> | lipopolysaccharide 12-glucosyltransferase |
| | <i>lpxB</i> | lipid A disaccharide synthetase |
| | <i>wbpB</i> | lipopolysaccharide biosynthesis protein |
| Enzyme | <i>cds6</i> | LD-carboxypeptidase |
| | <i>ureA</i> | urease alpha subunit UreA |
| | <i>ureB</i> | urease beta subunit UreB urea amidohydrolase |
| | <i>ureI</i> | acid-activated urea channel protein |
| | <i>ureE</i> | urease accessory protein metallochaperone |
| | <i>ureF</i> | urease accessory protein |
| | <i>ureG</i> | urease accessory protein |
| | <i>ureH</i> | urease accessory protein |
| | <i>pdxJ</i> | pyridoxine 5'-phosphate synthase |
| | <i>pdxA</i> | 4-hydroxythreonine-4-phosphate dehydrogenase |
| | <i>pseB</i> | UDP-N-acetylglucosamine 46-dehydratase |
| Molecular mimicry | <i>neuA/flmD</i> | CMP-N-acetylneuraminic acid synthetase |
| | <i>futC</i> | fucosyltransferase |
| | <i>futA</i> | fucosyltransferase |

| | | |
|------------------------|-------------------------------------|---|
| | <i>futB</i> | fucosyltransferase |
| | <i>futA</i> | fucosyltransferase |
| | <i>futB</i> | fucosyltransferase |
| Motility | <i>fliN</i> | flagellar motor switch protein FliN |
| | <i>cheV3</i> | chemotaxis coupling protein CheV3 |
| | <i>flaA</i> | flagellin A FlaA |
| | <i>flaB</i> | flagellin B FlaB |
| | <i>tlpB</i> | membrane-bound chemoreceptor sensing pH and autoinducer-2 |
| | <i>tlpA</i> | membrane-bound chemoreceptor sensing arginine and bicarbonate |
| | <i>fliY</i> | flagellar motor switch protein |
| | <i>fliM</i> | flagellar motor switch protein FliM |
| | <i>fliA</i> | flagellar biosynthesis sigma factor FliA |
| | <i>ylxH</i> | ATP-binding protein |
| | <i>cheY</i> | chemotaxis response regulator CheY |
| | <i>flgG</i> | flagellar basal-body rod protein FlgG |
| | <i>fliH</i> | flagellar assembly protein H |
| | <i>fliG</i> | flagellar motor switch protein G |
| | <i>fliF</i> | flagellar M-ring protein FliF |
| | <i>flaG</i> | flagellar protein G |
| | <i>flgH</i> | flagellar L-ring protein precursor FlgH |
| | <i>flgL</i> | flagellar hook-associated protein 3 FlgL |
| | <i>HP0256</i> | involved in motility and cell envelope architecture |
| | <i>flgI</i> | flagellar P-ring protein precursor FlgI |
| | <i>flgS</i> | signal-transducing protein histidine kinase |
| | <i>fliQ</i> | flagellar biosynthesis protein |
| | <i>fliI</i> | flagellum-specific ATP synthase FliI |
| | <i>tlpC</i> | membrane-bound chemoreceptor |
| | <i>flgM</i> | negative regulator of flagellin synthesis |
| | <i>ylxH</i> | ATP-binding protein |
| | <i>flhF</i> | flagellar biosynthesis protein |
| | <i>flhA</i> | flagellar biosynthesis protein |
| | <i>flgR</i> | response regulator |
| | <i>fliE</i> | flagellar hook-basal body complex protein FliE |
| | <i>flgC</i> | flagellar basal-body rod protein FlgC |
| | <i>flgB</i> | flagellar basal body rod protein FlgB |
| | <i>flhB2</i> | ABC transporter putative |
| | <i>flgG</i> | flagellar basal-body rod protein |
| | <i>cheV1</i> | chemotaxis coupling protein CheV1 |
| | <i>flgA</i> | flagellar basal body P-ring biosynthesis protein FlgA |
| | <i>flgE</i> | flagellar hook protein |
| | <i>flgD</i> | flagellar basal-body rod modification protein FlgD |
| | <i>flgK</i> | flagellar hook-associated protein 1 FlgK |
| | <i>pseC</i> | flagellar modification protein aminotransferase PseC |
| | <i>cheW</i> | chemotaxis coupling protein CheW |
| | <i>cheA</i> | histidine kinase CheA |
| | <i>cheV2</i> | chemotaxis coupling protein CheV2 |
| | <i>fliR</i> | flagellar biosynthetic protein FliR |
| | <i>fliL</i> | flagellar basal body protein FliL |
| | <i>motA</i> | flagellar motor protein |
| | <i>motB</i> | flagellar motor protein |
| <i>flgE_1</i> | flagellar hook protein | |
| <i>pflA</i> | paralysed flagella protein | |
| <i>flaG</i> | flagellar protein FlaG | |
| <i>fliD</i> | flagellar capping protein FliD | |
| <i>fliS</i> | flagellar protein FliS | |
| <i>flhB</i> | flagellar biosynthesis protein | |
| <i>fliP</i> | flagellar biosynthetic protein FliP | |
| Proinflammatory effect | <i>napA</i> | neutrophil activating protein NapA |
| | <i>hopH</i> | outer inflammatory protein A adhesin |

| | | |
|----------------------------------|--------------------|---|
| | <i>cagP</i> | type IV secretion system protein Cag15/CagP |
| | <i>cagM</i> | type IV secretion system protein Cag16/CagM transmembrane channel protein |
| | <i>cagN</i> | type IV secretion system protein Cag17/CagN membrane-associated protein |
| | <i>virB5/cagL</i> | type IV secretion system protein Cag18/CagL VirB5 homolog |
| | <i>cagI</i> | type IV secretion system protein Cag19/CagI |
| | <i>cagH</i> | type IV secretion system protein Cag20/CagH |
| | <i>cagG</i> | type IV secretion system protein Cag21/CagG |
| | <i>cagF</i> | type IV secretion system protein Cag22/CagF chaperone-like protein for CagA |
| | <i>virB4/cagE</i> | type IV secretion system protein Cag23/CagE VirB4 homolog |
| | <i>cagD</i> | type IV secretion system protein Cag24/CagD |
| | <i>virB2/cagC</i> | type IV secretion system protein Cag25/CagC VirB2 homolog |
| | <i>cag1</i> | type IV secretion system protein Cag1 |
| | <i>cag2</i> | type IV secretion system protein Cag2 |
| | <i>cag2</i> | type IV secretion system protein Cag2 |
| | <i>cag3</i> | type IV secretion system protein Cag3 component outer membrane subcomplex |
| Type IV secretion system protein | <i>virB1</i> | type IV secretion system protein Cag4 VirB1 homolog |
| | <i>virD4</i> | type IV secretion system protein Cag5 VirD4 homolog |
| | <i>virB11</i> | type IV secretion system ATPase VirB11 homolog |
| | <i>cagZ</i> | type IV secretion system protein Cag6/CagZ |
| | <i>virB10/cagY</i> | type IV secretion system protein Cag7/CagY VirB10 homolog |
| | <i>virB10/cagY</i> | type IV secretion system protein Cag7/CagY VirB10 homolog |
| | <i>virB10/cagY</i> | type IV secretion system protein Cag7/CagY VirB10 homolog |
| | <i>virB9/cagX</i> | type IV secretion system protein Cag8/CagX VirB9 homolog |
| | <i>virB6/cagW</i> | type IV secretion system protein Cag9/CagW VirB6 homolog |
| | <i>virB8/cagV</i> | type IV secretion system protein Cag10/CagV VirB8 homolog |
| | <i>cagU</i> | type IV secretion system protein Cag11/CagU |
| | <i>virB7/cagT</i> | type IV secretion system protein Cag12/CagT VirB7 homolog |
| | <i>cagS</i> | type IV secretion system protein Cag13/CagS |
| | <i>cagQ</i> | type IV secretion system protein Cag14/CagQ |
| | <i>cagP</i> | type IV secretion system protein Cag15/CagP |
| | <i>vacA</i> | vacuolating cytotoxin |
| | <i>cagA</i> | cag T4SS translocated effector CagA |
| | <i>cagA</i> | cag T4SS translocated effector CagA |
| | <i>cagA</i> | cag T4SS translocated effector CagA |

La presenza /assenza dei fattori di virulenza è stata analizzata in funzione delle caratteristiche dei pazienti quali età, genere, precedente trattamento risultati endoscopici e sintomatologia dei pazienti da cui i ceppi sono stati isolati. Inoltre, la frequenza dei fattori di virulenza è stata studiata in funzione delle caratteristiche fenotipiche dei ceppi isolati quali resistenza a ciascuno dei 6 antibiotici testati, alle MIC associate e alla multiresistenza. Inoltre, è stata studiata l'eventuale associazione tra fattori di virulenza e mutazioni associate a resistenza a claritromicina e fluorochinoloni. I risultati ottenuti sono descritti nella sezione Risultati.

Dati preliminari:

- Reclutamento dei pazienti:

I pazienti per lo studio sono stati reclutati in base ai seguenti criteri:

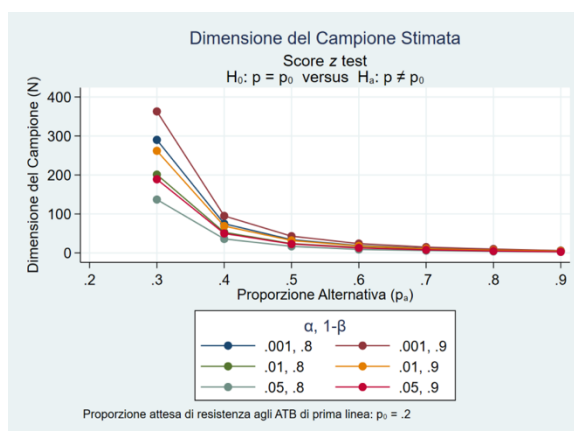
Criteri di inclusione: pazienti risultati positivi a test non invasivi per la valutazione della presenza di infezione da *H. pylori* come Urea Breath Test (ed altri) con prescrizione medica di esofagogastroduodenoscopia (EGDS) con prelievi biotici.

Criteri di esclusione: pazienti appartenenti a popolazioni fragili quali bambini fino a 17 anni di età, anziani di età superiore ai 64 anni e donne in stato di gravidanza e allattamento. Pazienti sottoposti a recenti (tre mesi) terapie antibiotiche.

- Stima della dimensione del campione: In base ai dati riportati in letteratura è stata ipotizzata una prevalenza del 20% di antibiotico-resistenza agli antibiotici utilizzati nelle terapie di eradicazione di prima e seconda linea anche per quanto riguarda la popolazione che costituisce il bacino di utenza. La dimensione del campione è stata stimata considerando un errore probabilistico del tipo I da 0.05 a 0.001 ed un errore probabilistico di tipo II da 0.1 a 0.2.

È stata stimata pertanto una dimensione pari a N = 200 pazienti come si può osservare nel grafico 1 di seguito riportato.

Grafico 1 studio dell'analisi del campione



Metodologie e analisi statistiche:

La stima delle differenze nei patterns di sensibilità agli antibiotici è stata saggiata tramite test di differenze di proporzione. Per verificare la significatività dei dati raccolti ci si avvarrà di test di Student, χ^2 -tests, il Fisher's exact test per campioni con osservazioni con $n < 5$ e il test Mann-Whitney per variabili valori ordinali provenienti da una distribuzione continua come nel caso dello studio delle MIC, utilizzando specifici software per l'analisi statistica.

Risultati ottenuti:

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 48.7, 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 18 e i 65 anni, con indicazione di esofago-gastro-duodeno-scopia (EGDS) con sintomatologia variabile.

Tre biopsie di ciascun paziente, provenienti rispettivamente da *angulus*, corpo ed antro, sono stati processati mediante tecniche culturali 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 fallimentari 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, sebbene dati relativi a aree geografiche nazionali siano discordanti e spesso notevolmente differenti.

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. Le caratteristiche demografiche quali età e sesso dei pazienti HP-positivi sono descritte in tabella 1 insieme ai dati clinici quali 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.

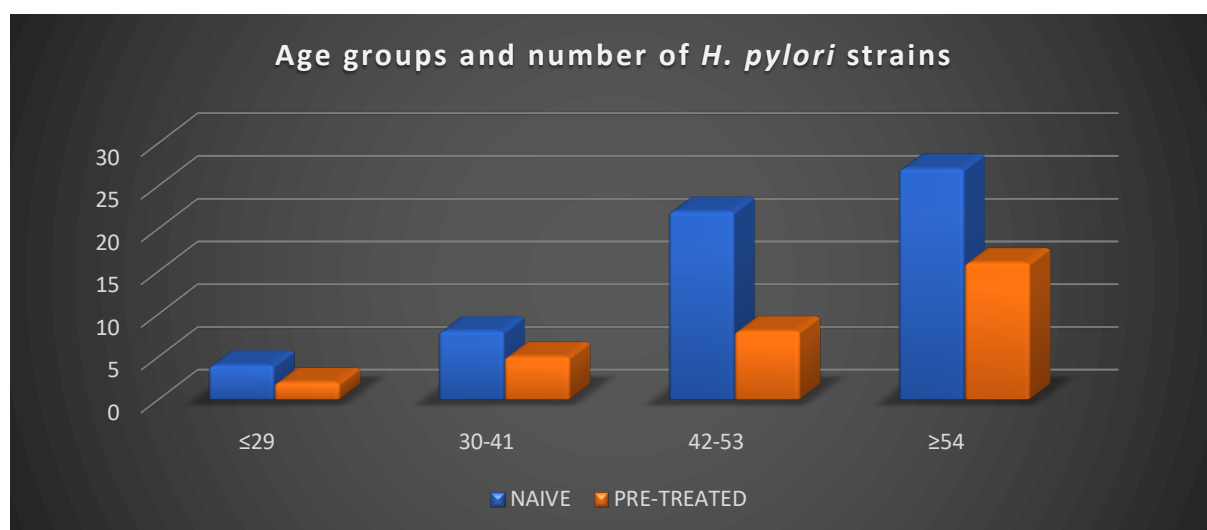
Tabella 3 caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti HP-positivi

| Characteristic | Total n (%) | Naïve n (%) | Treated n (%) |
|----------------|-------------|-------------|---------------|
| Age (years) | | | |
| ≤ 29 | 6 (6.6) | 4 (6.6) | 2 (6.5) |
| 30 – 41 | 13 (14.1) | 8 (13.1) | 5 (16.1) |
| 42 – 53 | 30 (32.6) | 22 (36.1) | 8 (25.8) |
| ≥ 54 | 43 (46.7) | 27 (44.2) | 16 (51.6) |

| <i>Sex</i> | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|
| Male | 38 (41.3) | 26 (42.6) | 12 (38.7) |
| Female | 54 (58.7) | 35 (57.4) | 19 (61.3) |
| <i>Symptoms</i> | | | |
| Epigastralgia | 67 (72.8) | 41 (67.2) | 26 (83.9) |
| Gastroesophageal reflux | 17 (18.5) | 14 (22.9) | 3 (9.7) |
| Dysphagia | 11 (12.0) | 9 (18.0) | 2 (35.5) |
| Anemia and / or intestinal haemorrhage | 6 (6.5) | 6 (9.8) | 0 (0) |
| <i>Endoscopic findings</i> | | | |
| Gastritis | 87 (94.6) | 57 (93.4) | 30 (96.8) |
| Hiatal hernia and / or cardiac incontinence | 29 (31.5) | 24 (39.3) | 5 (16.1) |
| Duodenitis and / or duodenal ulcer | 20 (21.7) | 17 (27.9) | 3 (9.7) |
| Esophagitis | 15 (16.3) | 12 (19.7) | 3 (9.7) |

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 2).

Grafico 2 *H. pylori* e classi di età



Antibiotico resistenza in *H. pylori*

Per ogni ceppo isolato sono stati effettuati test di sensibilità fenotipica verso sei antibiotici (claritromicina, levofloxacina, amoxicillina, tetraciclina, rifampicina e metronidazolo). Il primo dato emerso da queste analisi è la differenza dei pattern di sensibilità riscontrati tra ceppi isolati da pazienti mai trattati (naive) rispetto che ceppi isolati da pazienti già trattati (pre-treated): in particolare la resistenza ha percentuali maggiori per questo secondo gruppo. Le differenze tra resistenza in ceppi provenienti da pazienti naive e pazienti pre-treated è statisticamente significativa per claritromicina, levofloxacina e metronidazolo ($p < 0.05$). Un altro interessante dato è l'ampio grado di sensibilità che i ceppi isolati mostrano nei confronti dell'amoxicillina della tetraciclina e della rifampicina. Questo dato è incoraggiante e 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 (tabella 4).

Tabella 4 resistenza antibiotica in pazienti naive e trattati.

| <i>Antibiotic</i> | <i>Resistant strain</i> | | |
|------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>Total n (%)</i> | <i>Naïve n (%)</i> | <i>Treated n (%)</i> |
| <i>Clarithromycin*</i> | 49 (53.3) | 23 (37.7) | 26 (83.9) |
| <i>Levofloxacin*</i> | 36 (39.1) | 16 (26.2) | 20 (64.5) |
| <i>Metronidazole*</i> | 30 (32.6) | 10 (16.4) | 20 (64.5) |
| <i>Amoxicillin</i> | 3 (3.3) | 1 (1.6) | 2 (6.5) |
| <i>Rifampicin</i> | 1 (1.1) | 1 (1.6) | 0 (0.0) |
| <i>Tetracycline</i> | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) |

*, p values < 0.05 , resistance vs treatment. P values were calculated by χ^2 tests.

Analizzando la frequenza dei ceppi multiresistenti (resistenti a due o più antibiotici) si osserva ancora una volta una differenza significativa ($p < 0.05$) tra ceppi isolati da pazienti naive e ceppi isolati da pazienti pre-treated. Infatti, nei pazienti sottoposti in passato a precedenti terapie eradicanti si riscontra anche un maggiore tasso di resistenze multiple rispetto che nei pazienti naive (tabella 5).

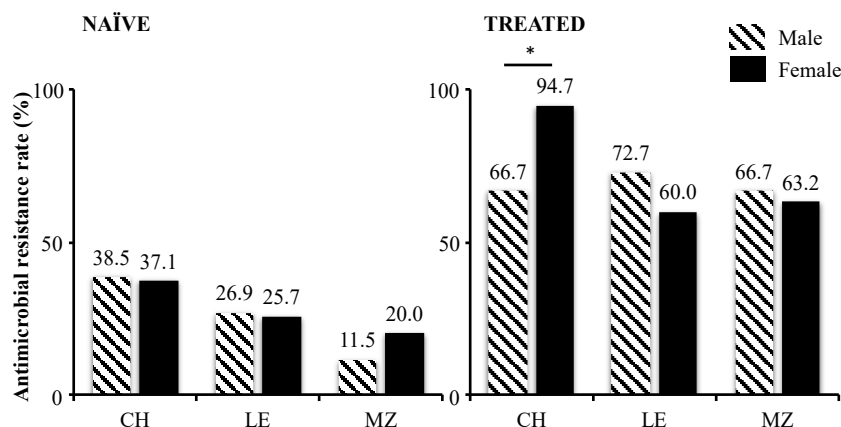
Tabella 5 multifarmaco resistenza in *H. pylori* isolati da pazienti naive e trattati

| Antibiotics | Total n (%) | Naïve n (%) | Treated n (%) |
|---|-------------|-------------|---------------|
| Clarithromycin + levofloxacin | 10 (10.9) | 7 (11.5) | 3 (9.7) |
| Levofloxacin + metronidazole | 2 (2.2) | 0 (0.0) | 2 (6.5) |
| Clarithromycin + metronidazole | 7 (7.6) | 3 (4.9) | 4 (12.9) |
| Metronidazole + amoxicillin | 1 (1.1) | 1 (1.6) | 0 (0.0) |
| Levofloxacin + rifampicin | 1 (1.1) | 1 (1.6) | 0 (0.0) |
| Clarithromycin + levofloxacin + metronidazole | 13 (14.1) | 1 (1.6) | 12 (38.7) |
| Clarithromycin + levofloxacin + metronidazole + amoxicillin | 2 (2.2) | 0 (0.0) | 2 (6.5) |
| * S to all antibiotics | 26 (28.3) | 24 (39.3) | 2 (6.5) |
| R to one antibiotic | 30 (32.6) | 24 (39.3) | 6 (19.4) |
| R to ≥ 2 antibiotics | 36 (39.1) | 13 (21.3) | 23 (74.2) |

S, susceptible; R, resistant; *, p value < 0.01 , multiple resistance vs treatment. P value was calculated by χ^2 test.

Da questi dati emerge che quasi il 40% dei ceppi isolati da pazienti naive 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 di 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 associazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) osservata tra sesso femminile e resistenza alla claritromicina (grafico 3).

Grafico 3 Resistenza antibiotica vs genere.

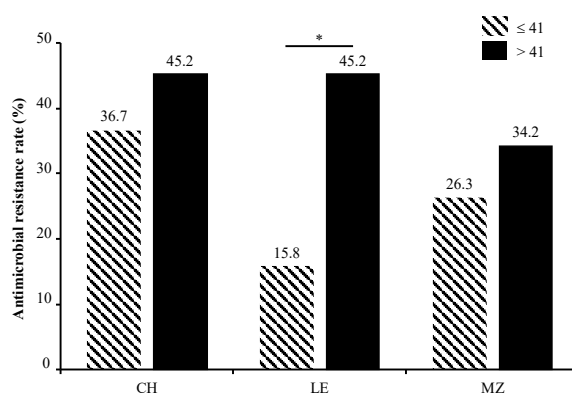


CH, clarithromycin; LE, levofloxacin; MZ, metronidazole; *, p value < 0.05 , clarithromycin resistance vs gender in treated patients. P value was calculated by χ^2 test.

Eseguendo la stratificazione in funzione della classe di età ed in funzione alla resistenza a tre specifici antibiotici quali claritromicina, levofloxacina 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 levofloxacina. Sebbene la maggiore diffusione della resistenza alla claritromicina nei pazienti più giovani non abbia significatività statistica, mostra una tendenza spiegabile con l'ampio uso dei macrolidi nelle popolazioni giovani anche talvolta in modo inappropriato.

In particolare, esaminando la distribuzione dei ceppi resistenti alla levofloxacina in pazienti pre-treated si osserva associazione statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra età superiore ai 41 anni e resistenza alla levofloxacina (grafico 4).

Grafico 4 Resistenza antibiotica vs età in ceppi isolati da pazienti pre-treated



CH, clarithromycin; LE, levofloxacin; MZ, metronidazole; *, p value < 0.05 , levofloxacin resistance vs age. P value was calculated by χ^2 test.

Per ogni antibiotico testato sono stati individuati i valori della MIC₅₀ e della MIC₉₀ al fine di osservare eventuali associazioni tra i valori più alti di MIC e sottogruppi nella popolazione.

Tabella 6 MIC₅₀ e MIC₉₀ in ceppi *H. pylori* isolati da pazienti naive e pre-treated

| Antibiotic | Total | | Naïve | | Treated | |
|----------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | MIC ₅₀ (mg/L) | MIC ₉₀ (mg/L) | MIC ₅₀ (mg/L) | MIC ₉₀ (mg/L) | MIC ₅₀ (mg/L) | MIC ₉₀ (mg/L) |
| Clarithromycin | 2 | 256 | 0.032 | 256 | 8 | 256 |
| Levofloxacin | 0.25 | 32 | 0.19 | 32 | 8 | 32 |
| Metronidazole | 0.75 | 256 | 0.5 | 192 | 256 | 256 |
| Amoxicillin | 0.016 | 0.094 | 0.016 | 0.064 | 0.016 | 0.125 |
| Rifampicin | 0.38 | 1.0 | 0.38 | 1.0 | 0.38 | 1.0 |
| Tetracycline | 0.032 | 0.094 | 0.032 | 0.094 | 0.032 | 0.25 |

Indagini di tipo molecolare costituenti la seconda parte del progetto di ricerca ed 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 (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 mettono in luce che mentre tra i ceppi isolati da pazienti naive la resistenza fenotipica alla claritromicina ha una base genotipicamente eterogenea, tra i ceppi sottoposti a pressione selettiva causata da precedenti trattamenti la

principale causa di resistenza è dovuta in modo spiccato alla mutazione A2143G. In particolare è stata riscontrata una associazione statisticamente significativa tra precedente trattamento e mutazioni in posizione 2143 (tabella 7).

Tabella 7 distribuzione delle mutazioni puntiformi nella regione 23S rRNA di *H. pylori* isolati da pazienti naive e pazienti pre-treated

| <i>Genotype</i> | <i>Total n (%)</i> | <i>Naïve n (%)</i> | <i>Treated n (%)</i> | |
|-------------------------|-------------------------|--------------------|----------------------|-----------|
| <i>no mutation (WT)</i> | 43 (46.7) | 38 (62.3) | 5 (16.1) | |
| <i>WT + mutation</i> | 7 (7.6) | 7 (11.5) | 0 (0.0%) | |
| <i>Mutation</i> | 42 (45.6) | 16 (26.2) | 26 (83.9) | |
| <i>Mutation</i> | | | | |
| <i>Single mutation</i> | | | | |
| <i>A2143G</i> | 37 (75.5) | 14 (61.0) | 23 (88.5) | |
| <i>A2142G</i> | 6 (12.2) | 4 (17.4) | 2 (7.7) | |
| <i>A2142C</i> | 1 (2.0) | 1 (4.3) | 0 (0.0) | |
| <i>Double mutation</i> | | | | |
| <i>A2142G + A2142C</i> | 2 (4.1) | 2 (8.7) | 0 (0.0) | |
| <i>A2142G + A2143G</i> | 3 (6.1) | 2 (8.7) | 1 (3.8) | |
| * | <i>Mutation in 2143</i> | 37 (40.2) | 14 (23.0) | 23 (74.2) |
| | <i>Mutation in 2142</i> | 9 (9.8) | 7 (11.5) | 2 (6.5) |

WT, wild type *rrl*; *, *p* value < 0.05, mutation in 2143 and in 2142 vs treatment. *P* value was calculated by χ^2 test.

I valori di MIC nei confronti della claritromicina sono stati analizzati in funzione della mutazione in regione 23S rRNA caratterizzante al fine di valutare la possibile associazione tra mutazioni e MIC elevata. I dati raccolti sono mostrati in tabella 8.

Tabella 8 associazione tra MIC value e mutazioni associate alla resistenza alla claritromicina

| <i>MIC Range (mg/L)</i> | <i>Mutation in 2143</i> | <i>Mutation in 2142</i> | |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---|
| * | 0.75 – 16 | 18 | 1 |
| | > 16 | 19 | 8 |
| <i>MIC₅₀</i> | 16 (mg/L) | 256 (mg/L) | |
| <i>MIC₉₀</i> | 256 (mg/L) | 256 (mg/L) | |

MIC, minimum inhibitory concentration; *, *p* value < 0.05, mutation in 2143 and in 2142 vs MIC range. *P* value was calculated by χ^2 test.

I dati mostrano che la presenza di mutazione in posizione 2143 è statisticamente associata in maniera significativa con più bassi valori di MIC₅₀ mentre le mutazioni 2142 sono associate a valori estremamente alti di MIC₅₀.

La resistenza ai fluorochinoloni in *H. pylori* è stata associata a mutazioni nella regione QRDR del gene che codifica per la girasi A. 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.

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. 56 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.

Mutazioni nel codone 87 sono state trovate nel 63,9% dei ceppi resistenti. In particolare, la mutazione N87K è stata rilevata in nel 91,3% di questi mentre la mutazione T87I è stata trovata nel restante 8,7%. La mutazione T87I è la probabile responsabile di resistenza ai fluorochinoloni in assenza di bande wild type e di bande associate a mutazioni. In questi 2 ceppi la presenza della mutazione T87I è stata confermata quindi dal sequenziamento.

Mutazioni nel codone 91 sono state riscontrate nel 36,1% dei ceppi resistenti. In particolare, il 46,1% di questi ceppi presentava mutazione D91N, il 30,8% aveva mutazione D91Y e il 23,1% aveva mutazione D91G.

Quindi la mutazione più frequente rilevata nei ceppi resistenti è stata N87K (58,3%), seguita da D91N (16,7%), D91Y (11,1%), D91G (8,3%) e T87I (5,6%). Non è stata trovata alcuna associazione tra una specifica mutazione e un precedente trattamento, età o sesso. I dati sono mostrati nella Tabella 9.

Tabella 9 genotipi del codone 87 e del codone 91 nella regione QRDR in *H. pylori*.

| Genotype | | Total n (%) | Naïve n (%) | Treated n (%) | |
|----------|----------------|-------------|-------------|---------------|----------|
| S | 87 WT1 + 91 WT | 32 (57.1) | 25 (55.6) | 7 (63.6) | |
| | 87WT2 + 91 WT | 24 (42.9) | 20 (44.4) | 4 (36.4) | |
| R | 87 MUT + 91 WT | N87K | 8 (88.9) | 13 (92.9) | |
| | | T87I | 2 (8.7) | 1 (7.1) | |
| | 87 WT + 91 MUT | D91N | 6 (46.1) | 2 (28.6) | 4 (66.5) |
| | | D91Y | 4 (30.8) | 3 (42.8) | 1 (16.7) |
| | | D91G | 3 (23.1) | 2 (28.6) | 1 (16.7) |

WT, wild type codon; WT1, AAC wild type profile of codon 87; WT2, AAT wild type profile of codon 87, MUT mutated codon, S, susceptible; R, resistant.

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.

Così come per la claritromicina anche per la resistenza alla levofloxacina non è stata trovata associazione tra mutazioni determinanti resistenza, età, genere, conclusioni endoscopiche e sintomi dei pazienti.

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 10).

Tabella 10 Mutazioni del gene nella regione QRDR e MIC.

| MIC Range (mg/L) | Mutation in codon 87 | Mutation in codon 91 |
|-------------------|----------------------|----------------------|
| * | 1.5 – 6 | 6 |
| | > 6 | 7 |
| MIC ₅₀ | 32 (mg/L) | 12 (mg/L) |
| MIC ₉₀ | 32 (mg/L) | 32 (mg/L) |

MIC, minimum inhibitory concentration; *, *p* value < 0.05, mutation in codon 87 and mutation in codon 91 vs MIC range. *P* value was calculated by Fisher test.

Dall'analisi di questi dati emerge che le mutazioni nel codone 87 (N87K, T87I) le più frequentemente riscontrate, sono statisticamente associate con valori di MIC₅₀ più elevati (oltre 6 mg / L) mentre le mutazioni nel codone 91 sono associate a una MIC₅₀ più bassa (valore *p* < 0,05) (Tabella 10).

I dati relativi a questa sezione sono oggetto di un lavoro scientifico sottomesso presso la rivista Microbial Drug Resistance.

Resistenza al metronidazolo

Per quanto riguarda la resistenza al metronidazolo in *H. pylori* attualmente poco si conosce circa i meccanismi molecolari che sottendono 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 esplichi 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 46 ceppi isolati.

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'ossidazione 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 (depeptide ABC transporter periplasmic dipeptide-binding protein (dppA) e permease protein (dppB) che funzionano quali drug efflux pump), dapF diaminopimelate epimerase (dapF) e trx1 (una tioredoxina) con il fine di caratterizzare genotipicamente la resistenza per questa classe di antibiotici in *H. pylori* (13, 14

Tabella 11 Mutazioni in frxA, rdxA fdxA, fdxB, dppA, dppB dapF e trx1 in ceppi di *H. pylori*

| Strain | Treatment (N,T) | Resistance (R,S) | MIC value | Mutation in frxA | | Mutation in rdxA | Mutation in dppA | Mutation in dppB | Mutation in dapF | Mutation in fdxA | Mutation in fdxB | Mutation in trx1 |
|--------|-----------------|------------------|-----------|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| 1 | N | S | 0.023 | Frameshift or A → G | Change in aminoacid sequence | Change in nucleotide sequence | Change in nucleotide sequence | Change in nucleotide sequence | Change in nucleotide sequence | Change in aminoacid sequence | Change in nucleotide sequence | Change in aminoacid sequence |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 2 | N | R | 256 | + | | Gly → Ala | Ala → Glu | Ile → Val | Gln → Lys | Asn → Lys | Met → Arg | Ser → Asn |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 3 | N | R | 256 | | | Arg → His | Gln → Glu | Ile → Val | Val → Thr | Ser → Ile | + | + |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 4 | N | S | 0.25 | + | | Arg → Cys | Ile → Val | Ile → Val | Val → Thr | Ser → Ile | + | + |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 6 | N | S | 0.125 | | | Ser → Pro | Ile → Val | Ile → Val | Val → Thr | Ser → Ile | + | + |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 9 | T | R | 256 | + | | Ala → Glu | Gln → Glu | Ile → Val | Val → Thr | Ser → Ile | + | + |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| 10 | N | S | 0.19 | | | Arg → Cys | Ile → Val | Ile → Val | Val → Thr | Ser → Ile | + | + |
| | | | | Position | Change in nucleotide sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |
| | | | | Position | Change in aminoacid sequence | | | | | | | |

| | | | | |
|-------------------------|-------------------------|----|-----|-----|
| Mutation in position 46 | Frameshift of A A->G | 15 | 256 | 256 |
|-------------------------|-------------------------|----|-----|-----|

| rdxA | | | | |
|-------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Number of strains | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
| Wild type | | 43 | 1 | 256 |
| Mutation in position 3 | Gly→Ala | | | |
| Mutation in position 16 | Arg→His Arg→Cys | 6 | 1 | 256 |
| Mutation in position 88 | Ser→Pro | | | |

| dppA | | | | |
|----------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Number of strains | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
| Wild type | | 5 | 256 | 256 |
| Mutation | | 44 | 1 | 256 |
| <i>Ala -> Glu (212)</i> | | 20 | 1 | 256 |
| <i>Ile -> Val (485)</i> | | 7 | 1.5 | 256 |
| <i>Gln -> Glu (382)</i> | | 3 | 64 | 256 |

Come si può osservare per quanto riguarda le mutazioni del gene *dppA* queste sono associate alla maggiore MIC₅₀ più bassa mentre il profilo wilde-type a valori di MIC più alte.

Il dato è apparso interessante e si è proceduto andando a valutare se il numero di mutazioni accumulate in questo gene potesse essere responsabile dell'acquisizione di un fenotipo caratterizzato da valori di MIC inferiori.

I dati sono riportati in tabella 13.

Tabella 13 Mutazioni in *dppA*: MIC₅₀ e MIC₉₀ per numero di mutazioni accumulate nel gene *ddpA*

| dppA | | | | |
|-------------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Number of strains | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
| Wild type (no mutation) | | 5 | 256 | 256 |
| Mutation | | 44 | 1 | 256 |
| <i>1 mutation</i> | | 30 | 1 | 256 |
| <i>2 mutations</i> | | 10 | 0.38 | 192 |
| <i>3 mutations</i> | | 4 | 0.125 | 256 |

Questa tabella mette in luce il fatto che più mutazioni si accumulano in *dppA* e più diminuisce il valore della MIC. Questo dato potrebbe essere spiegato considerando che le mutazioni producono un trasportatore di dipeptidi meno efficiente e che di conseguenza probabilmente il sistema di accumulo di sostanze ridotte per il fabbisogno metabolico del batterio è meno efficace. Questa condizione di carenza di nutrienti potrebbe rendere il batterio più sensibile all'azione del Metronidazolo.

Altra spiegazione potrebbe essere quella di considerare il trasportatore come anche pompa di efflusso in grado, quando non ha mutazioni di trasportare all'esterno gli antibiotici. Questo dato è avvalorato da dati in letteratura che riportano che in ceppi che non hanno mutazioni in *rdxA* e *frxA* (principali responsabili di r al metronidazolo) si osserva una overespressione di *dppA* (elevato numero di copie) (20). Quante più mutazioni si accumulano in *dppA* quindi meno bene funziona la pompa di efflusso, quindi meno molecole di metronidazolo possono essere trasportate fuori, quindi accumulare mutazioni in questo gene rende il ceppo più sensibile a concentrazioni minori di farmaco. Al contrario quante meno mutazioni ha il sistema meno è resistente il ceppo perché il trasportatore funziona meglio non avendo mutazioni. A supporto di questa ipotesi è il fatto che i ceppi che hanno un *dppA* senza mutazioni sono anche Multifarmacoresistenti. Lo stesso tipo di considerazioni sono state fatte per il gene *dapF* e i dati ottenuti sono riportati in tabella 14 e 15.

Tabella 14 Mutazioni in *dapF*: MIC₅₀ e MIC₉₀ per singole mutazioni

| dapF | | | | |
|--------------------------|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Number of strains | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
| Total of strains | | 49 | 1 | 256 |
| Mutation in position 117 | <i>Gln -> Lys</i> | 2 | 192 | 256 |
| | <i>Val -> Thr</i> | 11 | 1.5 | 256 |

| | | | | |
|-----------------------------|--|---|-----|-----|
| Mutation in position 121 | <i>Val -> Ala</i> | 1 | 256 | 256 |
| Mutation in position 221 | <i>Arg -> His</i> <i>Arg -> Cys</i> | 0 | | |
| Mutation in position 168 | <i>Thr -> Met</i> | 0 | | |

Tabella 15 Mutazioni in *dapF*: MIC₅₀ e MIC₉₀ per numero di mutazioni accumulate nel gene

| <i>dapF</i> | Number of strains | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Wild type (no mutation) | 0 | | |
| Mutation | 49 | 1 | 256 |
| <i>1 mutation</i> | <i>14</i> | <i>32</i> | <i>256</i> |
| <i>2 mutations</i> | <i>27</i> | <i>1</i> | <i>192</i> |
| <i>3 or more mutations</i> | <i>8</i> | <i>1</i> | <i>256</i> |

All'aumentare del numero di mutazioni nel gene che codifica per *dapF* si osserva la diminuzione della MIC₅₀. Anche in questo caso il dato potrebbe essere spiegato considerando il prodotto genico di questo gene come un fattore che rende possibile l'azione del metronidazolo su *H. pylori*. Pertanto, la presenza di mutazioni e soprattutto l'accumulo delle mutazioni in questo gene porterebbe ad un prodotto che è inefficace nel creare le condizioni opportune per l'azione batteriostatica di questa molecola.

Ulteriori analisi e l'estensione dello studio di questa mutazione sono richieste per confermare queste ipotesi.

Fattori di virulenza e antibiotico resistenza

Considerando che in letteratura sono già ampiamente riportate le associazioni tra la presenza di fattori di virulenza e outcome clinico del paziente infetto e che invece solo recentemente si sta proponendo una associazione tra la presenza di questi e la resistenza antibiotica, è stato obiettivo di questa ricerca quello di cercare relazioni tra i fattori di virulenza e la resistenza antibiotica. Pertanto, il primo passo è stato quello di analizzare le frequenze dei fattori di virulenza in 84 dei ceppi di *H. pylori* isolati.

I fattori di virulenza sono stati divisi in sette categorie: Adherence, Endotoxin LPS, Enzyme, Molecular mimicry, Motility, Proinflammatory effect, Type IV secretion system protein, e per ognuno di essi si sono misurate le frequenze nei ceppi di *H. pylori* analizzati. I dati sono riportati in tabella 16 a, b, c, d, e, f, g.

Tabella 16 a, b, c, d, e, f, g: percentuali dei fattori di virulenza in *H. pylori*

| | | | | | | | | | |
|---------------------------------------|----------------------|------------------|---------|--------------|---------------|-------------|---------|--------------------|--------|
| a | adherence | <i>sabB/hopO</i> | 71.43% | f | <i>fljN</i> | 100,00% | g | <i>cagP</i> | 51.19% |
| | | <i>babA/hopS</i> | 96.43% | | <i>cheV3</i> | 98.81% | | <i>cagM</i> | 57.14% |
| | | <i>babB/hopT</i> | 98.81% | | <i>flaA</i> | 97.62% | | <i>cagN</i> | 57.14% |
| | | <i>hopZ</i> | 100,00% | | <i>flaB</i> | 98.81% | | <i>virB5/cagL</i> | 58.33% |
| | | <i>hpaA2</i> | 98.81% | | <i>tlpB</i> | 97.62% | | <i>cagI</i> | 57.14% |
| <i>sabA/hopP</i> | 97.62% | <i>tlpA</i> | 100,00% | | <i>cagH</i> | 57.14% | | | |
| b | Endotoxin LPS | <i>gluP</i> | 100,00% | | <i>fljY</i> | 100,00% | | <i>cagG</i> | 57.14% |
| | | <i>rfaC</i> | 100,00% | | <i>fljM</i> | 100,00% | | <i>cagF</i> | 57.14% |
| | | <i>rfaJ</i> | 100,00% | | <i>fljA</i> | 100,00% | | <i>virB4/cagE</i> | 59.52% |
| | | <i>rfbM</i> | 100,00% | | <i>ylxH</i> | 100,00% | | <i>cagD</i> | 58.33% |
| | | <i>rfbD</i> | 100,00% | | <i>cheY</i> | 98.81% | | <i>virB2/cagC</i> | 59.52% |
| | | <i>wbcJ</i> | 100,00% | | <i>flgG</i> | 100,00% | | <i>cag1</i> | 60.71% |
| | | <i>kdtB</i> | 100,00% | | <i>fljH</i> | 100,00% | | <i>cag2</i> | 41.67% |
| | | <i>gluE</i> | 100,00% | | <i>fljG</i> | 100,00% | | <i>cag3</i> | 59.52% |
| | | <i>lpxB</i> | 100,00% | | <i>fljF</i> | 100,00% | | <i>virB1</i> | 60.71% |
| | | <i>wbpB</i> | 100,00% | | <i>fljI</i> | 100,00% | | <i>virD4</i> | 60.71% |
| | | <i>fljC</i> | 100,00% | | <i>flaG</i> | 100,00% | | <i>virB11</i> | 58.33% |
| c | enzyme | <i>cds6</i> | 98.81% | | <i>flgH</i> | 98.81% | | <i>cagZ</i> | 57.14% |
| | | <i>ureA</i> | 100,00% | | <i>flgL</i> | 100,00% | | <i>virB10/cagY</i> | 73.81% |
| | | <i>ureB</i> | 100,00% | | <i>HP0256</i> | 97.62% | | <i>virB9/cagX</i> | 58.33% |
| | | <i>ureI</i> | 100,00% | | <i>flgI</i> | 100,00% | | <i>virB6/cagW</i> | 58.33% |
| | | <i>ureE</i> | 100,00% | | <i>flgS</i> | 100,00% | | <i>virB8/cagV</i> | 58.33% |
| | | <i>ureF</i> | 100,00% | | <i>fljQ</i> | 100,00% | | <i>cagU</i> | 57.14% |
| | | <i>ureG</i> | 100,00% | | <i>fljI</i> | 100,00% | | <i>virB7/cagT</i> | 58.33% |
| | | <i>ureH</i> | 100,00% | | <i>tlpC</i> | 100,00% | | <i>cagS</i> | 57.14% |
| | | <i>pdxJ</i> | 100,00% | <i>flgM</i> | 98.81% | <i>cagQ</i> | 51.19% | | |
| | | <i>pdxA</i> | 100,00% | <i>flhF</i> | 100,00% | <i>vacA</i> | 100,00% | | |
| | | <i>pseB</i> | 100,00% | <i>flhA</i> | 100,00% | <i>cagA</i> | 58.33% | | |
| d | molecular mimicry | <i>neuA/flmD</i> | 98.81% | <i>flhR</i> | 100,00% | | | | |
| | | <i>futC</i> | 100,00% | <i>fljE</i> | 98.81% | | | | |
| | | <i>futA</i> | 89.29% | <i>flgC</i> | 98.81% | | | | |
| | | <i>futB</i> | 90.48% | <i>flgB</i> | 100,00% | | | | |
| P ^o inflamm tory effect | | <i>napA</i> | 98.81% | <i>flhB2</i> | 98.81% | | | | |
| | | <i>hopH</i> | 100,00% | <i>cheV1</i> | 98.81% | | | | |
| | | | | <i>flgA</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>flgE</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>flgD</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>flgK</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>pseC</i> | 98.81% | | | | |
| | | | | <i>cheW</i> | 98.81% | | | | |
| | | | | <i>cheA</i> | 98.81% | | | | |
| | | | | <i>cheV2</i> | 96.43% | | | | |
| | | | | <i>fljR</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>fljL</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>motA</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>motB</i> | 98.81% | | | | |
| | | | | <i>pflA</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>flaG</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>fljD</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>fljS</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>flhB</i> | 100,00% | | | | |
| | | | | <i>fljP</i> | 98.81% | | | | |

Come si può osservare dalla tabella mentre per i fattori di virulenza Adherence, Endotoxin LPS, Enzyme, Molecular mimicry, Motility, Proinflammatory effect si osserva un elevato grado di omogeneità tra i ceppi di *H. pylori* analizzati, lo stesso non può dirsi per i fattori che fanno parte del Type IV secretion system.

L'analisi statistica è stata rivolta all'individuazione di associazione tra fattori di virulenza e trattamento e resistenza antibiotica a quei fattori che mostravano una frequenza inferiore al 75%.

Da questa analisi statistica è emerso che la presenza di alcuni fattori di virulenza che costituiscono il sistema di secrezione IV (*cagP*, *cagM*, *virB5_cagL*, *cagI*, *cagH*, *cagG*, *cagF*, *virB4_cagE*, *cagD*, *cagC*, *cag1*, *cag3*, *virB1*, *virD4*, *virB11*, *cagZ*, *virB9_cagX*, *virB6_cagW*, *virB8_cagV*, *cagU*, *virB7_cagT*, *cagS*, *cagQ* e *cagA*) è associata in maniera significativa con l'assenza di precedente trattamento. In altre parole, l'aver effettuato precedentemente un trattamento antibiotico fallimentare esercita una pressione selettiva che per un verso seleziona ceppi *H. pylori* resistenti e per l'altro seleziona caratteristiche di non virulenza. *Cag2* sebbene faccia parte dell'isola di patogenicità non è associato al non trattamento (anche se la distribuzione tra naive e trattati è simile agli altri fattori che fanno parte del sistema di secrezione). I dati raccolti sono sintetizzati in tabella 17.

Tabella 17 P value per trattamento vs assenza fattore di virulenza

| Virulence factor of Type IV secretion system | P value (association between virulence factor absence and treatment) |
|--|--|
| <i>cagP</i> | P= 0.024 |
| <i>cagM</i> | P= 0.037 |
| <i>virB5_cagL</i> | P= 0.024 |
| <i>cagI</i> | P= 0.037 |
| <i>cagH</i> | P = 0.037 |
| <i>cagG</i> | P = 0.037 |

| | |
|------------|------------|
| cagF | P = 0.037 |
| virB4_cagE | P = 0.016 |
| cagD | P = 0.024 |
| cagC | P = 0.053 |
| cagI | P = 0.036 |
| cag3 | P = 0.053 |
| virB1 | P = 0.036 |
| virD4 | P = 0.036 |
| virB11 | P = 0.024 |
| cagZ | P = 0.037 |
| cagX | P = 0.024 |
| virB6_cagW | P = 0.024, |
| virB8_cagV | P = 0.024, |
| cagU | P = 0.037 |
| virB7_cagT | P = 0.024 |
| cagS | P = 0.037 |
| cagQ | P = 0.024 |
| cagA | P = 0.024 |

Lo stesso tipo di analisi è stata condotta valutando l'assenza dei fattori di virulenza e la resistenza ad ogni singolo antibiotico. In particolare per la claritromicina è stato osservato che i fattori di virulenza cagP, cagD, cagQ, sono associati alla sensibilità.

Per l'associazione rispettivamente tra cagM, cagI, cagH, cagG, cagF, virB4_cagE, virB2_cagC, cagZ, virB10_cagY, cagU, cagS, e resistenza alla claritromicina, non vi è significativa ma il dato rispecchia quello dell'associazione tra sensibilità e presenza di fattori di virulenza.

Non vi è invece associazione tra assenza tra i seguenti fattori e la resistenza alla claritromicina: virB5-cagL, cag1, cag2, virB1, virD4, virB11, virB9_cagX, virB6_cagW, virB8_cagV, virB7_cagT, cagA (tabella 18).

Tabella 18 P value per trattamento vs assenza fattore di virulenza

| Virulence factor of Type IV secretion system | P value (association between virulence factor absence and resistance to CH) |
|--|--|
| cagP | P= 0.008 |
| cagD | P = 0.049 |
| cagQ | P= 0.008 |

Per quanto riguarda la resistenza alla levofloxacina diversamente da quanto riportato per la claritromicina non è stata trovata alcuna associazione con tutti i fattori di virulenza del sistema di secrezione IV.

L'assenza dei fattori di virulenza del sistema di secrezione IV ha mostrato associazione con la resistenza al metronidazolo (tabella 19).

Tabella 19 fattori di virulenza del sistema di secrezione IV e resistenza al metronidazolo

| Virulence factor of Type IV secretion system | P value (association between virulence factor absence and MZ resistance) |
|--|---|
| cagP | P= 0.024 |
| cagM | P= 0.037 |
| virB5_cagL | P= 0.024 |
| cagI | P= 0.037 |
| cagH | P = 0.037 |
| cagG | P = 0.037 |
| cagF | P = 0.037 |
| virB4_cagE | P = 0.016 |
| virB2_cagC | P = 0.053 |
| cag1 | P = 0.037 |
| cag3 | P = 0.053 |
| virB1 | P = 0.036 |
| virD4 | P = 0.036 |

| | |
|------------|-----------|
| virB11 | P = 0.024 |
| cagZ | P = 0.037 |
| virB9_cagX | P = 0.024 |
| virB6_cagW | P = 0.024 |
| virB8_cagV | P = 0.024 |
| cagU | P = 0.037 |
| virB7_cagT | P = 0.024 |
| cagS | P = 0.037 |
| cagQ | P = 0.024 |

Come si osserva dai p value i fattori di virulenza cagP, cagM, virB5_cagL, cagI, cagH, cagG, cagF, virB4_cagE, cagD, virB2_cagC, cag1, cag3, virB1, virD4, virB11, cagZ, virB9_cagX, virB6_cagW, virB8_cagV, cagU, virB7_cagT, cagS, cagQ, sono associati alla sensibilità al metronidazolo.

Non vi è associazione per i seguenti fattori di virulenza con la resistenza al metronidazolo: cagA, cag2, virB10_cagY.

L'analisi è stata condotta anche valutando l'associazione tra di fattori di virulenza e sensibilità multipla ai sei antibiotici testati. Sia cagP che cagQ sono associati in maniera significativa alla sensibilità contemporanea ai 6 ab: cagP, cagQ (tabella 20).

Tabella 20 fattori di virulenza del sistema di secrezione IV e sensibilità a sei antibiotici

| Virulence factor of Type IV secretion system | P value (association between virulence factor absence and multiple susceptibility to six antibiotics) |
|--|--|
| cagP | P= 0.039 |
| cagQ | P= 0.039 |

Innovazioni:

La principale innovazione legata a questo progetto di ricerca è quella di dotare la struttura della possibilità unica sul territorio del sud-est barese, di fornire dati specifici sulla farmaco-resistenza dei ceppi *H. pylori* responsabili di gastrite. Questo processo di screening altamente raffinato ci porrà nelle eccellenze nazionali per questo tipo di patologie gastro-intestinali.

I dati prodotti dallo studio saranno utilizzabili al fine di disegnare una più specifica terapia antibiotica di eradicazione dell'infezione soprattutto per quei casi nei quali si siano precedentemente registrati risultati fallimentari mediante l'uso dei protocolli terapeutici empirici. L'attività di ricerca nel settore della Microbiologia e della Virologia iniziata con il progetto attuale, mediante il reclutamento e l'utilizzo di personale dedicato alla ricerca stessa, apre la possibilità di iniziare anche nuovi filoni di studio anche in altri ambiti sempre strettamente legati alla farmaco-resistenza di interesse sia nazionale che internazionale. Ad oggi infatti molta attenzione si sta dedicando al problema della diffusione di ceppi *multi-drug resistant* (MDR) isolati soprattutto da pazienti provenienti dai reparti di lungodegenza. In questo senso abbiamo iniziato la raccolta e lo stoccaggio di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* MDR al fine di studiare mediante analisi multicentrica, le caratteristiche fenotipiche e genotipiche di questi ceppi.

Descrizione della complementarietà e della sinergia del gruppo di ricerca:

Fino ad oggi i progetti di ricerca sostenuti da questo Istituto non hanno mai compreso l'ambito della Microbiologia sebbene questo ambito di studio dovrebbe rientrare a pieno nella *mission* dell'Istituto. Con l'avvio di questo progetto si permette all'IRCCS di aprire un nuovo filone di speculazione scientifica nell'ambito di nuovi patogeni associati a patologie "antiche" ed in particolare della farmacovigilanza.

Riteniamo che, sebbene il progetto di ricerca in oggetto sia nella sua fase iniziale e rappresenti il primo avviato in questo settore, sia di fondamentale importanza continuare a sostenere e salvaguardare questo nuovo asse di speculazione scientifica che va a completare il quadro generale della ricerca attiva nell'Istituto.

Pubblicazioni:

- 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.
- 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.
- 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.

- Comparative analysis of 2 commercial molecular tests for the detection of gastroenteric viruses on stool samples. Sciandra Ilaria, Livia Piccioni, L. Coltella, S. Ranno, Giannelli Gianluigi, F. Falasca, Guido Antonelli, C. Concato, O. Turriziani. *DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE*
- Low prevalence of Gemycircularvirus DNA in immunocompetent and immunocompromised subjects. Lisa Macera, Pietro Giorgio Spezia, Chiara Medici, Francesca Falasca, Sciandra Ilaria, Guido Antonelli, Daniele Focosi, Mauro Pistello, Fabrizio Maggi. *New Microbiologica*
- Comparative analysis of 2 commercial molecular tests for the detection of gastroenteric viruses on stool samples I. Sciandra, L. Piccioni, L. Coltella, S. Ranno, G. Giannelli, F. Falasca, G. Antonelli, C. Concato, O. Turriziani *Virology*
- Evaluation of antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains isolated in Bari, Southern Italy in 2017-2018 by phenotypic and genotyping methods Palmitessa et al. *Microbial Drug Resistance*
- Seroprevalence of group B Coxsackieviruses: retrospective study in an Italian population I Sciandra, F Falasca, P Maida, G Tranquilli, D Di Carlo, L Mazzuti, T Melengu, G Giannelli, G Antonelli, O Turriziani *Journal of Medical Virology*
- Redondovirus DNA in human respiratory samples. PG Spezia, L Macera, P Mazzetti, M Curcio, C Biagini, I Sciandra, O Turriziani, M Lai, G Antonelli, M Pistello, F Maggi. *Journal of Clinical Virology*

Progetto n. 20/2018: Diete, microbiota intestinale e metabolomica: valutazioni di possibili sinergie

STUDIO PROMED: Confronto fra dieta mediterranea, dieta altamente proteica e dieta vegetariana in individui in sovrappeso

Responsabile: dott. Gioacchino Leandro

Partecipanti: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Abstract

Nel tratto gastrointestinale umano sono presenti circa 100 trilioni di microrganismi. La composizione del microbiota intestinale non è stabile e può essere influenzata da diversi fattori quali dieta, età, uso di antibiotici, locazione geografica, malattia, modalità di nascita, allattamento ed esercizio fisico. In questo studio di intervento dietetico sono stati reclutati 18 donatori fecali in sovrappeso sani (BMI tra 29 e 33 kg / m²) di età compresa tra 18 e 60 anni. Dieta mediterranea, dieta ricca di proteine o dieta vegetariana sono state consumate per una durata di 2 mesi. L'estrazione del DNA delle feci raccolte e l'analisi delle sequenze del gene codificante l'rRNA 16S batterico sono state eseguite per determinare la composizione intestinale microbica in risposta ai cambiamenti della dieta. I cambiamenti nel modello dietetico sono stati in grado di causare differenze significative in beta-diversity del microbiota intestinale nei tre gruppi di studio. Specificamente 5 famiglie di microbiche, *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Odoribacteraceae* e *Pasteurellaceae*, che comprendono fra l'altro generi di batteri patogeni, sono state osservate essere significativamente più basse dopo l'intervento con la dieta mediterranea rispetto alla dieta vegetariana e alla dieta ricca di proteine. Anche altre popolazioni microbiche sembrano differenziare i tre gruppi di studio, tuttavia, a causa della elevata variazione interindividuale, molte di queste differenze non hanno raggiunto la significatività statistica. Alcuni dei partecipanti hanno mostrato una risposta più forte di altri allo stesso intervento dietetico. In particolare, le popolazioni microbiche che comprendono batteri degradatori di polisaccaridi complessi sono risultati più elevati nei partecipanti che hanno consumato più frutta e verdura. Si può concludere che la dieta ha un effetto sul microbiota intestinale, sebbene sia necessario un numero maggiore di soggetti per gruppo al fine di apprezzare meglio le fluttuazioni microbiche dell'intestino e come la dieta possa indurre una modulazione benefica dei batteri intestinali.

Introduzione

L'apparato digerente è progettato per trasformare il cibo in sostanze nutritive necessarie affinché il corpo rimanga in vita. La composizione della dieta può avere un effetto enorme sull'umore, sull'equilibrio ormonale e sui livelli di obesità ed è quindi essenziale per la salute umana. La maggior parte dei macronutrienti (carboidrati, proteine e grassi) vengono digeriti e assorbiti nell'intestino tenue, mentre i materiali indigeribili (ad es. fibre alimentari, proteine e lipidi rimanenti e composti fenolici) vengono trasportati nell'intestino crasso dove possono essere metabolizzati dal microbiota intestinale. Nel tratto gastrointestinale umano sono presenti circa 100 trilioni di microrganismi. Il microbioma è da poco stato considerato come

organo vitale del corpo: la sua composizione non è stazionaria e può essere influenzata da diversi fattori come dieta, età, uso di antibiotici, locazione geografica, malattia, modalità di nascita, allattamento ed esercizio fisico.

L'intestino crasso è un tubo lungo 1,5 metri che è segmentato nel cieco, colon ascendente, colon trasverso, colon discendente, colon sigmoideo e retto. La parete gastrointestinale è composta da quattro strati: mucosa, sottomucosa, muscularis externa e sierosa (**Figura 1**). Lo strato di mucosa contiene strutture di cripta con un monostrato di cellule epiteliali (**Figura 2A**). Queste strutture di cripta migliorano la superficie totale per assorbire efficacemente elettroliti, acqua e sostanze nutritive. Le cellule assorbenti, le cellule di Paneth, le cellule neuroendocrine e le cellule di calice si trovano all'interno del monostrato e sono rispettivamente coinvolte nell'assorbimento di nutrienti, nella secrezione di proteine antibatteriche, nella secrezione di ormoni e nella produzione di glicoproteine di mucina. Le cellule epiteliali sono sigillate insieme da giunzioni strette che impediscono l'ingresso di microrganismi o sostanze indesiderate nella lamina propria quando il tratto gastrointestinale è in omeostasi. Uno spesso strato di muco, proteine antimicrobiche e anticorpi IgA secretori minimizzano ulteriormente il contatto tra batteri e cellule immunitarie presenti nell'epitelio. Una comunità microbica equilibrata e diversificata non è solo importante per la salute dell'intestino, ma è anche associata al funzionamento nervoso in altri organi. Si suggerisce che l'asse intestino-cervello del microbiota influenza la salute mentale (ad esempio depressione e ansia) e svolge un ruolo in malattie come il morbo di Parkinson, la sindrome dell'intestino irritabile e l'autismo.

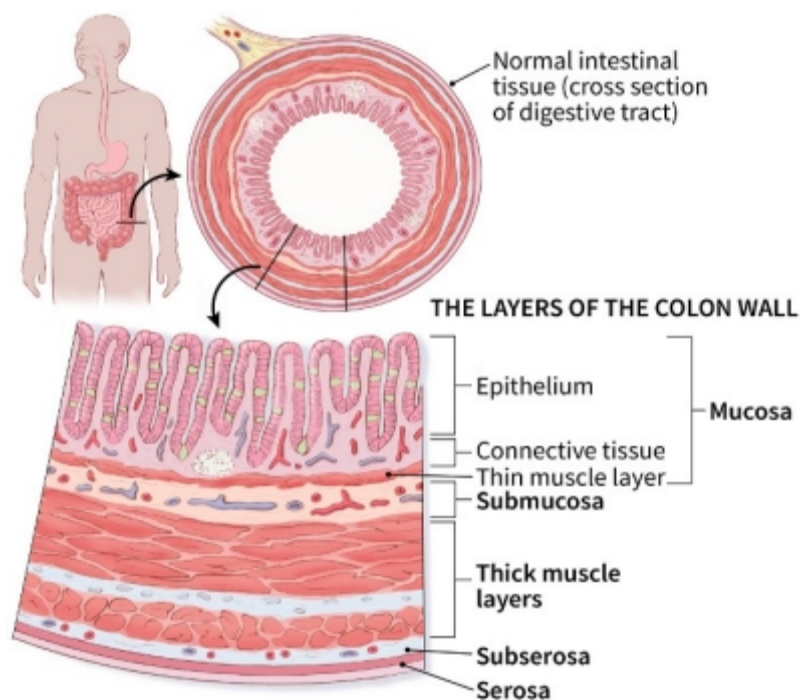


Figura 1 Strati della parete del colon: mucosa, sottomucosa, muscularis externa (strato muscolare) e sierosa.

Disbiosi dell'intestino

Come precedentemente affermato, il microbiota intestinale può influenzare lo stato di salute del corpo. Quando l'intestino è sano, c'è un equilibrio tra batteri simbiotici e patogeni. Ma quando i patogeni diventano le specie microbiche dominanti, si può verificare uno squilibrio microbico dell'intestino crasso. In soggetti sani, lo strato interno di muco è composto da una solida rete di O-glicani che impedisce ai batteri di raggiungere le cellule epiteliali. Le specie batteriche possono tuttavia aderire allo strato di muco esterno che è meno densamente impacchettato modellando le popolazioni microbiche presenti nel colon.

Il tipo di macronutrienti disponibili per la fermentazione microbica può avere un impatto sostanziale sullo spessore dello strato di muco. Il microbiota può produrre enzimi per fermentare le fibre alimentari in acidi grassi a catena corta (acetato, butirato e propionato), che possono abbassare il pH nel colon inibendo così la crescita di agenti patogeni come *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*. Il butirato è la fonte di energia preferita dei colonociti e di conseguenza può stimolare la produzione di muco da parte delle cellule caliciformi [33]. Quando il microbiota intestinale (ad es. *Barnesiella intestinihominis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides caccae* e *Akkermansia muciniphila*) viene privato della fibra alimentare, in alternativa può utilizzare lo strato di mucina come fonte di nutrienti. Gli aminoacidi contenenti zolfo (ad es. cisteina, taurina e metionina) possono provocare la degradazione dello strato di muco. Il microbiota è in grado di produrre H₂S dallo zolfo che può dividere i legami disolfuro presenti nel muco. Una barriera mucosa interrotta può provocare danni alle giunzioni strette poiché le cellule epiteliali non sono più protette con conseguente "perdita intestinale" o "leaky gut" (**Figura 2B**). Di conseguenza, la permeabilità intestinale aumenta e le sostanze nocive possono entrare nell'ambiente interno del corpo dando così inizio alle risposte immunitarie.

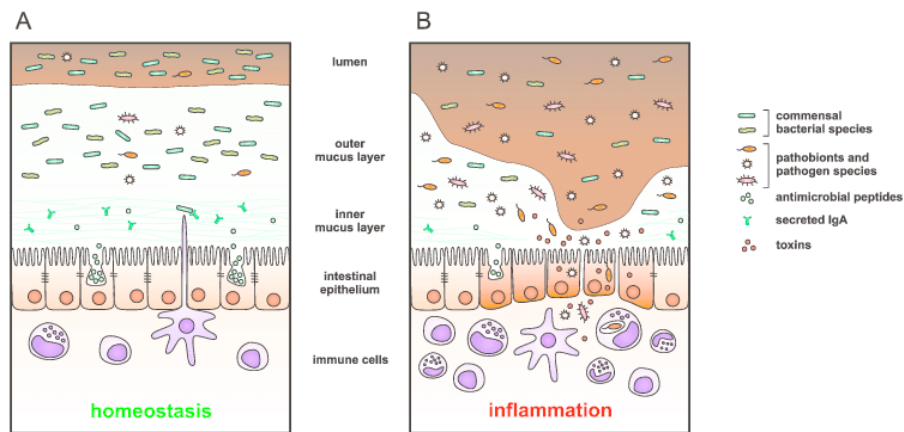


Figura 2 (A) Omeostasi gastrointestinale e disbiosi (B) del tratto gastrointestinale

Un ulteriore elemento dannoso è lo squilibrio della capacità del corpo di disintossicare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e le specie reattive dell'azoto (RNS) che possono causare danni ossidativi al DNA. Viene suggerito che il ferro eme presente nella carne rossa possa reagire con acidi grassi polinsaturi e formare specie reattive dell'ossigeno nell'ambiente intestinale. L'elettrone spaiato presente in ROS e RNS provoca stress ossidativo donando questo elettrone extra instabile ai composti vicini. Un danno eccessivo al DNA può eventualmente portare alla formazione di un cancro. Studi recenti hanno confermato il ruolo essenziale di alcune molecole derivate dalla dieta contro i ROS: tra questi i polifenoli, che sono in grado di intrappolare queste specie reattive dell'ossigeno e quindi prevenire danni al DNA. I polifenoli si trovano naturalmente negli alimenti di origine vegetale e solo il 5-10% dei polifenoli viene assorbito nell'intestino tenue. Il restante 90-95% di polifenoli raggiunge i due punti dove sono esposti al microbiota intestinale. I polifenoli sono convertiti nei loro metaboliti fenolici dal microbiota che aumenta la biodisponibilità. Inoltre, i polifenoli possono stimolare la crescita di alcune specie microbiche benefiche e inibire la crescita di ceppi patogeni.

La colina, la fosfatidilcolina (lecitina), la betaina e la carnitina presenti in alimenti come carne rossa, uova, soia e cavolfiore sono state correlate a malattie cardiovascolari che coinvolgono l'aterosclerosi. Alcuni microbioti metabolizzano la colina in trimetilammina (TMA) attraverso l'enzima trimetilammina-liasi. Il TMA viene quindi assorbito dagli enterociti e ossidato dagli enzimi epatici (monoossigenasi contenente flavina) per formare trimetilammina N-ossido (TMAO), una molecola con un effetto pro-aterosclerotico: altera il trasporto di acidi biliari e colesterolo, aumenta l'iperreattività piastrinica ed è coinvolto nella formazione di cellule di schiumose dai macrofagi. Le lipoproteine a bassa densità trasportano colesterolo e possono attivare i recettori dei macrofagi. I macrofagi attivati possono trasformarsi in cellule schiumose che sono responsabili dell'accumulo di lipidi sulla parete dell'arteria (**Figura 3**). La quantità di TMAO prodotta dipende dalle specie batteriche presenti nell'intestino e quindi i suoi livelli ematici possono variare tra le persone.

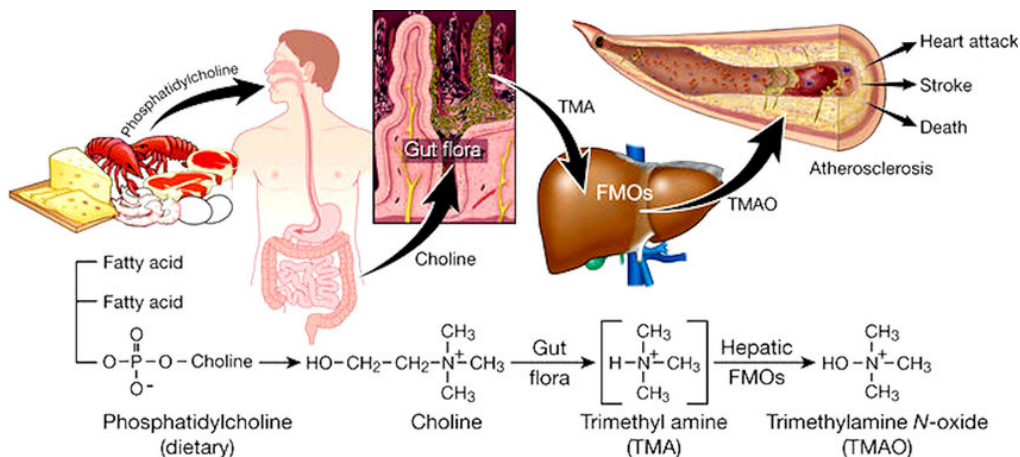


Figura 3 Produzione di trimetilammina N-ossido (TMAO) da (fosfatidil) colina mediante microbiota intestinale [56]

Obesità

Uno stile di vita sedentario e il sovraccarico di calorie dalla dieta possono portare ad un aumento del peso corporeo. Un individuo con un indice di massa corporea tra 25,0 e 29,9 kg/m² è considerato in sovrappeso e un individuo obeso ha un BMI maggiore o uguale a 30,0 kg/m². Il sistema nervoso centrale (SNC) controlla l'assunzione di cibo e l'omeostasi energetica del corpo ed è influenzato da fattori ambientali e genetica. Un eccesso di calorie dalla dieta può causare ipertrofia delle cellule del tessuto adiposo poiché queste cellule hanno solo un'espandibilità limitata. Di conseguenza, i macrofagi (tipo M1) si infiltrano nel tessuto adiposo e rilasciano molecole pro-infiammatorie (**Figura 4**). Questo ambiente

pro-infiammatorio può ulteriormente contribuire ad altre complicazioni come l'insulino-resistenza e lo sviluppo del diabete di tipo 2.

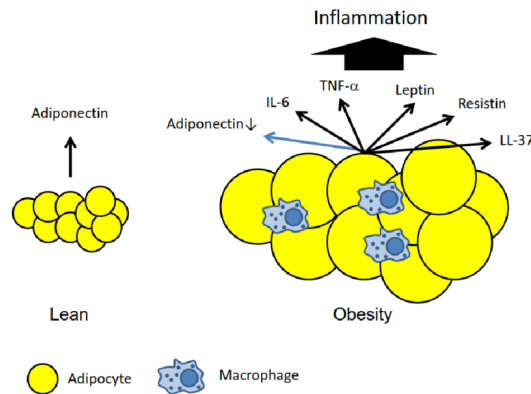


Figura 4 Macrofagi presenti nel tessuto adiposo obeso infiammato

Modelli dietetici

Pertanto, i componenti dietetici sono in grado di alterare la composizione dei batteri intestinali nel colon e quindi causare diversi effetti biologici nel corpo con conseguente stato di salute o di malattia. Sono stati riconosciuti tre principali enterotipi con *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*.

La dieta mediterranea è considerata il modello alimentare più sano al mondo. Studi epidemiologici hanno associato il Mediterraneo a un rischio ridotto di una serie di malattie croniche tra cui malattie cardiovascolari, disturbi neurodegenerativi e diversi tipi di tumori. La dieta mediterranea è caratterizzata da un elevato consumo di olio d'oliva, noci, cereali, frutta, legumi e verdure che contengono notevoli quantità di polifenoli e fibre alimentari. Oltre a un moderato consumo di pesce, vino, pollame e prodotti lattiero-caseari. Basse quantità di carne rossa e prodotti a base di carne vengono ingeriti con la dieta mediterranea. Questo modello dietetico è associato con una grande diversità microbica e una predominanza di *Prevotella* su *Bacteroides*.

D'altra parte, il modello dietetico di tipo occidentale è caratterizzato da elevate assunzioni di calorie, proteine animali, grassi saturi, zuccheri semplici e una vasta gamma di alimenti trasformati. Questa dieta è stata associata a un rischio maggiore di obesità, diabete, cancro e malattie cardiovascolari. Una minore diversità microbica e livelli elevati di *Bacteroides* è stata osservata nelle feci delle persone che consumano una dieta di tipo occidentale. La carne è un prodotto alimentare che contiene quantità significative di carnitina, zolfo contenente aminoacidi ed eme. L'organizzazione mondiale della sanità (OMS) considera la carne rossa probabilmente cancerogena.

La dieta Atkins modificata (MAD) è una dieta a basso contenuto di carboidrati con una limitazione di 15 grammi di carboidrati al giorno. Questa dieta ricca di grassi e ricca di proteine contiene 2,5 volte più colina che viene consumata quando si segue una dieta povera di grassi come la dieta Ornish. Vengono consumate minori quantità di carboidrati che possono portare a una minore ingestione di importanti fonti di fibre come frutta e verdura. Questi fattori possono aumentare il rischio di sviluppare il cancro del colon-retto.

I vegetariani non mangiano carne o frutti di mare, e la loro dieta contiene cereali, verdure, semi, frutta a guscio, frutta, legumi, latticini e uova. I vegani escludono anche uova, latticini e altri prodotti di origine animale. Ferrocino et al. ha scoperto che *Bacteroides fragilis* è ridotto in individui che seguono una dieta vegetariana e vegana rispetto alla dieta onnivora.

Scopo dello studio

Lo scopo di questa ricerca è determinare l'impatto che i cambiamenti del modello dietetico hanno sulla composizione del microbiota intestinale. A tale scopo, tre diverse diete (dieta mediterranea, dieta ricca di proteine e dieta vegetariana) sono state somministrate a soggetti sani in sovrappeso per una durata di 2 mesi (**Figura 5**). Le feci sono state raccolte prima (T0) e dopo due mesi (T2) dall'intervento sulla dieta e analizzate per la loro composizione microbica.

Questo studio affronterà le seguenti domande di ricerca:

- Esistono differenze significative tra i gruppi di modelli dietetici?
- Esistono differenze significative tra gli individui prima e dopo due mesi di intervento?

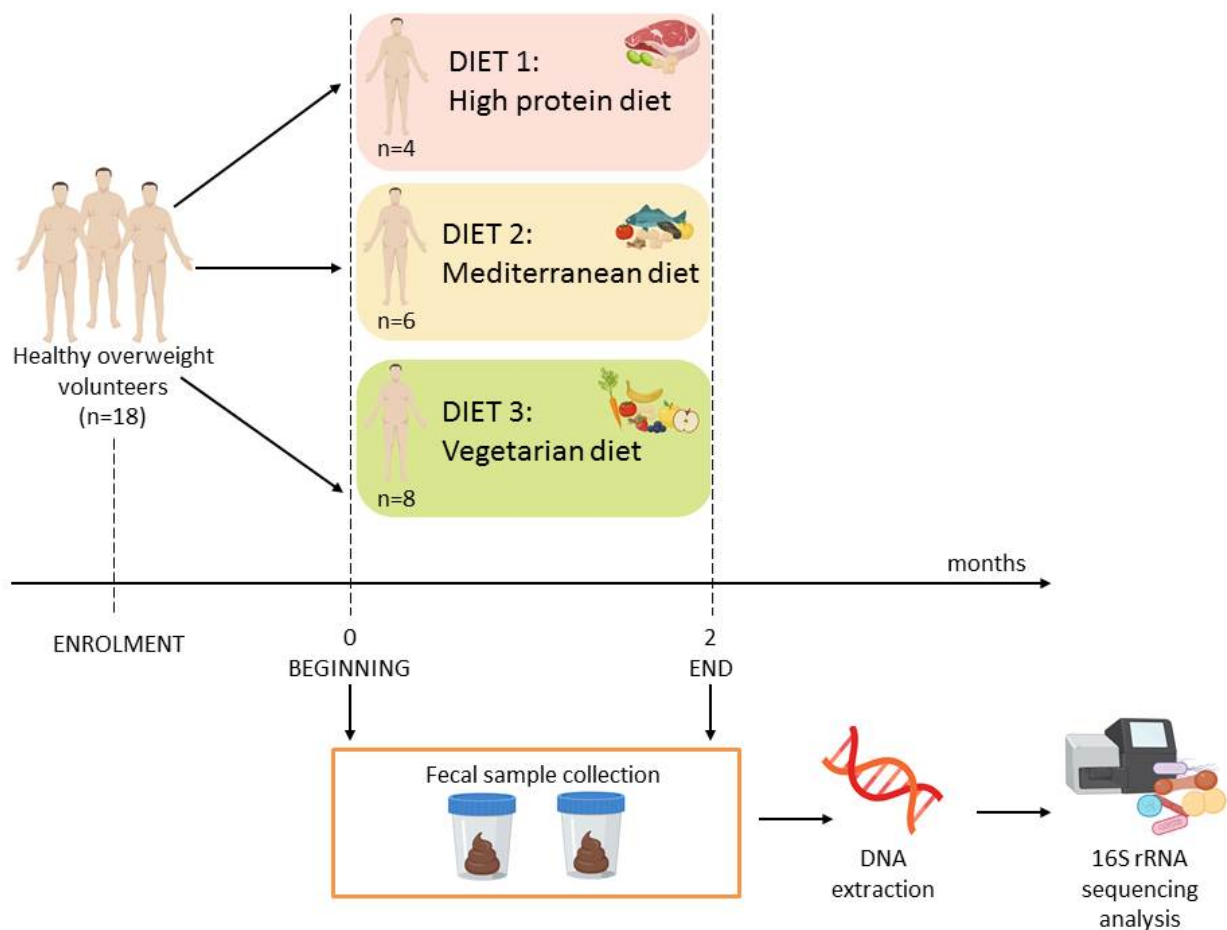


Figura 5 Progettazione sperimentale dello studio.

Materiali e metodi

Soggetti e campionamento

Sono stati reclutati 18 donatori fecali in sovrappeso (BMI tra 29 e 33 kg/m²), in buona salute e con età compresa tra 18 e 60 anni. I partecipanti non avevano assunto farmaci, antibiotici e pre/probiotici nei 3 mesi antecedenti lo studio. Gli individui sono stati assegnati in modo casuale a uno dei tre modelli dietetici (dieta vegetariana, dieta mediterranea o dieta ricca di proteine) consentendo una pari quantità di uomini e donne. Campioni fecali sono stati prelevati prima dello studio di intervento e dopo due mesi di somministrazione della dieta. I campioni sono stati conservati a -80 gradi Celsius. Inizialmente è stato reclutato un numero più elevato di volontari, ma a causa del ritiro di alcuni volontari dallo studio, al termine dello studio è stata ottenuta la seguente numerosità: 8 soggetti hanno seguito la dieta vegetariana, 6 la dieta mediterranea e 4 soggetti la dieta ad alto contenuto proteico.

Estrazione del DNA

Le estrazioni di DNA di 80 campioni fecali congelati (20 donatori per due punti temporali in duplicato) sono state eseguite utilizzando il QIAamp PowerFecal DNA kit® (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA). Le istruzioni del produttore sono state seguite con le seguenti modifiche: al fine di ottenere un prodotto finale più accurato e migliore ai fini del sequenziamento, è stato deciso di utilizzare un campione di feci inferiore a quello suggerito (0,1 grammi). Inoltre, FastPrep®-24 Classic (MP Biomedicals) è stato utilizzato per la fase di omogeneizzazione (fase 6) per 60 secondi a 6,0 m/s invece del supporto per vortex.

Per valutare la qualità del DNA estratto e ottenere una misura approssimativa della sua concentrazione nei vari campioni, è stato utilizzato il Nanodropspectrometer™ 8000 (Thermo Fisher Waltham, MA, USA). Il tampone di eluizione, soluzione C6 del QIAamp PowerFecal kit® DNA Isolation (MoBio Laboratories) è stato usato come bianco. La valutazione della qualità del DNA è stata effettuata analizzando la curva di assorbimento e i rapporti forniti dallo strumento: 260/280: evidenzia la contaminazione da RNA o fenoli e 260/230: evidenzia la contaminazione da proteine e residui cellulari.

PCR

Le diluizioni dei campioni iniziali di DNA estratti sono state preparate con acqua trattata per portare tutti i campioni alla stessa concentrazione di DNA. I calcoli per la prima serie di diluizioni sono stati eseguiti utilizzando un fattore di diluizione di 0, 1: 5, 1:10 o 1:20, per avvicinare i campioni di DNA alla concentrazione desiderata. Per la seconda serie di diluizioni è stata utilizzata la formula $C1V1 = C2V2$ per determinare la quantità esatta di acqua trattata e DNA necessari per ottenere una concentrazione di 5 ng / ul. I campioni con una concentrazione di 5 ng/ul sono stati trasportati nel pozzetto Veriti thermocycler™ 96 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Per ciascun campione, l'amplificazione del gene 16S rRNA è stata eseguita utilizzando una serie di primer batterici all'interno delle regioni ipervariabili V3-V4: 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG) e 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC) [81]. La miscela di PCR è stata preparata utilizzando il kit ReadyMix PCR hot start HiFi KAPA contenente KAPA mix (1U / ul), primer 341F (10 uM) e primer 806R (10 uM). Sono stati eseguiti i seguenti cicli di PCR: denaturazione iniziale per 5 minuti a 95 °C, 25 cicli di 30 secondi a 95 °C, riscaldamento di 30 secondi a 55 °C e 30 secondi a 72 °C, seguita da una fase finale di allungamento di 5 minuti a 72 °C. I prodotti di amplificazione ottenuti mediante PCR sono stati elettroforizzati su un gel di agarosio all'1,5%.

Sequenziamento e analisi tassonomica

La preparazione della libreria di sequenziamento metagenomico è stata realizzata per gli ampliconi genici dell'RNA ribosomiale 16S. Le librerie finali sono state analizzate con la piattaforma Typestation 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le librerie sono state raggruppate e condivise in una libreria finale di ampliconi.

Le sequenze sono state ulteriormente elaborate utilizzando la pipeline Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME 2.0, <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>). Il denoising delle sequenze è stato ottenuto con il plugin dada2 nella pipeline QIIME. Le sequenze sono state assegnate alle unità tassonomiche operative (OTU) con una soglia di somiglianza del 99% (banca dati Greengenes). Le OTU delle sequenze sono state assegnate a diversi livelli tassonomici batterici (1. Regno, 2. Phylum, 3. Classe, 4. Ordine, 5. Famiglia, 6. Genere e 7. Specie). Per ulteriori analisi a valle, sono state filtrate le OTU che erano presenti solo in quantità ridotte.

Statistiche

Sono state condotte analisi statistiche permutazionali multivariate di varianza (PERMANOVA). Sono state eseguite analisi della composizione dei microbiomi (ANCOM) per misurare le differenze nella composizione della comunità microbica. Con Emperor sono stati generati significativi grafici di PCoA per visualizzare la beta diversity, espressa mediante Bray Curtis dissimilarity index dei taxa analizzati. Il livello di significatività è stato fissato per $p < 0,05$.

Risultati e discussioni

Analisi del microbiota intestinale a T0

Non sono state riscontrate differenze significative nella alfa e beta diversity tra i tre gruppi dietetici prima dell'intervento dietetico al tempo T0 ($p > 0,05$ dopo correzione FDR, dati non mostrati).

Analisi del microbiota intestinale a T2

Non sono state riscontrate differenze significative nella alfa diversity tra i tre gruppi dietetici dopo l'intervento dietetico a T2 ($p > 0,05$ dopo correzione FDR, dati non mostrati).

Differenze significative nella beta diversity sono state riscontrate a T2 confrontando la dieta mediterranea con la dieta ricca di proteine ($p = 0,023$ dopo la correzione della FDR), nonché confrontando la dieta mediterranea e la dieta vegetariana ($p = 0,047$ dopo la correzione della FDR), ma non quando si confrontano la dieta ad alto contenuto di proteine con la dieta vegetariana ($p = 0,088$ dopo correzione FDR). Le metriche sulla beta diversity sono state visualizzate con l'analisi delle coordinate principali (PCoA) utilizzando il software Emperor, al fine di esaminare più da vicino i cambiamenti nelle comunità batteriche dei campioni fecali prima e dopo 2 mesi di intervento dietetico (**Figura 6**). Questa analisi ha dimostrato che non si sono formate distinte formazioni di cluster, per le diete o i punti temporali.

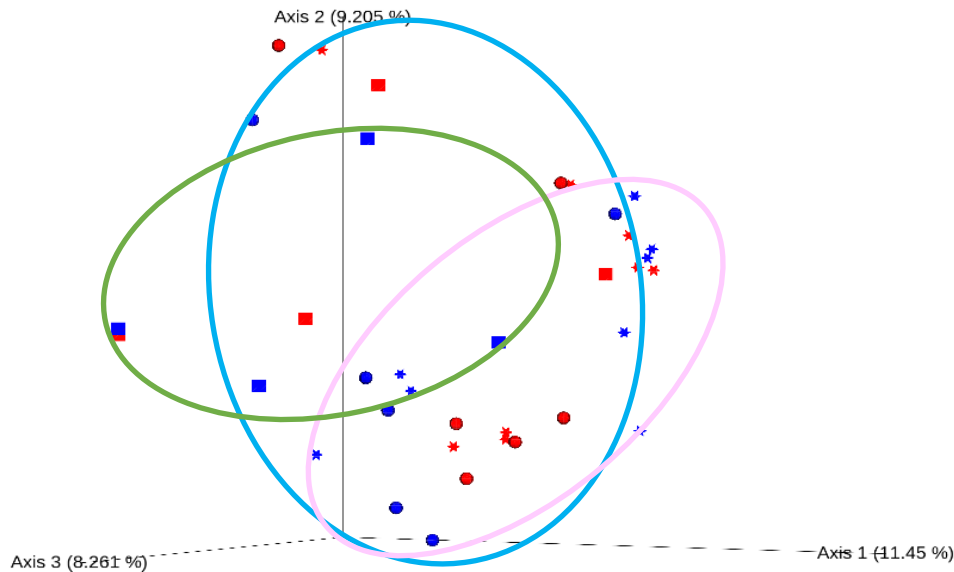


Figura 6 Analisi della somiglianza dei campioni fecali prima (rosso) e dopo (blu) l'intervento sulla dieta mediante componenti principali. Dieta ricca di proteine (\square , T2=ellisse verde), dieta mediterranea (\circ , T2=ellisse azzurra) la dieta vegetariana ($*$, T2=ellisse rosa).

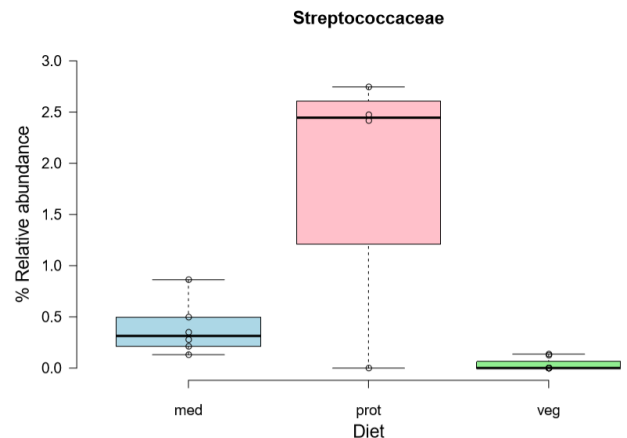
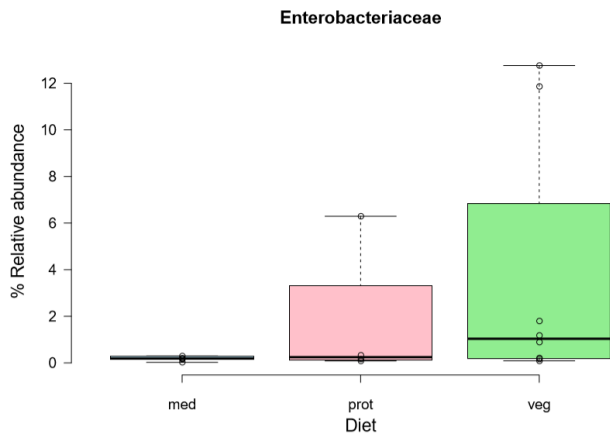
L'analisi statistica con PERMANOVA è stata eseguita per confrontare le variazioni delle comunità microbiche tra prima dell'intervento (T0) e dopo 2 mesi di intervento (T2) e tra i tre modelli di dieta (mediterranea, alto contenuto proteico e vegetariano) dopo l'intervento (T2). Non sono state riscontrate differenze significative nella beta diversity prima e dopo l'intervento con dieta mediterranea ($p = 0,88$), dieta ricca di proteine ($p = 0,80$) e dieta vegetariana ($p = 0,92$).

Ulteriori analisi con QIIME 2.0 sono state completate per determinare se vi fosse un'alterazione delle specie batteriche presenti nel microbiota intestinale degli individui che consumavano la dieta mediterranea, che è stata valutata rispetto alla dieta ricca di proteine e alla dieta vegetariana. A livello di genere (livello 6), il microbiota intestinale delle persone che seguono la dieta mediterranea non ha mostrato cambiamenti significativi rispetto al regime proteico e vegetariano (dati mostrati in allegato). Si è riscontrato che i generi batterici più presenti nell'intestino per questo studio di intervento erano rispettivamente "altri *Bacteroides*" (18,9%), "altre *Lacnospiraceae*" (11,8%), "altre *Ruminococcaceae*" (10,0%) e "*Faecalibacterium prausnitzii*" (8,6%). Nel presente studio tutti i generi di *Bacteroides* (28,2%) dominano fortemente il microbiota intestinale a confronto con *Prevotella* (1,4%). Lozupone et al. correlato il rapporto tra *Prevotella* e *Bacteroides* con il modello dietetico seguito dagli individui [85]. *Prevotella* è stata precedentemente correlata a una dieta ricca di carboidrati e zuccheri semplici mentre il consumo duraturo di proteine animali, diversi aminoacidi e grassi saturi era correlato a *Bacteroides* [88].

Un'ulteriore esplorazione dei cambiamenti a livello di tassonomia di famiglie batteriche (livello 5) ha rivelato differenze significative in cinque famiglie distinte mostrate nella **Tabella 1** e nella **Figura 7**. Differenze percettibili tra le diete possono essere osservate per *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae* ed *Enterobacteriaceae*. Al contrario, le differenze significative riscontrate per *Odoribacteraceae* e *Pasteurellaceae* durante l'analisi con QIIME 2.0 non sono ovviamente osservabili. Gevers et al. ha dichiarato che lo stato della malattia dell'intestino è caratterizzato da un aumento di *Enterobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* e *Veillonellaceae* spp. [82]. *Streptococcaceae* spp, si suggerisce siano coinvolte nello sviluppo di disturbi metabolici, diabete e tumore del colon secondo Zeng et al. [83]. Power et al. ha proposto che un'elevata assunzione di fibre (caratteristica della dieta mediterranea) possa comportare un'alta produzione di SCFA da parte del microbiota intestinale, riducendo il pH intestinale e prevenendo così la crescita di batteri patogeni come *Enterobacteriaceae* spp. [84]. Nella nostra analisi anche le *Bacteroidaceae* e le *Ruminococcaceae* hanno mostrato differenze, sebbene queste non siano state rilevate statisticamente significative.

Tabella 1 Generi batterici (L5) prima dell'intervento dietetico (T0) e dopo (T2) con dieta mediterranea (Med), ricca di proteine (Prot) e vegetariana (Veg) Deviazione media e standard delle abbondanze relative percentuali.

| | Diet | <i>Bifidobacteria</i> <i>ceae</i> | <i>Coriobacteriac</i> <i>eae</i> | <i>Bacteroidacea</i> <i>e</i> | <i>Porphyromona</i> <i>daceae</i> | <i>Prevotellaceae</i> | <i>Rikenellaceae</i> | <i>[Barnesiellaceae]</i> | <i>[Odoribacteraceae]</i> | <i>[Paraprevotellaceae]</i> | <i>Streptococcaceae</i> | <i>oClostridiales</i> |
|------|------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|--------------------------------------|------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------|
| T0 | | | | | | | | | | | | |
| Mean | Med | 0,81 | 0,67 | 18,57 | 1,56 | 2,99 | 5,01 | 0,06 | 0,64 | 0,00 | 0,15 | 5,03 |
| SD | Med | 1,51 | 1,65 | 7,78 | 1,00 | 2,21 | 2,94 | 0,15 | 0,87 | 0,00 | 0,18 | 2,23 |
| Mean | Prot | 0,40 | 0,00 | 32,01 | 0,91 | 0,17 | 5,70 | 0,00 | 0,20 | 0,11 | 0,13 | 3,85 |
| SD | Prot | 0,31 | 0,00 | 13,59 | 0,89 | 0,34 | 4,47 | 0,00 | 0,20 | 0,23 | 0,19 | 1,65 |
| Mean | Veg | 2,13 | 0,44 | 26,19 | 0,55 | 2,74 | 1,95 | 0,00 | 0,32 | 0,20 | 0,06 | 3,78 |
| SD | Veg | 3,42 | 1,24 | 19,20 | 0,60 | 4,17 | 1,79 | 0,01 | 0,41 | 0,57 | 0,10 | 2,32 |
| T2 | | | | | | | | | | | | |
| Mean | Med | 0,53 | 0,17 | 24,13 | 1,92 | 0,85 | 6,18 | 0,04 | 0,33 | 0,18 | 0,39 | 6,00 |
| SD | Med | 0,59 | 0,26 | 9,30 | 0,95 | 1,28 | 2,95 | 0,10 | 0,34 | 0,34 | 0,26 | 2,76 |
| Mean | Prot | 0,18 | 0,32 | 37,23 | 0,77 | 1,40 | 5,57 | 0,00 | 0,54 | 0,07 | 1,91 | 5,61 |
| SD | Prot | 0,23 | 0,51 | 10,24 | 0,56 | 2,51 | 3,05 | 0,00 | 0,27 | 0,14 | 1,28 | 3,65 |
| Mean | Veg | 1,05 | 0,20 | 30,83 | 1,48 | 0,50 | 2,04 | 0,01 | 0,54 | 0,08 | 0,03 | 2,97 |
| SD | Veg | 0,56 | 0,57 | 16,75 | 1,57 | 1,11 | 1,64 | 0,02 | 0,39 | 0,24 | 0,06 | 1,69 |
| | Diet | <i>Clostridiaceae;</i> | <i>Lachnospiraceae</i> | <i>Peptostreptococ</i> <i>aceae</i> | <i>Ruminococcaceae</i> <i>e</i> | <i>Veillonellaceae</i> | <i>[Mogibacteriaceae]</i> | <i>Erysipelotrichaceae</i> | <i>Alcaligenaceae</i> | <i>Enterobacteriaceae</i> | <i>Pasteurellaceae</i> | <i>Verrucomicrobiaceae</i> |
| T0 | | | | | | | | | | | | |
| Mean | Med | 0,99 | 29,90 | 1,23 | 26,19 | 3,29 | 0,04 | 0,48 | 0,87 | 1,36 | 0,13 | 0,00 |
| SD | Med | 0,60 | 10,90 | 1,17 | 3,26 | 2,96 | 0,11 | 0,61 | 1,06 | 1,21 | 0,33 | 0,00 |
| Mean | Prot | 1,07 | 23,10 | 2,37 | 13,73 | 2,58 | 0,02 | 0,66 | 0,62 | 9,09 | 0,00 | 3,26 |
| SD | Prot | 1,05 | 5,56 | 1,97 | 6,45 | 1,93 | 0,05 | 0,47 | 0,66 | 16,01 | 0,00 | 3,77 |
| Mean | Veg | 3,93 | 25,22 | 3,42 | 20,32 | 4,74 | 0,02 | 1,08 | 0,37 | 2,27 | 0,01 | 0,25 |
| SD | Veg | 9,21 | 7,93 | 5,57 | 9,10 | 2,40 | 0,05 | 0,73 | 0,83 | 1,98 | 0,03 | 0,44 |
| T2 | | | | | | | | | | | | |
| Mean | Med | 0,43 | 25,19 | 0,77 | 25,98 | 2,86 | 0,03 | 0,75 | 1,31 | 0,14 | 0,00 | 1,82 |
| SD | Med | 0,66 | 6,63 | 0,53 | 6,84 | 3,72 | 0,05 | 0,77 | 1,58 | 0,11 | 0,00 | 2,57 |
| Mean | Prot | 0,25 | 24,53 | 0,75 | 12,75 | 4,21 | 0,06 | 0,50 | 0,63 | 1,72 | 0,02 | 0,98 |
| SD | Prot | 0,22 | 2,36 | 0,34 | 4,93 | 1,50 | 0,06 | 0,47 | 0,82 | 3,05 | 0,04 | 1,13 |
| Mean | Veg | 0,67 | 22,03 | 0,70 | 25,06 | 5,22 | 0,02 | 0,60 | 0,14 | 3,62 | 0,02 | 2,19 |
| SD | Veg | 0,52 | 4,82 | 0,94 | 5,05 | 4,42 | 0,06 | 0,48 | 0,29 | 5,40 | 0,05 | 4,33 |



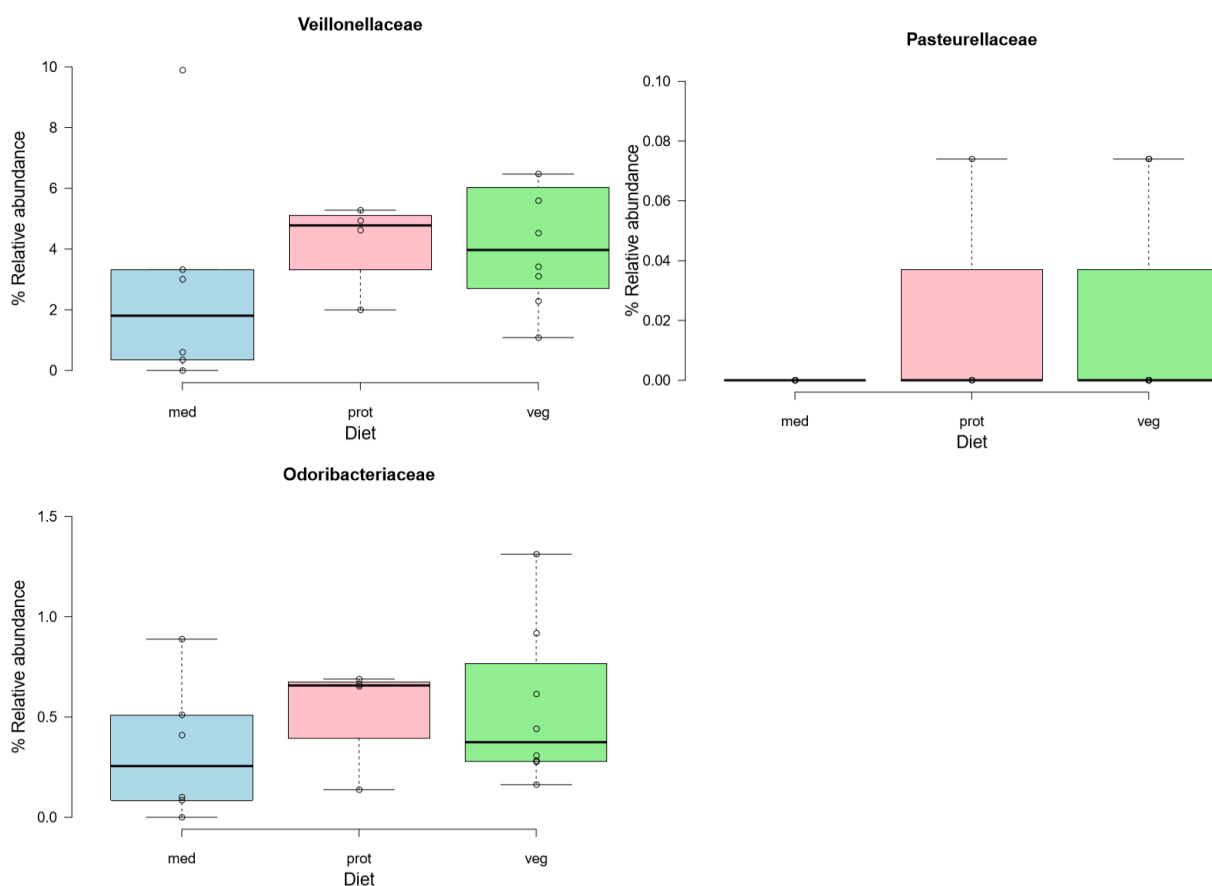


Figura 7 Abbondanza relativa percentuale (%) delle famiglie batteriche significativamente diverse dopo l'intervento dietetico (T2) con dieta mediterranea (med, blu), ricca di proteine (prot, rosa) e vegetariana (veg, verde). Le linee centrali mostrano le mediane; i limiti di casella indicano il 25° e il 75° percentile come determinato dal software R; i baffi si estendono per 1,5 volte l'intervallo interquartile dal 25° e 75° percentile, i valori individuali sono rappresentati da punti.

Non sono state osservate differenze significative nella beta diversità a nessun altro livello tassonomico ($p > 0,05$ dopo correzione FDR). Nell'Appendice vengono illustrati i principali phyla del microbiota intestinale (Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria e Verrucomicrobia) prima e dopo l'intervento con le tre diverse diete. Verrucomicrobia phylum era più alto (anche se non significativamente) dopo la dieta mediterranea e vegetariana, ma diminuiva dopo una dieta ricca di proteine. Verrucomicrobia contiene una specie, *Akkermansia muciniphila*, che è collegata a uno stato metabolico sano. Una maggiore abbondanza di *A. muciniphila* ha mostrato un miglioramento dei marker di sensibilità all'insulina e aumenta la quantità di endocannabinoidi che controllano l'infiammazione. Tuttavia non abbiamo osservato *A. muciniphila* più elevato a livello di specie dopo nessuno degli interventi dietetici.

Il rapporto Firmicutes / Bacteroidetes (rapporto F / B) fornisce un'indicazione approssimativa dei mutamenti batterici ed è stato precedentemente visto influenzare lo stato metabolico. Mariat et al. rilevato che il rapporto tra Firmicutes e Bacteroidetes si evolve durante le fasi della vita e un aumento dei Bacteroidetes è stato precedentemente osservato in associazione con restrizione calorica e perdita di peso. Il rapporto F / B per le diete nei due punti temporali è riportato nella **Tabella 4**. Sia la dieta mediterranea che la dieta vegetariana hanno indotto una diminuzione del rapporto F / B. La piccola quantità di soggetti che prendono parte a questo studio insieme alle elevate variabilità nell'età (tra 18 e 60 anni) suggeriscono che questi risultati devono essere interpretati con cura, poiché le differenze nel rapporto F / B non erano statisticamente significative.

Tabella 4 Rapporti medi di Firmicutes / Bacteroidetes per ogni dieta a T0 e T2. * I dati sono espressi in% di Firmicutes diviso per% di Bacteroidetes

| | F/B ratio T0 | F/B ratio T2 | Change in F/B ratio |
|----------------------|--------------|--------------|---------------------|
| Vegetarian | 1.96 | 1.61 | -0.34 |
| Mediterranean | 2.33 | 1.86 | -0.48 |
| High protein | 1,21 | 1,11 | -0.10 |

Osservando il set di dati complessivo, si possono osservare variazioni inter-individuali molto elevate della composizione del microbiota. In particolare, alcuni volontari hanno mostrato profondi cambiamenti nell'abbondanza di batteri intestinali a T2 rispetto a T0. Le alterazioni interindividuali più notevoli che si sono verificate sono state un aumento del 10% di *Bacteroides* e un aumento del 9% di *Faecalibacterium prausnitzii* nel donatore vegetariano 3. Il donatore vegetariano 7 ha avuto un calo di *Clostridiaceae* (-16%) e *Peptostreptococcaceae* (-8,7%) e un aumento dei batterioidi (8,8%). Questi cambiamenti in due partecipanti che seguono una dieta vegetariana sono in linea con il fatto che *Bacteroides* comprende molti degradatori complessi del polisaccaride, che probabilmente hanno tratto beneficio dall'elevato consumo di verdure. Il benefico produttore di butirato, *F. prausnitzii*, è stato precedentemente associato a uno stato intestinale antinfiammatorio, probabilmente indotto da un'elevata assunzione di verdure. È stato anche osservato che il donatore mediterraneo numero 3 ha avuto un aumento dell'11,5% per le *Ruminococcaceae*, un'importante famiglia che degrada i carboidrati, che probabilmente è aumentata a causa del consumo aumentato di verdure grazie a una dieta in stile mediterraneo. Infine, il donatore di proteine numero 4 ha mostrato una diminuzione del 14,4% delle *Enterobacteriaceae*, che potrebbe essere spiegata con una possibile infezione gastrointestinale al basale. Il significato statistico di queste misure può essere confermato solo aumentando la dimensione del campione dello studio.

Conclusion

Da questa ricerca, è possibile concludere che i cambiamenti nei modelli alimentari sono stati in grado di indurre alcune differenze nel microbiota intestinale a livello tassonomico familiare. C'era una differenza significativa dopo due mesi di intervento per cinque famiglie di batteri, tutti contenenti potenziali agenti patogeni e sono stati visti significativamente ridotti nella dieta mediterranea rispetto alla dieta vegetariana e ricca di proteine.

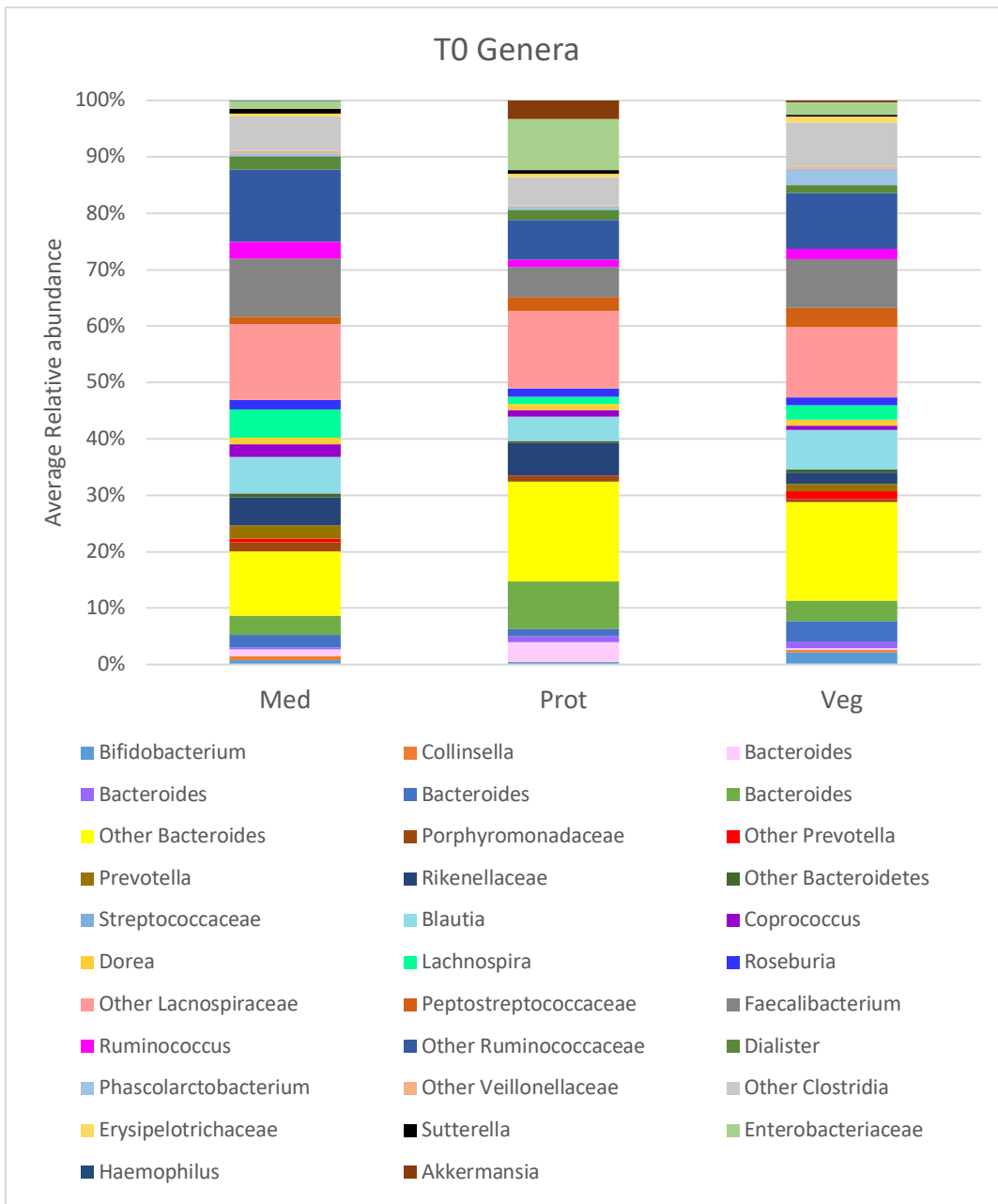
I generi batterici sono cambiati in alcuni individui dopo l'intervento dietetico, tuttavia non sono state riscontrate differenze significative a livello di genere confrontando i tre gruppi di intervento dietetico, probabilmente a causa delle piccole dimensioni del campione. Sono state osservate variazioni inter-individuali molto elevate, come specificato alla fine della sezione dei risultati, con alcuni partecipanti che hanno mostrato una risposta più forte ai cambiamenti nella dieta rispetto ad altri all'interno dello stesso gruppo di intervento. Poiché si tratta di uno studio piuttosto piccolo con solo 18 donatori fecali, non è stato possibile apprezzare statisticamente piccole differenze tra le comunità microbiche nei gruppi assegnati, sebbene possano avere una forte risposta agli interventi dietetici. Osservando i cambiamenti nella composizione del phylum del microbiota intestinale dopo l'intervento, il gruppo dietetico ad alto contenuto proteico ha mostrato alcuni risultati contrastanti nell'abbondanza di alcuni phyla rispetto alla dieta mediterranea e vegetariana, come una diminuzione dei proteobatteri (contenenti potenziali specie patogene) a T2, anche se i cambiamenti non erano statisticamente significativi. Si può concludere che a causa del numero limitato di soggetti all'interno di ciascun gruppo, l'effetto che la dieta ha sul microbiota intestinale è difficile da prevedere e mostra forti variazioni inter-individuali. Alcuni importanti fattori che possono influenzare la risposta ai cambiamenti microbici intestinali sono l'età dei donatori e lo stato di salute prima dell'inizio dell'intervento.

Complessivamente sono state osservate alcune differenze significative nell'impatto della dieta sul microbiota intestinale e, se confermato in un numero maggiore di soggetti, questo studio indicherebbe che la dieta mediterranea induce i cambiamenti più promettenti sulla composizione batterica intestinale (cioè una diminuzione dei potenziali agenti patogeni e un aumento in batteri benefici che degradano le fibre). Questo intervento dietetico sembra avere un impatto sulla composizione microbica dell'intestino e aumentando il numero di partecipanti è probabile che l'effetto si traduca in una modulazione più significativa delle abbondanze batteriche.

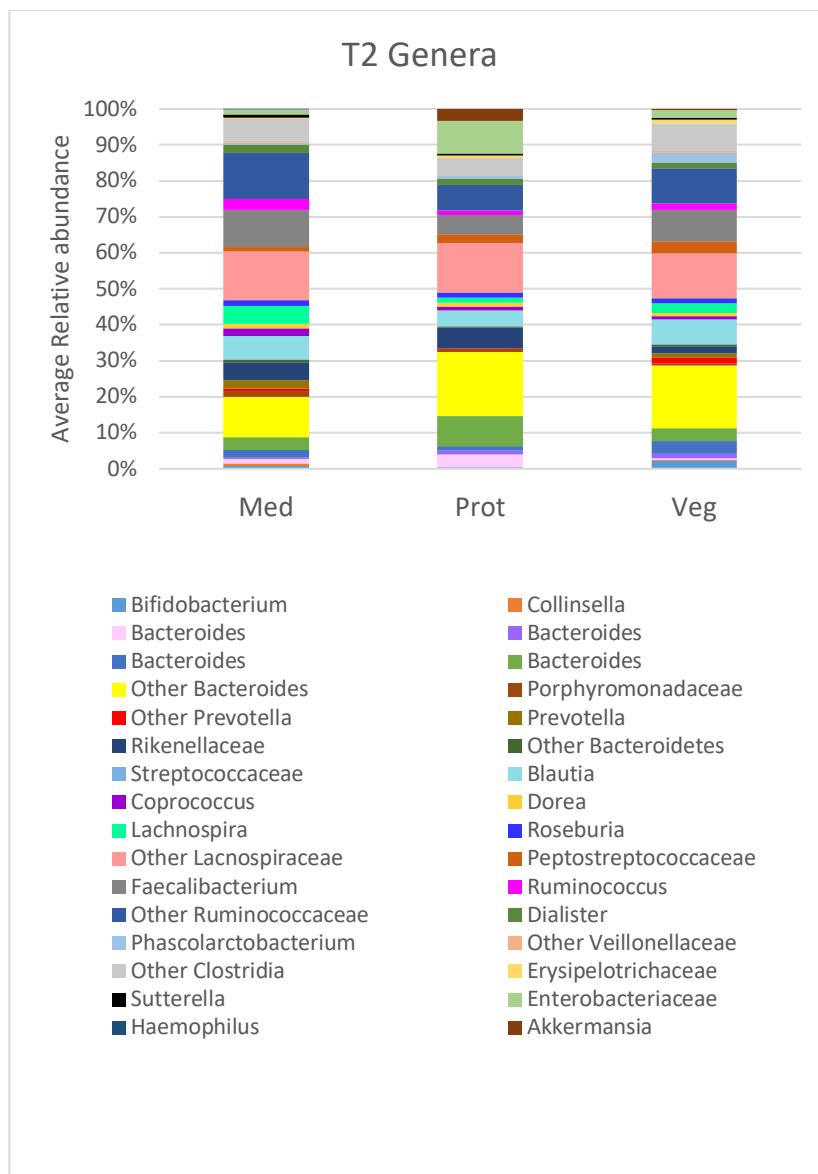
APPENDICE

Sono stati inviati a settembre i campioni fecali di altri nove pazienti inclusi nello studio e siamo in attesa dei risultati. Lo studio si concluderà con queste ultime analisi.

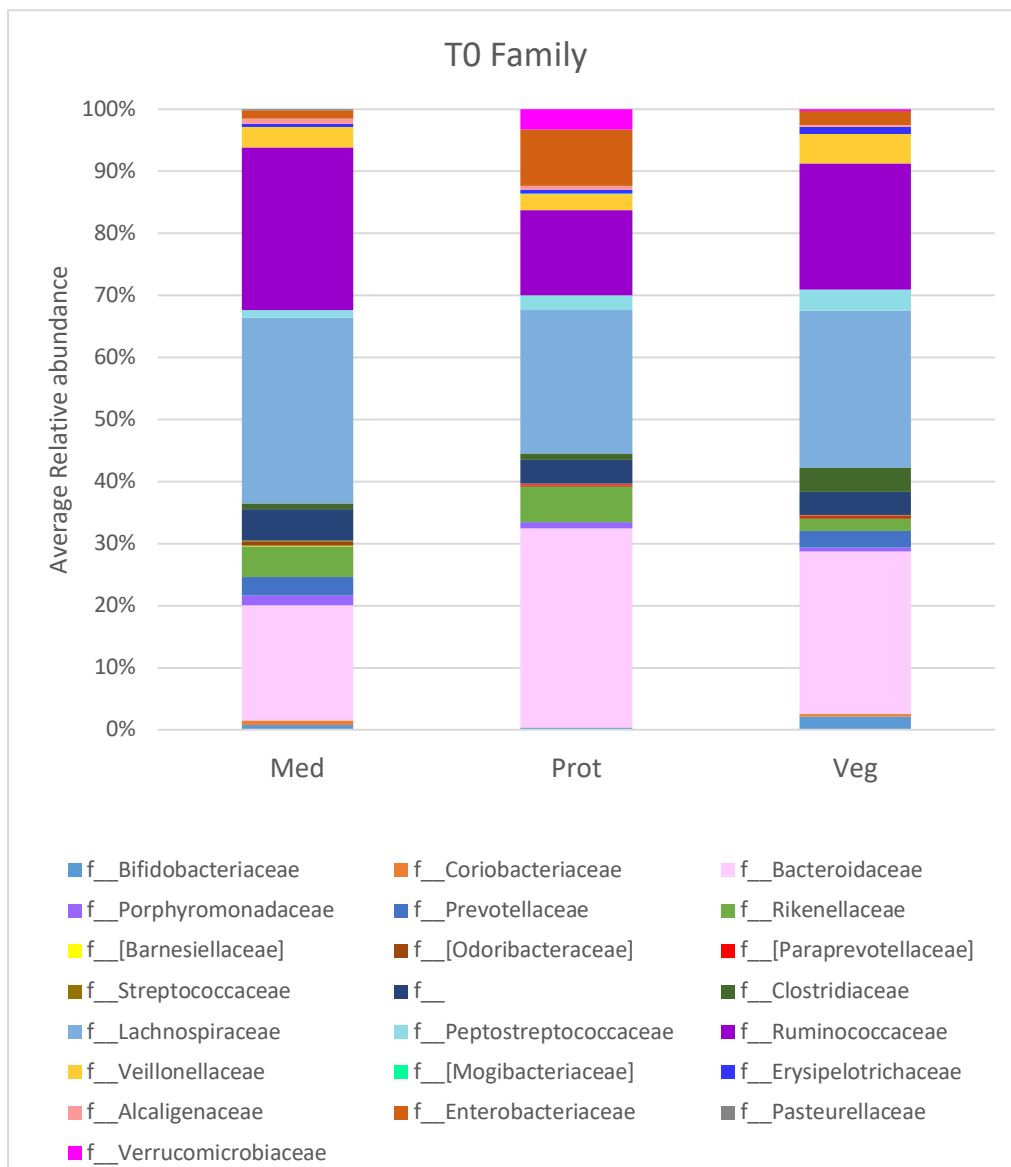
Generi di microbiota intestinale in ciascuna delle tre diete prima dell'intervento (T0)



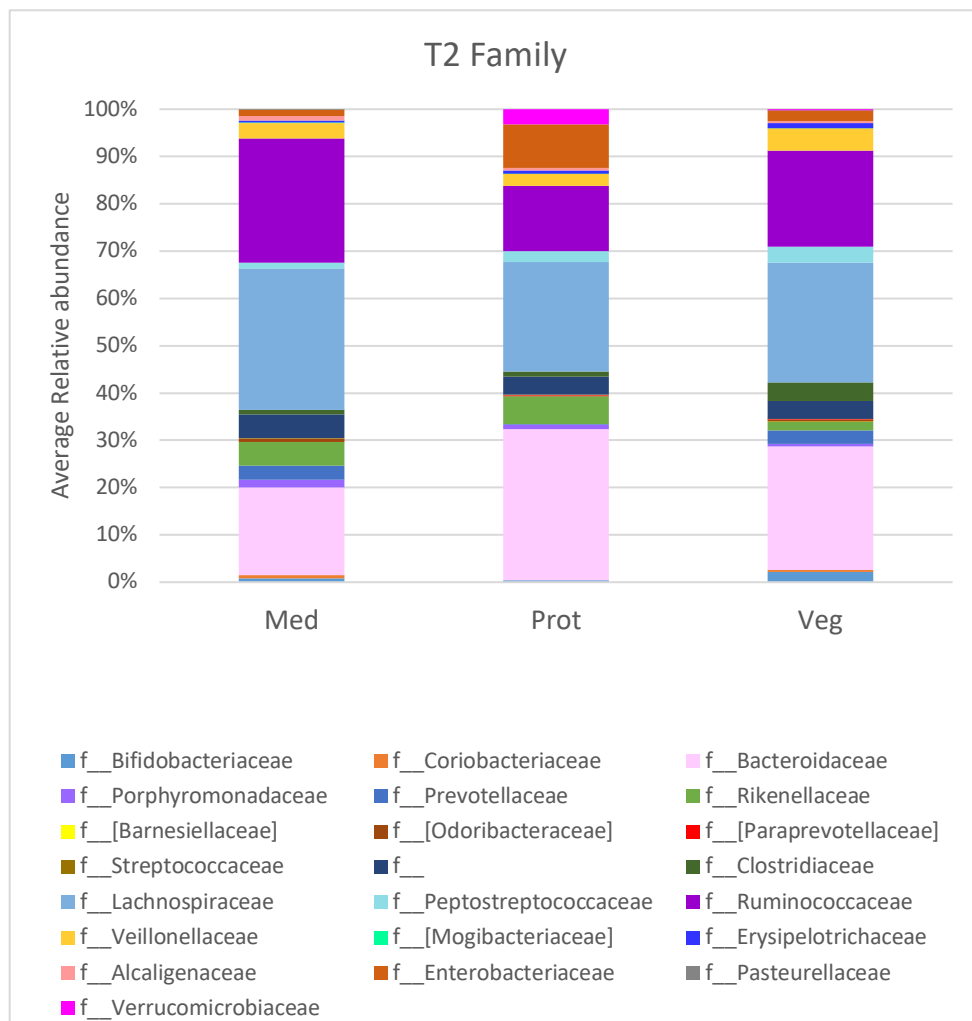
Generi di microbiota intestinale in ciascuna delle tre diete dopo l'intervento (T2)



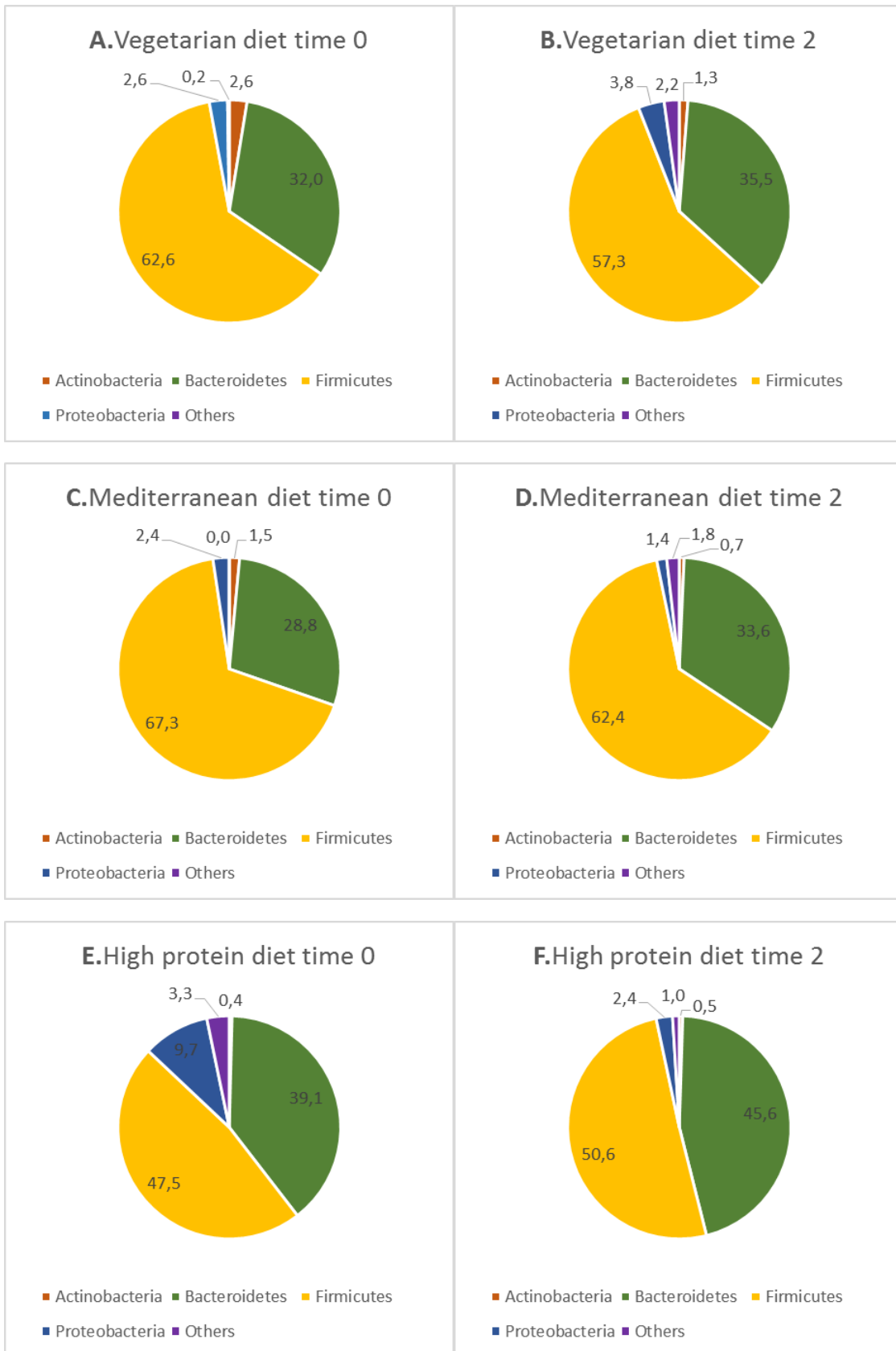
Phyla di microbiota intestinale in ciascuna delle tre diete prima dell'intervento (T0)



Phyla di microbiota intestinale in ciascuna delle tre diete dopo l'intervento (T2)



Phyla del microbiota intestinale in ciascuna delle tre diete a T0 e T2



Publicazioni:

- Veronese Nicola, Notarnicola Maria, Cisternino Annamaria, Reddavide 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Collagen proportionate area is an independent predictor of long-term outcome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. Buzzetti Elena, Hall Andrew, Ekstedt Mattias, Manuguerra Roberta, Guerrero Misas Marta, Covelli Claudia, Leandro Gioacchino, Luong TuVinh, Kechagias Stergios, Manesis Emanuel K, Pinzani Massimo, Dhillon Amar P, Tsochatzis Emmanuel A. *ALIMENTARY PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS*
- Diagnosis of chronic anaemia in gastrointestinal disorders: A guideline by the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO) and the Italian Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (SIGENP). Luca Elli, Lorenzo Norsa, Angelo Zullo, Antonio Carroccio, Carlo Girelli, Salvatore Oliva, Claudio Romano, Leandro Gioacchino, Massimo Bellini, Riccardo Marmo, Marco Soncini, Fabio Monica, Vincenzo De Francesco, Emma Paulon, Maria Domenica Cappellini, Irene Motta, Francesca Ferretti, Stefania Orlando, Pasquale Mansueto, Elisabetta Buscarini, Guido Manfredi, Carlo
- Fatty liver and mortality: a cohort population study in south Italy. Caruso Maria Gabriella, Nicola Veronese, Notarnicola Maria, CISTERNINO ANNA MARIA, Reddavide Rosa, Inguaggiato Rosa, Guerra Vito, Donghia Rossella, Logroscino Antonio, Rotolo Ornella, Chiloiro Marisa, Leandro Gioacchino, De Leonardis Giampiero, Tutino Valeria, Misciagna G, Bonfiglio Caterina, Guerra Rocco, Osella Alberto Ruben. *BMJ Open*
- Five common errors to avoid in clinical practice: the Italian Association of Hospital Gastroenterologists and Endoscopists (AIGO) choosing wisely campaign. STASI ELISA, Andrea Michielan, Gaetano Cristian Morreale, Alessandro Tozzi, Ludovica Venezia, Francesco Bortoluzzi, Omero Triossi, Marco Soncini, Leandro Gioacchino, Giuseppe Milazzo. *Internal and Emergency Medicine*
- Hospital admission for digestive diseases: Gastroenterology units offer a more effective and efficient care. Antonio Balzano, Flavia Carle, Cristina Tamburini, Fabio Monica, Giuseppe Milazzo, Paolo Spolaore, Marco Galadini, Fulvio Basili, Luigi Ricciardiello, Elisabetta Buscarini, Leandro Gioacchino. *DIGESTIVE AND LIVER DISEASE*
- Magnesium and Health Outcomes: An Umbrella Review of Systematic Reviews and Meta-Analyses of Observational and Intervention Studies. Nicola Veronese, Jacopo Demurtas, Gabriella Pesolillo, Stefano Celotto, Tommaso Barnini, Giovanni Calusi, Caruso Maria Gabriella, Notarnicola Maria, Reddavide Rosa, Brendon Stubbs, Marco Solmi, Stefania Maggi, Alberto Vaona, Joseph Firth, Lee Smith, Ai Koyanagi, Ligia Dominguez, Mario Barbagallo. *EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION*
- Real-life Glecaprevir/Pibrentasvir in a Large Cohort of Patients With Hepatitis C Virus Infection: The MISTRAL Study. Marcello Persico, Andrea Aglitti, Michele Milella, Carmine Coppola, Vincenzo Messina, Ernesto Claar, Ivan Gentile, Fernando Sogari, Paola Pierri, Lorenzo A. Surace, Filomena Morisco, Paolo Tundo, Giuseppina Brancaccio, Gaetano Serviddio, Pietro Gatti, Antonio P. Termite, Giovan G. Di Costanzo, Benedetto Caroleo, cozzolongo raffaele, Nicola Coppola, Annamaria Longo, Luca Fontanella, Alessandro Federico, Valerio Rosato, Irene Terrenato, Mario Masarone. *LIVER INTERNATIONAL*
- Trends in Adherence to the Mediterranean Diet in South Italy: A Cross Sectional Study. Nicola Veronese, Notarnicola Maria, CISTERNINO ANNA MARIA, Rosa Inguaggiato, Guerra Vito, Reddavide Rosa, Donghia Rossella, Rotolo Ornella, Iris Zinzi, Leandro Gioacchino, Tutino Valeria, Giovanni Misciagna, Caruso Maria Gabriella. *NUTRITION METABOLISM AND CARDIOVASCULAR DISEASES*
- Breath Tests for the Non-invasive Diagnosis of Small Intestinal Bacterial Overgrowth: A Systematic Review With Meta-analysis. G. Losurdo, G. Leandro, E. Ierardi, F. Perri, M. Barone, M. Principi, A. Di Leo. *J Neurogastroenterol Motil*.
- Alcohol associated liver disease 2020: A clinical practice guideline by the Italian Association for the Study of the Liver (AISF). G Addolorato, L Abenavoli, M Dallio, A Federico, G Germanie, S Gitto, G Leandro, C Loguercio, F Marra, E Stasi. *Digestive and Liver Disease*.
- Distinct associations of DSM-5 Somatic Symptom Disorder, the Diagnostic Criteria for Psychosomatic Research-Revised (DCPR-R) and symptom severity in patients with irritable bowel syndrome. Piero Porcelli, Massimo De Carne, Gioacchino Leandro. *General Hospital Psychiatry*.

- The Relationship between Epigenetics and Microbiota in Neuropsychiatric Diseases. M Lozupone, F D'Urso, C Piccininni, M La Montagna, R Sardone, E Resta, V Dibello, A Daniele, G Giannelli, A Bellomo, F Panza. Epigenomics.

Progetto 22/2018: ANALISI COSTO-BENEFICIO DI UN INTERVENTO BASATO SULLA DIETA MEDITERRANEA E L'ATTIVITÀ FISICA IN PAZIENTI DIABETICI E STEATOSICI

Titolo abbreviato del progetto: Diabete, NAFLD, dieta e attività fisica

Parole chiavi del progetto: Costo-efficacia, diabete, NAFLD

Principal Investigator: Dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Laboratorio di Epidemiologia: Di Lorenzo Angela, Franco Isabella, Bianco Antonella, Campanella Angelo, Mirizzi Antonella, Bonfiglio Caterina, Sorino Paolo. Servio di Radiologia: Fucilli Fabio, Giampaolo Nicola, Di Giovanni Giuseppe. Laboratorio Analisi: Antonio Lippolis, Pesole Letizia e Cervellera Alessandra. Biobanca: Antonio Lippolis, Pesole Letizia e Cervellera Alessandra

Background:

L'attività fisica ha sempre giocato un ruolo fondamentale nella prevenzione e trattamento delle malattie cronico degenerative.

Un aspetto importante è mantenere una buona forza muscolare. Le sfide che propongono gli anziani (>60 anni) non sono differenti di quelle che propongono persone più giovani ma nei casi individuali, dipendendo dell'età, adattazioni funzionali e strutturale ed una diminuita capacità in generale dev'essere considerata.

Nella misura che la vita del soggetto sia meno attiva più presto si manifesteranno i cambiamenti. I principali cambiamenti sono una ridotta capacità motoria in generale insieme a 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, 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 logico

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

Gli anziani inoltre sono portatori di una o più malattia cronica o fattori di rischio per malattie croniche di cui l'Italia non è esente.

Oltre alla attività fisica, nel Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica è maturata una esperienza di ricerca relativa alla somministrazione della Dieta Mediterranea per il trattamento di alcune malattie metaboliche. In particolare, la Dieta Mediterranea è stata somministrata per la terapia della Steatosi Epatica non Alcolica (NAFLD). Infatti, i progetti Nutriepa e Nutri_Att hanno utilizzato questa dieta come intervento sia per la NAFLD sia per stimare il suo effetto sia da solo che insieme ad un intervento di attività fisica, sulla composizione lipidica della membrana dei globuli rossi.

In questo ambito si inserisce questo progetto che si propone di integrare l'attività fisica e la dieta nell'ambito del Diabete Mellito e l'Obesità e l'impatto costo beneficio per il SSN. Il progetto è inoltre propedeutico ad un'integrazione dell'IRCCS con il territorio.

Obiettivi specifici dello studio:

Stimare il costo-beneficio dell'Attività Fisica e della Dieta Mediterranea nel confronto delle terapie farmacologiche convenzionali.

Obiettivo specifico 1:

Stimare l'effetto dell'Attività Fisica e della Dieta Mediterranea sulla Dislipidemia nel confronto dei un regime terapeutico farmacologico

Obiettivo specifico 2:

Stimare l'effetto dell'Attività Fisica e della Dieta Mediterranea sul Diabete Mellito nel confronto dei un regime terapeutico farmacologico

Materiali e metodi:

Il Progetto prevede l'arruolamento di soggetti con diagnosi di Diabete Mellito tipo II e con dislipidemie. Il campione si compone di 40 soggetti per ogni gruppo (diabetici, dislipidemici, controlli) per un totale di 120 arruolati. L'intervento da valutare consiste nella somministrazione di una dieta mediterranea a basso indice glicemico (LGIMD) e di un programma di attività fisica confezionato in base alle esigenze di ogni singolo paziente e calibrato su di un'intensità massima pari al 65% della Frequenza Cardiaca Massima.

Sarà chiesta la collaborazione dei MMMGG per il referral di pazienti al protocollo di ricerca.

Valutazione Funzionale

Cardiovascolare: Test del cammino (2 km)

Test Flessibilità: Seat and Reach Test. Da seduti si deve portare il torace avanti il massimo possibile Si misurano i centimetri che oltrepassano i piedi (+) o quelli che mancano per raggiungerli.

Test della forza: sono eseguito per i vari gruppi muscolari degli arti superiori e inferiori e si considerano validi per un determinate carico quando il paziente riesce a fare 10 ripetizioni dell'esercizio senza fatica (quadricipite, tricipite surale, deltoide, bicipite brachiale, tricipite brachiale).I dati della valutazione funzionale permetteranno di proporre due programmi alternati di allenamento della forza e un programma aerobico stabilito in base alla FFC saranno effettuate tre sedute settimanali della durata di un'ora. Per assicurare che il lavoro sia effettuato in condizioni di aerobiosi sarà controllata la concentrazione di acido lattico che non dovrà superare il valore di 3 mmol/l. Questo accertamento verrà effettuato nelle prime tre settimane di allenamento.

Analisi Statistica: La dimensione del campione è stata calcolata prendendo in considerazione un errore di tipo I pari allo 0.05 e di tipo II pari allo 0.10. La correlazione tra le misure dei diversi pazienti è stata fissata allo 0.4. Per la riduzione di una categoria nella severità della steatosi epatica, di 25 mg/dl della glicemia sono necessari 30 pazienti per gruppo.

L'analisi statistica prevede la descrizione dei pazienti in tabelle di contingenza secondo le caratteristiche delle variabili considerate: continue (media e SD) o categorica (%). Saranno applicati modelli lineari misti per la valutazione dell'effetto di entrambi gli interventi sui parametri biologici misurati ripetutamente. Sarà eseguita inoltre un'analisi costo-beneficio applicando diversi stimatori.

Risultati attesi:

Alla fine del programma i pazienti avranno migliorato notevolmente la forma fisica, migliorato tutte i parametri biochimici e diminuito la dose di medicinali presi per il trattamento specifico delle loro patologie.

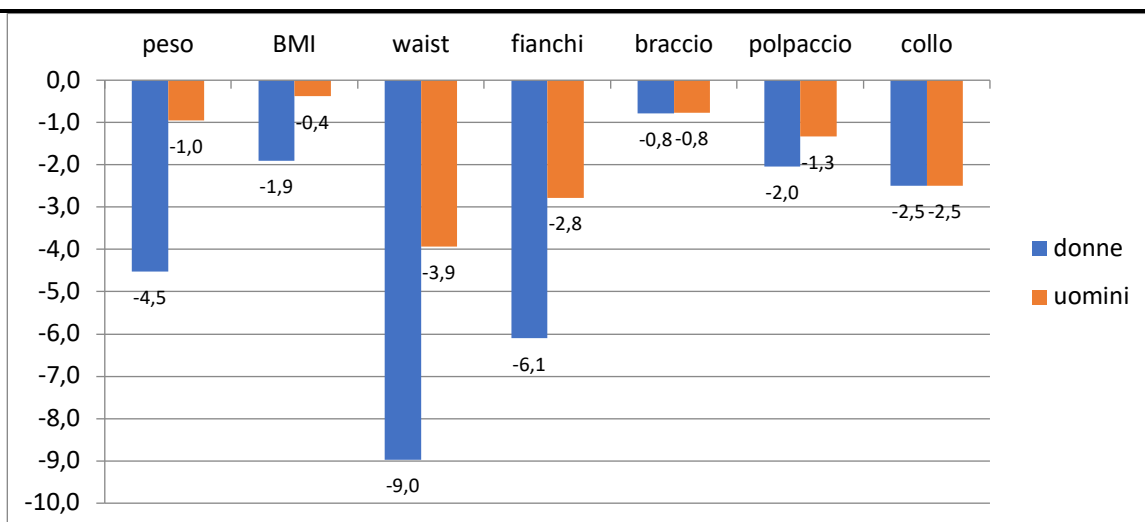
Stato di avanzamento del progetto:

Il Progetto è iniziato a marzo 2018. Il ritardo di inizio studio è stato 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 (acido lattico, glicemia).

Il progetto prevede un'attività svolta in palestra per 3 volte a settimana.

I risultati che abbiamo riscontrato, legati all'attività fisica, sono soddisfacenti ed in linea con le nostre aspettative. Abbiamo osservato un miglioramento generale dei parametri clinici: riduzione dei valori del colesterolo LDL e dell'indice HOMA. Riduzione della Steatosi Epatica. Riduzione delle dosi di farmaci come Metformina, statina e pillola della pressione.

Secondo i test motori svolti durante tutto il periodo, lo stato di forma fisica è notevolmente migliorato in tutti i partecipanti. Per quanto riguarda i risultati relativi alla somministrazione della Dieta Mediterranea ai partecipanti, nella figura 2 vengono mostrati i risultati ottenuti in riferimento ai parametri antropometrici.



Al 29 febbraio avevamo reclutato 38 arruolati attivi ed altri 15 erano in fase di arruolamento. Hanno concluso il progetto 12 soggetti. I soggetti che hanno abbandonato il progetto durante l'anno sono 8: 5 del primo gruppo di partecipanti e 3 del secondo.

Il progetto prevede un arruolamento fino al raggiungimento di 120 soggetti con un ciclo di 12 mesi completi.

I soggetti arruolati sino a febbraio 2020 sono così ripartiti:

| GRUPPO D'INTERVENTO | ARRUOLATI | PROGETTO TERMINATO | PROGETTO IN CORSO | ABBANDONATO |
|--------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------|
| DIABETICI | 20 | 6 | 10 | 4 |
| IPERTESI | 18 | 5 | 11 | 3 |
| DISLIPIDEMICI | 7 | 1 | 5 | 1 |

Il 10 marzo 2020 il progetto è stato sospeso a causa dell'emergenza sanitaria legata alla diffusione del Covid 19.

Publicazioni:

- Uric acid and potassium serum levels are independent predictors of blood pressure non-dipping in overweight or obese subjects. Zupo Roberta, Castellana Fabio Stefano, Boninfante Barbara, Lampignano Luisa, Lattanzio Antonio, Sardone Rodolfo, Giannelli Gianluigi, De Pergola Giovanni. Nutrients.
- Generalizability of sodium-glucose co-transporter-2 inhibitors cardiovascular outcome trials to the type 2 diabetes population: a systematic review and meta-analysis. M Castellana; F Procino; R Sardone; P Trimboli; G Giannelli. Cardiovascular Diabetology.
- Efficacy and safety of patient-led versus physician-led titration of basal insulin in patients with uncontrolled type 2 diabetes. A meta-analysis of randomized controlled trials. Castellana M. BMJ Open Diabetes Research & Care.
- Activity Energy Expenditure Predicts Clinical Average Levels of Physical Activity in Older Population: Results from Salus in Apulia Study. I Bortone, F Castellana, L Lampignano, R Zupo, B Moretti, G Giannelli, F Panza, R Sardone. Sensors.
- Impaired Fasting Plasma Glucose is a Risk indicator of Interventricular Septum Thickening among Non-Diabetic Subjects with Obesity. Zupo et al. Diabetes Research and Clinical Practice.
- Higher Muscle Mass Implies Increased Free-Thyroxine to Free-Triiodothyronine ratio in Subjects with Overweight and Obesity Journal: Frontiers in Endocrinology, section Obesity R Zupo, F Castellana, R Sardone, L Lampignano, S Paradiso, VA Giagulli, V Triggiani, L Di Lorenzo, G Giannelli, G De Pergola. Frontiers in Endocrinology.
- Roux-en-Y gastric bypass versus sleeve gastrectomy for remission of type 2 diabetes. Fabio Castellana et al. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.

Progetto n. 24/2018: 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: Nicola Veronese, Maria Notarnicola, Giampiero De Leonardis

Background:

La "Lipidomica" studia le molecole dei lipidi in modo "dinamico", ovvero non solo comprendendo la struttura e le funzioni, ma soprattutto seguendo i cambiamenti che si verificano durante il "metabolismo cellulare", in condizioni fisiologiche e patologiche, e definendone i ruoli nell'ambito del complesso equilibrio funzionale di un organismo vivente. L'analisi lipidomica di membrana include la descrizione quantitativa dei lipidi costituenti la membrana cellulare. I lipidi di membrana non presentano la medesima composizione quantitativa, ma variano a seconda del tessuto e del compartimento cellulare. La diversità nei residui di acidi grassi è necessaria per modulare le proprietà biofisiche e

biochimiche delle membrane, la cui composizione deve essere in accordo con le necessità cellulari in ogni condizione metabolica.

Il doppio strato fosfolipidico, con caratteristiche anfipatiche, costituente base della membrana cellulare, è stato definito il pacemaker metabolico della cellula, in grado di descrivere il network di attività e di segnali veicolati alla e dalla membrana. La parte idrofobica della membrana è costituita dagli acidi grassi (saturi, mono- e polinsaturi) che provengono sia dalla sintesi endogena che dalla dieta (soprattutto per gli acidi grassi essenziali omega-6 ed omega-3). Il controllo omeostatico della composizione dei fosfolipidi di membrana è essenziale per la crescita cellulare e per la sopravvivenza ed è finemente regolato. Diverse evidenze scientifiche hanno dimostrato che alterazioni della composizione lipidica della membrana cellulare sono associate al diabete, alle malattie cardiovascolari ed al cancro, considerato oggi una patologia metabolica dal momento che le cellule riprogrammano i loro pathways metabolici per sostenere l'elevata attività proliferativa. Le alterazioni del metabolismo lipidico sono spesso una conseguenza dell'attivazione di oncogeni che promuovono la trasformazione in senso neoplastico di un tessuto. Precedentemente, noi abbiamo dimostrato che il tessuto colico tumorale presenta elevate attività non solo dell'enzima FAS (acido grasso sintetasi), ma anche di altri enzimi lipogenici come LPL (Lipoprotein Lipasi), HMGCoA reduttasi e FPPS (Farnesyl pirofosfato sintetasi).

Inoltre, recentemente, un nostro studio ha dimostrato, su un numero ristretto di casi, un alterato profilo degli acidi grassi di membrana nei pazienti con CRC rispetto ai pazienti con patologie gastrointestinali non neoplastiche [11]. Si osservava soprattutto una riduzione dei livelli degli acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 (n-3 PUFA) e un alterato rapporto n-6/n-3 PUFA.

Recentemente, particolare attenzione è rivolta al dosaggio sierico delle LDL piccole e dense, considerate attendibili marcatori biochimici associati ad un aumentato rischio di patologie metaboliche.

La combinazione del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi e il dosaggio dei livelli sierici delle LDL piccole e dense nei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, associati a parametri biochimici canonici sarà importante per ottenere una descrizione accurata dello scenario delle trasformazioni metaboliche che possono evidenziarsi in queste patologie.

Il progetto parte con il vantaggio di una coorte già stabilita e seguita per dieci anni. Per ogni soggetto conosciamo la storia medica, lo stile di vita, esposizione a fattori nutrizionali e parametri di laboratorio classici. Inoltre, disponiamo di campioni biologici conservati nella biobanca su cui andare a dosare markers enzimatici o recettoriali che possono aiutare nell'identificazione di profili metabolici precoci di malattie complesse come il diabete, malattie cardiovascolari e cancro.

Stato di avanzamento del progetto (terza annualità):

Il progetto è proseguito nell'anno 2018 con la selezione dal data base MICOL III (2005) dei casi di cancro e infarto e controlli sani ed è stato creato un nuovo data base. Contemporaneamente è stato effettuato il dosaggio delle LDL piccole e dense di alcuni di questi campioni come di seguito riportati:

È stata anche rivalutata la coorte e sono stati aggiornati i dati di mortalità specifica a dicembre 2016.

Grazie alla ripresa dello studio della coorte MICOL, sono stati ricavati dati e associazioni con vari determinanti di malattia e patologie croniche che hanno permesso la pubblicazione di alcuni lavori scientifici di seguito riportati.

L'analisi lipidomica sui campioni non sarà effettuata perchè sui GR congelati da più di 20 anni il risultato non sarebbe attendibile.

Pubblicazioni:

- 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.

Obiettivi specifici dello studio:

Obiettivo specifico 1

Stimare l'effetto delle LDL piccole e dense sull'incidenza del Cancro e di infarto del miocardio

Obiettivo specifico 2:

Stimare l'effetto dell'interazione tra LDL piccole e dense e aderenza alla dieta Mediterranea sull'incidenza del Cancro e infarto del miocardio

Obiettivo 1:

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Obiettivo 2:

L'interazione tra patterns dietetici e profili lipidici sarà valutata mediante tests statistici appropriati al fine di individuare profili metabolici precoci di malattie complesse come le malattie cardiovascolari e il cancro.

Dati preliminari:

Indicazioni preliminari sull'efficienza dello studio delle LDL piccole e dense vengono fornite da lavori condotti nell'area di:

- Pauciullo P, et al. Atherosclerosis 203 (2009) 320–324.
- Gentile M et al. Clinica Chimica Acta 2008;388; 179–183
- Gentile M et al. Clinica Chimica Acta 2013;426: 1–5

Metodologie e analisi statistiche:

Disegno dello Studio

Studio nested caso-controllo in una coorte di soggetti over 65 di un'area Mediterranea del Sud Italia.

Dati preliminari

La tabella mostra il numero di campioni su cui è stato effettuato il dosaggio delle LDL piccole e dense e di altri parametri biochimici del metabolismo lipidico.

| n. campioni | Causa di morte | Dosaggi | | |
|-------------|-----------------------|---------|------|--------|
| 40/75 | CANCRO | LDL | FASN | HMGCoA |
| 42/85 | CVD | LDL | FASN | HMGCoA |
| 30/150 | caso controllo CANCRO | LDL | | |
| 9/170 | caso controllo CVD | LDL | | |

Metodologia di lavoro

La coorte 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 saranno individuati 2 soggetti controllo senza nessuno degli outcomes di interesse che verranno appaiati per sesso, età per ogni caso; quindi in totale saranno oggetto dello studio 480 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 sarà validata con i medici di famiglia di ciascun soggetto, secondo i seguenti indicatori di malattia certa: la diagnosi di evento cardiovascolare sarà effettuata sulla base della diagnosi di Infarto Acuto del Miocardio insieme ad almeno un ECG che

evidenzi lesioni acute del miocardio alla dimissione ospedaliera; la diagnosi di cancro sarà basata sulla presenza di diagnosi clinica e istopatologica o di dati ospedalieri che indichino procedure chirurgiche o terapie mediche per il cancro. Nel 2016 dal registro SDO e dall'ufficio anagrafe sono stati ricavati i dati di mortalità generale, mentre quelli di mortalità specifica non sono stati ancora aggiornati.

Analisi LDL piccole e dense

La valutazione dei livelli delle LDL piccole e dense nel siero dei casi incidenti di cancro e di infarto del miocardio, nonché dei controlli appartenenti tutti alla stessa coorte, conservato a -80°C, sarà effettuata utilizzando il Lipoprint System, una piattaforma tecnologica basata su una elettroforesi dei lipidi con un gel non denaturante di poliacrilamide. Il sistema separa 7 sub-frazioni di LDL a diversa densità e mobilità elettroforetica. La frazione delle LDL piccole e dense sarà ottenuta in percentuale rispetto alle LDL totali osservate.

Analisi Statistica

La descrizione del campione verrà effettuata con tabelle di contingenza utilizzando modelli statistici appropriati per dati quantitativi (media, deviazione standard) e qualitativi (percentuali).

Verranno utilizzati inoltre due tipi di modellistica: regressione logistica classica e con effetti random ed analisi della sopravvivenza. Il modello di regressione logistica multipla è particolarmente utile per quantificare l'associazione esistente tra un fattore di rischio (esposizione), in questo caso le LDL piccole e dense, e l'outcome binario di interesse. Ciò nonostante in certi casi esistono differenze tra gli individui che li rendono eterogenei tra di loro ma questa eterogeneità non è stata misurata né osservata. Per questo motivo verrà utilizzato un modello logistico misto che permette di modellare il rapporto esposizione-outcome tenendo conto di questa eterogeneità. Inoltre dopo il processo di stima dei parametri di interesse (Odds Ratio) degli effetti principali verranno esplorate tutte le interazioni biologicamente plausibili all'uopo di ottenere un modello valido e biologicamente parsimonioso. Successivo approccio alla stima dei parametri sarà la stima delle distribuzioni marginali con l'obiettivo di ottenere la probabilità del verificarsi dell'outcome per le varie combinazioni delle variabili contenute nel modello. Verrà inoltre effettuato un'analisi di sensibilità dei parametri stimati con l'obiettivo di saggiare quanto sono resistenti le stime ottenute alla proposta di scenari estremi. In questo analisi di sensibilità verranno presi in considerazione errori sistematici di classificazione, informazioni e confounding.

Il software statistico Stata 14.1 verrà utilizzato per tutte le analisi statistiche (Stata Statistical Software: Release 14, College Station, TX, USA).

Risultati attesi:

Ci aspettiamo una significativa associazione tra i profili lipidici delle membrane eritrocitarie e 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.

Analisi dei rischi, possibili problemi e soluzioni:

Lo stato dell'arte nella ricerca scientifica ed il forte razionale dello studio costituiscono delle basi importanti per il successo dello studio e per ridurre aspetti critici dello stesso. La coorte è ben strutturata, l'approccio metodologico riguardante la combinazione delle LDL piccole e dense, in diverse condizioni di salute dovrebbe assicurare che gli obiettivi del progetto verranno raggiunti.

Un aspetto critico potrebbe essere costituito dalla difficoltà di intervenire tramite i medici di famiglia per proporre nuovi interventi dietetici o nutraceutici basati su aspetti "omici" emergenti dal progetto. Comunque la comunità dei medici di famiglia di Castellana trovano nel nostro IRCCS un punto di riferimento come dimostra la continua collaborazione dall'anno 1985 fino ad oggi.

Innovazioni:

Il recente sviluppo delle piattaforme "omiche" offre l'opportunità di identificare marcatori precoci di un insulto patogeno e anche profili tipici associati.

Attraverso la costruzione di banche dati di profili lipidici integrando il nuovo dosaggio delle LDL piccole e dense con altri parametri biochimici ed enzimatici del pathway lipidico di soggetti all'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 collega tra loro i vari elementi di familiarità, dieta, stile di vita e la funzione metabolica.

Descrizione della complementarità e della sinergia del gruppo di ricerca:

Il Laboratorio di Biochimica Nutrizionale e l'ambulatorio di Nutrizione Clinica ha una consolidata esperienza di collaborazione con altre unità operative dell'IRCCS. In particolare vanta un'intensa collaborazione con il Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, che ha prodotto anche in quest'ultimo anno la pubblicazione di lavori scientifici su riviste internazionali.

Timeline / Prodotti finali:

Primo anno del progetto:

Nel primo anno e ½ del progetto sono stati individuati e validati i casi incidenti di infarto del miocardio e cancro nella coorte ed è stato costruito l'apposito database che include tutta l'informazione clinica e nutrizionale di cui si era in possesso.

Secondo anno del progetto:

E' stata aggiornata la mortalità generale e quella specifica per infarto e cancro. I casi sono stati in parte appaiati con i controlli.

E' stata avviato il dosaggio delle LDL piccole e dense, che continuerà per il terzo anno..

Terzo anno del progetto:

Dosaggio delle LDL piccole e dense in tutti i campioni (casi e controlli);

I profili lipidici e delle LDL piccole e dense verranno 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

| Fasi del progetto | Attività | Anno | Gen | Feb | Mar | Apr | Mag | Giun | Lug | Agosto | Sett | Ott | Nov | Dic |
|-------------------|---|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|--------|------|-----|-----|-----|
| Fase 1 | Raccolta del data base | Primo | | | | | | | | | | | | |
| | Campionamento materiale biologico | secondo | | | | | | | | | | | | |
| | Analisi delle LDL piccole e dense | Secondo e terzo | | | | | | | | | | | | |
| Fase 3 | Integrazione dei risultati ed analisi dei dati e pubblicazioni scientifiche | Terzo | | | | | | | | | | | | |

Rilevanza traslazionale e impatto per l'SSN

Lo sviluppo di piattaforme strutturate per studiare profili biochimici del metabolismo lipidico offre un'opportunità per identificare markers precoci di insulti patogenetici ed anche profili tipici di trasformazioni metaboliche e neoplastiche. L'identificazione di questi cambiamenti metabolici fornisce una finestra privilegiata di osservazione di meccanismi patogenetici, atta ad identificare diagnosi precoce e markers prognostici di malattie complesse con conseguente adozione di misure preventive

Con la costruzione di database basati sul profilo lipidico integrato con l'analisi e il dosaggio delle LDL piccole e dense in soggetti con infarto del miocardio e cancro, è possibile creare prototipi di nutraceutici sulla base di profili diagnostici individuali e basati sulle reali necessità dei soggetti. La strategia del progetto è mirata verso la medicina personalizzata. La potenza della diagnosi del profilo lipidico così come applicata in questo progetto, ricade nella sua abilità a personalizzare il profilo, il quale è il risultato della combinazione di analisi di laboratorio e dati medici storici del soggetto all'uopo di rintracciare la storia individuale e metterla in rapporto ai vari elementi della storia familiare, stile di vita, abitudini dietetiche e funzione metabolica

Publicazioni:

- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- Dietary inflammatory index and mortality: a cohort longitudinal study in a Mediterranean area. Nicola Veronese, CISTERNINO ANNA MARIA, Nitin Shivappa, James R. Hébert, Notarnicola Maria, Reddavid Rosa, Rosa Inguaggiato, Guerra Vito, Antonio Logroscino, Rotolo Ornella, Marisa Chiloiro, Leandro Gioacchino, De Leonardis Giampiero, Tutino Valeria, Giovanni Misciagna, L Fontana, Caruso Maria Gabriella. *JOURNAL OF HUMAN NUTRITION AND DIETETICS*
- Fatty acid synthase inhibitor orlistat impairs cell growth and down-regulates PD-L1 expression of a human T-cell leukemia line. Giorgia Cioccoloni, Angelo Aquino, Notarnicola Maria, Caruso Maria Gabriella, Enzo Bommassar, Manuela Zonfrillo, Simona Caporali, Isabella Faraoni, Cristina Villivà, Maria Pia Fuggetta, Ornella Franzese. *JOURNAL OF CHEMOTHERAPY*
- Mediterranean diet and knee osteoarthritis outcomes: A longitudinal cohort study. Nicola Veronese, Ai Koyanagi, Brendon Stubbs, Cyrus Cooper, Giuseppe Guglielmi, Rene Rizzoli, Leandro Punzi, Domenico Rogoli, Caruso Maria Gabriella, Rotolo Ornella, Notarnicola Maria, Nasser Al-Daghri, Lee Smith, Jean-Yves Reginster, Stefania Maggi. *CLINICAL NUTRITION*
- Non-alcoholic fatty liver disease is associated with higher metabolic expenditure in overweight and obese subjects: A Case-Control Study. Reddavid Rosa, CISTERNINO ANNA MARIA, Inguaggiato Rosa, Rotolo Ornella, Zinzi Iris, Nicola Veronese, Guerra Vito, Fucilli Fabio, Di Giovanni Giuseppe, Leandro Gioacchino, Giannico Sara, Caruso Maria Gabriella. *Nutrients*
- The Association between Dietary Magnesium Intake and Magnetic Resonance Parameters for Knee Osteoarthritis. Nicola Veronese, La Tegola Luciana, Caruso Maria Gabriella, Maggi Stefania, Guglielmi Giuseppe. *Nutrients*
- The relationship between dietary vitamin K and depressive symptoms in late adulthood: a cross-sectional analysis from a large cohort study. Francesco Bolzetta, Nicola Veronese, Brendon Stubbs, Marianna Noale, Alberto Vaona, Jacopo Demurtas, Stefano Celotto, Chiara Cacco, Alberto Cester, Caruso Maria Gabriella, Reddavid Rosa, Notarnicola Maria, Stefania Maggi, Ai Koyanagi, Michele Fornaro, Joseph Firth, Lee Smith, Marco Solmi. *Nutrients*
- Women in LOVE: Lacto-Ovo-Vegetarian Diet Rich in Omega-3 Improves Vasomotor Symptoms in Postmenopausal Women. An Exploratory Randomized Controlled Trial. Rotolo Ornella, Iris Zinzi, Nicola Veronese, CISTERNINO ANNA MARIA, Reddavid Rosa, Rosa Inguaggiato, Leandro Gioacchino, Notarnicola Maria, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, De Leonardis Giampiero, Guerra Vito, Donghia Rossella, Fucilli Fabio, Raffaella Licinio, Anna Mastrosimini, Caterina Rinaldi, Tiziana Daddabbo, Nicola Giampaolo, Palma Anna Iacovazzi, Giannico Sara, Caruso Maria Gabriella. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*
- Associations between body mass index, waist circumference and erectile dysfunction: a systematic review and META-analysis. Pizzol D, Smith L, Fontana L, Caruso MG, Bertoldo A, Demurtas J, McDermott D, Garolla A, Grabovac I, Veronese N. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*

Progetto n. 25/2018: 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: Giuseppe RIEZZO, Michele LINSALATA, Caterina CLEMENTE, Antonella ORLANDO, Benedetta D'ATTOMA, Manuela MARTULLI, Laura PROSPERO, Maria NOTARNICOLA, Maria Gabriella CARUSO, Valeria TUTINO, Isabella GIGANTE, Valentina DE NUNZIO, Guglielmina CHIMIANTI, Linda MONACI

A. Studio clinico - Background

Il presente progetto di ricerca corrente indaga le potenzialità terapeutiche di differenti regimi alimentari nel trattamento della IBS-D. L'attività di ricerca si articola su uno studio clinico ed uno pre-clinico. Il primo consiste di 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 e la lipidomica dei pazienti con IBS-D prima e dopo trattamento per 90 giorni con l'impiego di due diete adottate per la gestione dell'IBS (una dieta a basso contenuto di oligosaccaridi fermentabili, disaccaridi, monosaccaridi e polioli (FODMAPs) vs. una serie di consigli dietetici utili per i pz. 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 sembra essere particolarmente utile in pazienti affetti da IBS, anche se finora pochi trials randomizzati hanno riportato dati a favore della effettiva superiorità di una dieta lowFODMAPs (LFD) 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).

Lo studio pre-clinico si basa su 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 ai due diversi tipi di dieta, sulla modulazione della permeabilità intestinale (PI) studiando 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.

Risultati / stato di avanzamento

Pubblicazione su riviste internazionali con IF

Orlando A, Tutino V, Notarnicola M, Riezzo G, Linsalata M, Clemente C, Prospero L, Martulli M, D'Attoma B, De Nunzio V, Russo F. Improved Symptom Profiles and Minimal Inflammation in IBS-D Patients Undergoing a Long-Term Low-FODMAP Diet: A Lipidomic Perspective. *Nutrients*. 2020 Jun 2;12(6):1652. doi: 10.3390/nu12061652. PMID: 32498383; PMCID: PMC7353020.

Obiettivo dello studio

Dopo aver dimostrato come una LFD a lungo termine possa indurre cambiamenti nel profilo dei sintomi e negli indici antropometrici, migliorare il profilo lipidomico e gli indici di flogosi (vedi rif. bibliografico) ci siamo concentrati sugli effetti della LFD sul profilo psicologico dei pazienti con IBS-D. Infatti, è stato ampiamente dimostrato in letteratura che pazienti con IBS presentano disturbi psicopatologici che interferiscono, nel complesso, sulla qualità della vita (QoL). La nostra ipotesi è che l'assunzione a lungo termine di una LFD induca risultati significativi anche sui sintomi extra-gastrointestinali, con riduzione dello stress e della componente ansiosa e depressiva. Poco si sa, invece, dei meccanismi che sono alla base della connessione cervello-intestino, per cui andremo ad analizzare il ruolo degli ormoni gastrointestinali e dei marker immunologici. A tal proposito la letteratura si è concentrata sui livelli di serotonina (5-HT) nei pazienti con IBS, in particolare, sulla capacità della serotonina di modulare la motilità intestinale nonché il tono dell'umore del paziente. Nello specifico, nei pazienti con IBS, il rilascio spontaneo della serotonina risulta significativamente aumentato, indipendentemente dalle abitudini dell'alvo, e contribuisce all'incremento del dolore addominale, probabilmente mediante la condizione di "low grade inflammation".

Materiali e metodi

Venti pazienti IBS-D in accordo con i criteri di Roma IV sono stati sottoposti a 90 giorni di LFD personalizzata. I questionari validati per i sintomi gastrointestinali e per i sintomi psicologici sono stati somministrati prima e dopo la dieta. Ciascun paziente ha inoltre effettuato prelievi ematici che ci permetteranno di effettuare il dosaggio dei peptidi gastrointestinali e dei marker di infiammazione.

Descrizione dei dati preliminari in corso di analisi

Alla fine della dieta, sia i sintomi IBS che le scale relative alla valutazione psicopatologica e QoL erano tutte significativamente migliorate dopo il periodo di dieta. Come già indicato nell'articolo riportato sopra, la sintomatologia gastrointestinale era calcolata con il questionario IBS Severity Scoring System (IBS - SSS). L'IBS - SSS è un questionario a cinque voci che misura la frequenza e l'intensità del dolore addominale, la gravità della distensione addominale, l'insoddisfazione per le abitudini intestinali e l'interferenza dell'IBS con la vita quotidiana, con un punteggio da 0 a 500. Abbiamo utilizzato il cut-off dei punteggi IBS - SSS per valutare la gravità dell'IBS secondo le seguenti classi; <175 per IBS lieve, 175-300 per IBS moderata e > 300 per IBS grave. Sia lo score totale sia lo score dei singoli item si riducono significativamente (Tabella 1).

Tabella 1. IBS-SSS items dei pazienti con IBS-D registrati prima e dopo la lowFODMAPs diet

| | Prima | Dopo | p |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|-------|
| Score totale | 252,5 [223,75-306,00] | 90,00 [45,75-196,25] | <0,00 |
| Intensità del dolore addominale | 45,00 [25,00-57,50] | 17,50 [0,00-30,00] | <0,00 |
| Freq. del dolore addominale | 45,00 [17,50-70,00] | 10,00 [0,00-30,00] | <0,00 |
| Distensione addominale | 50,00 [25,00-75,00] | 22,50 [3,00-30,00] | <0,00 |
| Insoddisfazione dell'alvo | 72,50 [42,75-75,00] | 25,00 [14,25-26,25] | 0,003 |
| Interferenza con la QoL | 70,00 [51,25-75,00] | 25,00 [9,50-55,00] | 0,002 |

| | Prima | Dopo | p |
|---------------------------------|------------------|------------------|--------|
| Frequenza di evacuazione | 2,00 [1,00-2,62] | 1,00 [1,00-1,00] | <0,001 |
| Frequenza di evac. ultimi 10 gg | 2,00 [1,00-2,00] | 1,00 [1,00-1,00] | <0,001 |

Dati espressi come Mediana e percentile. Test utilizzato Wilcoxon signed-rank test; differenze significative per $p < 0.05$;

Per indagare le variabili psicologiche abbiamo utilizzato il questionario Symptom Checklist-90 scale (SCL-90-R). Per valutare, invece, la QoL abbiamo utilizzato il questionario Short Form-36 Health Survey (SF-36), che indaga la percezione dello stato di salute, e l'IBS Quality of Life Questionnaire (IBS-QoL) che si concentra maggiormente sull'influenza dei sintomi dell'IBS sulla qualità della vita.

Il questionario SCL-90 valuta un ampio spettro di sintomi psicopatologici, in particolare 9 dimensioni sintomatologiche primarie e 3 indici globali, dei quali abbiamo considerato solo il GSI (indicatore globale dell'intensità attuale del disagio psichico percepito dal soggetto). Si considerano di interesse punteggi medi uguali o maggiori di 1,00. Dalla somministrazione del test si nota prima di tutto che la scala somatizzazione è l'unica che supera il cut off, suggerendo il coinvolgimento dei sintomi gastrointestinali. Nonostante ciò, la scala depressione, ansia e ossessione-compulsione risultano comunque vicine al cut-off, dimostrando la presenza nei pazienti di una sintomatologia psicopatologica che, tuttavia, non è conclamata. Dopo il periodo di 90 gg di LFD sono evidenti significative riduzioni di numerosi indici e scale, prima di tutto nell'indice di valutazione globale, e nello specifico, nella dimensione della **somatizzazione**, che riflette il disagio legato alla percezione di disfunzioni corporee, mostrando una riduzione dei sintomi gastrointestinali, respiratori e cardiovascolari; dell'**ipersensibilità interpersonale**, che riflette sentimenti di inadeguatezza e inferiorità; dell'**ansia**, dello **psicoticismo** (ritiro e isolamento); dell'**ostilità**, con una riduzione, quindi di uno stato affettivo negativo di rabbia, dei **disturbi del sonno** e della **depressione** (Tabella 3).

Tabella 3. SCL-90 items dei pazienti IBS-D registrati prima e dopo la LFD

| | Prima | Dopo | p |
|-----------------------------|------------------|------------------|-------|
| GSI (Indice globale) | 0,71 [0,28-1,25] | 0,47 [0,13-0,76] | 0,008 |
| Somatizzazione | 1,08 [0,58-1,68] | 0,41 [0,22-0,87] | 0,003 |
| Ossessione-compul. | 0,80 [0,35-1,60] | 0,65 [0,17-1,10] | 0,10 |
| Ipersens. Interpers. | 0,55 [0,00-1,02] | 0,38 [0,11-0,55] | 0,007 |
| Depressione | 0,84 [0,44-1,25] | 0,46 [0,15-1,26] | 0,04 |
| Ansia | 0,80 [0,37-1,12] | 0,40 [0,10-0,65] | 0,01 |
| Ostilità | 0,50 [0,16-0,87] | 0,33 [0,16-0,50] | 0,02 |
| Ansia fobica | 0,07 [0,00-0,46] | 0,00 [0,00-0,28] | 0,16 |
| Ideazione paranoide | 0,41 [0,29-1,20] | 0,41 [0,16-0,87] | 0,49 |
| Psicoticismo | 0,35 [0,00-0,70] | 0,15 [0,00-0,30] | 0,01 |
| Disturbi del sonno | 0,66 [0,00-2,00] | 0,66 [0,00-1,33] | 0,36 |

Dati espressi come Mediana e percentile. Test utilizzato Wilcoxon signed-rank test; differenze significative per $p < 0.05$;

Il questionario SF-36 misura lo stato di salute percepita dal paziente. I singoli item e le sottoscale sono organizzati in modo tale che a punteggio maggiore corrisponde migliore stato di salute. Le prime tre sottoscale riflettono la **salute fisica**

(attività fisica, limitazioni delle attività specifiche del ruolo dovute a problemi fisici, dolore fisico); quelle intermedie la **salute in generale** (salute generale, vitalità); le ultime 3 misurano aspetti della **salute psicologico-emotiva** (limitazioni nell'attività di tipo sociale, limitazioni delle attività specifiche del ruolo dovute a problemi emotivi, salute mentale). È possibile calcolare, inoltre, i valori di **due indici globali, uno relativo alla salute fisica, uno relativo a quella mentale**. Questi indici sono ricavati dalle 8 scale e permettono di sintetizzare in soli due punteggi i risultati di tutte le scale. Dal confronto degli score del questionario prima e dopo LFD, è emerso che la LFD contribuisce al miglioramento della QoL. In particolare, le scale del test che presentano valori fortemente significativi sono le scale dolore fisico, vitalità, ruolo fisico e salute generale (Tabella 2).

Tabella 2. SF-36 items dei pazienti IBS-D registrati prima e dopo la lowFODMAPs

| | Prima | Dopo | p |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|--------|
| Attività fisica | 80,00 [73,75-96,25] | 90,00 [73,75-100,00] | 0,15 |
| Ruolo fisico | 87,50 [25,00-100,00] | 100,00 [100,00-100,00] | 0,02 |
| Dolore | 51,00 [41,00-65,00] | 84,00 [69,50-100,00] | <0,001 |
| Salute generale | 48,50 [35,00-60,75] | 66,00 [55,25-73,25] | 0,02 |
| Vitalità | 45,00 [28,75-70,00] | 55,00 [43,75-71,25] | 0,01 |
| Attività sociale | 68,75 [50,00-87,50] | 87,50 [59,37-100,00] | 0,06 |
| Ruolo emotivo | 100,00 [33,33-100,00] | 100,00 [66,66-100,00] | 0,16 |
| Stato emotivo | 58,00 [52,00-77,00] | 72,00 [48,00-85,00] | 0,06 |
| INDICI SINTETICI | | | |
| Salute fisica | 46,38 [42,62-50,24] | 55,22 [49,70-57,77] | 0,002 |
| Salute mentale | 39,38 [17,67-51,84] | 46,71 [26,71-51,41] | 0,10 |

Dati espressi come Mediana e percentile. Test utilizzato Wilcoxon signed-rank test; differenze significative per $p < 0.05$;

Il questionario IBS-QoL, infine, indaga l'influenza dei sintomi dell'IBS sulla qualità della vita. I singoli item e le sottoscale sono organizzati in modo tale che tanto più è basso il punteggio tanto migliore è lo stato di salute. Dall'analisi dei risultati si nota chiaramente l'effetto positivo della LFD sin dallo score totale. Vi è un miglioramento significativo nelle sottoscale Disforia, Interferenza con l'attività, immagine corporea, preoccupazione sulla salute, reazione sociale e relazioni. Ciò dimostra l'impatto significativo sull'interazione sociale e sulla percezione di sé. Al contrario la scala evitamento cibo non indica miglioramenti probabilmente a causa del timore di assaggiare cibi che potrebbero riacutizzare la sintomatologia gastrointestinale.

Table 4. IBS-QoL items dei pazienti IBS-D registrati prima e dopo la LFD

| | Prima | Dopo | p |
|-----------------------|---------------------|---------------------|--------|
| Score Totale | 29,77 [15,25-48,16] | 15,44 [8,64-22,79] | <0,001 |
| Disforia | 25,00 [15,62-52,34] | 12,50 [3,12-24,21] | <0,001 |
| Interfer. Attività | 33,92 [21,42-55,35] | 12,50 [8,92-24,10] | <0,001 |
| Immagine corporea | 37,50 [18,75-51,56] | 12,50 [6,25-23,43] | <0,001 |
| Preoccupazione salute | 20,83 [12,50-50,00] | 16,66 [0,00-33,33] | 0,02 |
| Evitamento cibo | 41,66 [31,25-68,75] | 50,00 [39,58-66,66] | 0,82 |
| Reazione sociale | 18,75 [4,68-42,18] | 9,37 [0,00-18,75] | 0,002 |
| Sessualità | 0,00 [0,00-15,62] | 0,00 [0,00-0,00] | 0,15 |
| Relazioni | 12,50 [6,25-43,75] | 0,00 [0,00-16,66] | 0,003 |

Dati espressi come Mediana e percentile. Test utilizzato Wilcoxon signed-rank test; differenze significative per $p < 0.05$;

I dati ottenuti ci permettono di dimostrare la stretta relazione tra intestino e cervello (gut-brain axis) dal momento che il miglioramento dei sintomi si ripercuote in maniera inequivocabile sul profilo psicologico del paziente affetto da IBS. Passo successivo è comprendere quali siano i meccanismi fisiopatologici che sottendono tali connessioni. Sono in corso i dosaggi di specifici peptidi gastrointestinali coinvolti nella patogenesi della IBS quali serotonina e Brain-Derived Nerve Factor (BDNF) così come specifici marker di infiammazione - interleukina (IL)-6 e IL 8 - coinvolti in prima linea nell'infiammazione intestinale e in pazienti predisposti all'IBS.

B. Studio pre-clinico - Background

L'alterazione dell'integrità dell'epitelio intestinale può essere determinata sia da fattori intestinali che sistemici. Nel caso dell'IBS, i mediatori di infiammazione, quali ad esempio i prodotti delle mastcellule, possono contribuire a una alterazione della funzione di barriera intestinale. La tryptase è una serino-proteasi rilasciata durante il processo di degranolazione delle mastcellule. Nei pazienti con IBS, e in particolare negli IBS-D, è stato riportato un aumentato rilascio di tryptase. L'esposizione luminale alla tryptase influenza, inoltre, la permeabilità paracellulare sia in sistemi *in vitro* che *ex vivo*.

Le alterazioni nella funzione di barriera, così come si osservano in patologie funzionali quali l'IBS come pure in condizioni neoplastiche del tratto GI, possono favorire l'ingresso dei batteri e dei loro prodotti. Il lipopolisaccaride (LPS), componente predominante nella parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è risultato in grado di influenzare la funzione di barriera. In condizioni fisiologiche, l'LPS non è in grado di attraversare l'epitelio integro, ma in presenza di una ridotta integrità epiteliale, riesce a attraversare la barriera GI. Sebbene siano note le potenzialità di tali mediatori a livello sistemico, dove possono essere agevolmente dosati, poco è ancora noto circa i più fini effetti a livello molecolare sulla funzione di barriera intestinale in modelli sperimentali *in vitro*.

Risultati / stato di avanzamento

Sperimentazione *in vitro*

Sulla base di tali premesse, il progetto prevedeva una sperimentazione *in vitro* condotta su una linea cellulare umana di tumore intestinale (Caco-2). Preliminarmente, si è proceduti all'allestimento di colture in monostrato mediante l'uso di inserti, al fine di valutare l'effetto sulla vitalità cellulare di concentrazioni crescenti di tryptase ed LPS nonché della loro co-somministrazione, in presenza e in assenza dei rispettivi inibitori. E' stato quindi valutato l'effetto di tryptase ed LPS sulla modulazione della permeabilità intestinale attraverso la misura della resistenza elettrica transepiteliale e il flusso di markers fluorescenti, nonché l'espressione di differenti proteine di giunzione intercellulare.

E' stato poi effettuato il dosaggio dei livelli di tryptase ed LPS sui campioni di plasma di un gruppo di soggetti controllo, nonché dei pazienti IBS-D sottoposti ai due diversi tipi di dieta. Attualmente si sta procedendo all'analisi dei risultati ottenuti al fine di saggiare tali campioni plasmatici sulle cellule Caco-2, e valutare il loro effetto sulla modulazione della permeabilità intestinale. I livelli di tryptase saranno poi eventualmente correlati all'alterazione della funzione di barriera rispetto al pre e post intervento dietetico.

Sperimentazione *in vivo*

La collaborazione con il Laboratorio di Biochimica nutrizionale ha permesso di studiare il profilo lipidomico nelle membrane dei globuli rossi di soggetti IBS-D prima e dopo trattamento con dieta a basso contenuto in FODMAPs (Orlando A, et al. *Nutrients*. 2020 Jun 2;12(6):1652.). Sono attualmente in corso gli esperimenti finalizzati allo studio delle alterazioni del metabolismo glicidico in un modello animale di IBS trattato con dieta a basso contenuto in carboidrati.

Publicazioni:

- 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.
- 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.
- 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).
- An *In Vitro* Study on Mitochondrial Compensatory Response Induced by Gliadin Peptides in Caco-2 Cells. Orlando Antonella, Chimienti Guglielmina, Pesce Vito, Fracasso Flavio, Lezza Angela Maria Serena, Russo Francesco. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*.
- Chronic functional constipation is strongly linked to vitamin D deficiency. Panarese Alba, Pesce Francesco, Pietro Porcelli, Riezzo Giuseppe, Iacovazzi Palma Aurelia, Leone Carla Maria, De Carne Massimo, Rinaldi Caterina Mammone, Shahini Endrit. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*
- Deletion of OGG1 Results in a Differential Signature of Oxidized Purine Base Damage in mtDNA Regions. Chimienti Guglielmina, Pesce Vito, Fracasso Flavio, Russo Francesco, de Souza-Pinto Nadja Cristhina, Bohr Vilhelm A, Lezza Angela Maria Serena. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*
- Differences in Liver TFAM Binding to mtDNA and mtDNA Damage between Aged and Extremely Aged Rats. Chimienti Guglielmina, Picca Anna, Fracasso Flavio, Marzetti Emanuele, Calvani Riccardo, Leeuwenburgh

Christiaan, Russo Francesco, Lezza Angela Maria Serena, Pesce Vito. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES

- Effects of Long-Term Administration of Lactobacillus Reuteri DSM-17938 on Circulating Levels of 5-HT and BDNF in Adults With Functional Constipation. Riezzo Giuseppe, Guglielmina Chimienti, Orlando Antonella, Benedetta D'Attoma, Caterina Clemente, Russo Francesco. Beneficial Microbes
- Investigation on the allergen profile of the soluble fraction of autoclaved peanuts and its interaction with Caco-2 cells. Bavaro Simona L, Orlando Antonella, De Angelis Elisabetta, Russo Francesco, Monaci Linda. Food & Function
- Lactobacillus Rhamnosus GG Affects the BDNF System in Brain Samples of Wistar Rats with Pepsin-Trypsin-Digested Gliadin (PTG)-Induced Enteropathy A Orlando, G Chimienti, AMS Lezza, V Pesce, I Gigante, B D'Attoma, F Russo. Nutrients
- Improved Symptom Profiles and Minimal Inflammation in IBS-D Patients Undergoing a Long-Term Low-FODMAP Diet: A Lipidomic Perspective. A Orlando, V Tutino, M Notarnicola, G Riezzo, M Linsalata, C Clemente, L Prospero, M Martulli, B D'Attoma, V De Nunzio and F Russo Nutrients

Progetto 24/2019: CONFRONTO DI UNA DIETA MEDITERRANEA A BASSO INDICE GLICEMICO (LGIMD) CON UNA DIETA MEDITERRANEA A BASSO INDICE GLICEMICO E A KM0 CON BASSO INDICE INFIAMMATORIO (LGIMD2.0). VALUTAZIONE DELL'ADERENZA E VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI SULL'INFIAMMAZIONE DI BASSO GRADO E SUL PROFILO BIOCHIMICO- METABOLICO.

Principal Investigator: Dott. Alberto Ruben Osella

Partecipanti: Laboratorio di Epidemiologia: Osella Alberto R., Di Lorenzo Angela, Franco Isabella e Bianco Antonella, Campanella Angelo, Mirizzi Antonella, Bonfiglio Caterina, Sorino Paolo.

Background:

Dai dati Istat emerge che i pazienti cronici in Puglia hanno un impatto sul Sistema Sanitario Regionale pari a circa 3,1 miliardi di euro all'anno. La Puglia risulta così essere terza in Italia (dopo Sardegna e Calabria) per numero di abitanti con tre o più cronicità gravi e seconda (dopo la Sardegna) per numero di abitanti con una cronicità grave. Tra i fattori di rischio delle patologie croniche c'è l'infiammazione di basso grado, caratterizzata da un'aumentata concentrazione di marcatori infiammatori in assenza di sintomi evidenti. Recenti studi associano questa condizione allo sviluppo del cancro, delle malattie cardiovascolari e del diabete di tipo 2 e gli stessi suggeriscono che l'infiammazione di basso grado è mitigata da comportamenti di promozione della salute come abitudini alimentari sane, attività fisica, mantenimento del peso corporeo.

Da sempre la dieta mediterranea viene studiata per la prevenzione e il trattamento delle malattie croniche. In questo senso l'esperienza maturata nel Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica tramite la progettazione e conduzione di più trial clinici con diversi tipi di diete che includevano la Dieta Mediterranea a basso Indice Glicemico (LGIMD) senza restrizione calorica costituisce un importante punto di partenza per la ricerca dell'effetto globale della dieta sulle malattie croniche. La LGIMD confezionata dal laboratorio ha un Indice Glicemico minore di 50. Inoltre, non più del 10% delle calorie giornaliere totali provengono da grassi saturi. Le caratteristiche della dieta soddisfano i criteri accettati dalla letteratura come ottimali sia per la struttura della Dieta Mediterranea sia come supporto terapeutico nutrizionale. Tuttavia, i dati sulla bassa aderenza della popolazione allo schema dietetico portano a riflettere: i soggetti sanno di dover cambiare abitudini alimentari ma non agiscono con scelte e comportamenti coerenti.

La LGIMD spesso risulta troppo restrittiva, poco aperta alle innovazioni in campo alimentare e poco legata ai nuovi modelli di produzione e di consumo. Inoltre, alcuni dei prodotti accostati a questo modello alimentare negli ultimi anni sono oggetto di grandi produzioni industriali con ingredienti di bassa qualità e provenienza non sempre specificata. Per il consumatore medio risulta difficile scindere gli alimenti virtuosi da quelli di bassa qualità, soprattutto in condizioni socio-economiche più basse.

La Dieta Mediterranea deve essere intesa come alimentazione basata su alimenti tipici del bacino Mediterraneo, ovvero prodotti naturali e non raffinati. Una dieta così concepita può contribuire a modulare l'infiammazione. La ricerca negli ultimi anni ha dimostrato che ci sono alimenti in grado di stimolare uno stato infiammatorio, e altri che possono contribuire a ridurlo. In particolare, esistono numerose prove sulla relazione tra la dieta mediterranea e un'infiammazione di basso grado sia negli studi osservazionali che di intervento. Una recente review e una meta-analisi di studi randomizzati

controllati hanno dimostrato che un modello alimentare mediterraneo riduce l'infiammazione e migliora la funzione endoteliale. Uno studio di 12 mesi su soggetti ad alto rischio di malattia cardiovascolare che hanno aderito allo studio PREDIMED ha mostrato che i biomarcatori infiammatori correlati all'instabilità della placca, come la proteina C-reattiva e l'interleuchina-6, erano ridotti nei gruppi assegnati a un MD rispetto al basso contenuto di grassi gruppo dieta.

Obiettivi specifici dello studio:

Lo studio si propone di creare uno schema con indicazioni nutrizionali che siano più sostenibili e di somministrare tali indicazioni alla popolazione di riferimento per favorire l'aderenza alla dieta. Punto di partenza del lavoro è l'esperienza maturata dal laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica sullo schema del semaforo LGIMD senza restrizione calorica, modificandolo e migliorandolo; alla luce delle ultime evidenze e innovazioni in campo alimentare verranno favoriti gli alimenti stagionali e a km0, non raffinati, con indice infiammatorio più basso e rapporto densità nutrienti/costo migliore.

Obiettivo specifico 1: quantificare l'aderenza alla dieta mediterranea attraverso una matrice per l'aderenza alla dieta mediterranea di facile lettura che tenga conto oltre che delle frequenze di assunzione degli alimenti tipici mediterranei anche della stagionalità della biodiversità e del ciclo produttivo degli alimenti.

Obiettivo specifico 2: stimare la riduzione del grado infiammatorio delle due diete LGIMD e LGIMD2.0 (il 2 indica il miglioramento della LGIMD e lo 0 la predilezione per i prodotti del territorio)

Obiettivo specifico 3: stimare le variazioni degli altri parametri biochimici, metabolici e infiammatori

Dati preliminari:

Il primo trial condotto a Castellana Grotte (MediDiet) fu mirato a valutare l'effetto di quattro diete (controllo, Mediterranea, basso IG e Mediterranea a basso IG) sui parametri della SindMet. È stato riscontrato un miglioramento di tutte le componenti della SindMet nelle diete Mediterranea e a basso IG, mentre l'effetto della dieta Mediterranea a basso IG era pari alla somma dell'effetto delle due diete. I dati di questo trial sono stati poi utilizzati sia per la costruzione dell'intervento, sia per il calcolo della dimensione del campione per il trial successivo (NutriEpa) sui soggetti NAFLD appartenenti alla coorte NutriEp. I soggetti in questo trial furono randomizzati a due interventi (controllo e dieta Mediterranea a basso IG) e seguiti per sei mesi. È stato riscontrato una riduzione significativa dello score della NAFLD nel gruppo dieta Mediterranea a basso IG nel confronto della dieta controllo dopo 6 mesi così come su tutti i parametri metabolici. In seguito, fu condotto un secondo trial sui soggetti appartenenti alla coorte NutriEp che prevedeva due diversi programmi di attività fisica (aerobica e aerobica più resistenza muscolare). Il trial fu condotto con la collaborazione di quattro palestre di Putignano (Nadir, New Sporting House, IndaClub e Gym-Enjoy). Dopo sei mesi, ci fu una significativa riduzione dello score della NAFLD in entrambi i gruppi di intervento con un effetto più intenso per il gruppo aerobico nei primi tre mesi e per il gruppo misto nella seconda parte del trial.

Nell'ultimo trial condotto dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS de Bellis di Castellana Grotte: lo studio Nutriatt ci siamo posti l'obiettivo di stimare l'effetto di due programmi di attività fisica di diversa intensità, della dieta mediterranea a basso indice glicemico e della loro interazione sullo score della NAFLD e sulla composizione qualitativa della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi.

Innovazioni:

La LGIMD 2.0 è l'evoluzione della LGIMD in quanto tiene conto non solo delle chilocalorie provenienti da alimenti mediterranei ma anche della provenienza del cibo stesso e delle tecniche colturali e di distribuzione, guardando la nutrizione come pure un atto agricolo.

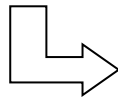
L'aderenza alla dieta mediterranea verrà in questo studio stimata non soltanto con un valore di score ma attraverso una matrice che vuole essere un modo innovativo e al tempo stesso molto semplice ed efficace, di rappresentare anche graficamente l'aderenza alla dieta mediterranea e ad uno stile di consumo che tenga conto anche della provenienza del cibo.

L'area geografica di svolgimento del progetto diventa il punto di forza dello stesso. Tradizionalmente la dieta mediterranea era il modo più comune di alimentarsi; nonostante ciò, le nuove generazioni stanno abbandonando lentamente questa dieta. Il coinvolgimento dei produttori del territorio attraverso le associazioni di coltivatori e allevatori locali potrà favorire la conoscenza di come il territorio possa offrire un'opportunità per nutrirsi più consapevolmente.

Stato di avanzamento del progetto:

Il Timeline / Prodotti finali nel progetto presentato per la ricerca corrente 2019 prevedeva:





**Analisi dei dati
3 mesi
11/2022 – 01/2023**

Il progetto dieta mediterranea 2.0 è nato dall'analisi di numerosi studi presenti in letteratura scientifica che hanno dimostrato il ruolo benefico della dieta Mediterranea nei confronti delle patologie cronico-degenerative. Come da programma, la prima annualità ha visto lo studio approfondito e l'ampliamento della bibliografia presente nel progetto lavorando agli obiettivi prefissati da Marzo 2019.

In relazione agli obiettivi preposti:

Obiettivo 1: Costruzione di una nuova matrice del grado di aderenza alla dieta mediterranea, che tenga conto anche della stagionalità, della biodiversità, del ridotto consumo di sostanze chimiche e del ciclo produttivo del prodotto che nasce e si conclude sul territorio.

Il primo step, attualmente in atto, riguarda la raccolta delle informazioni di nostro interesse sulle abitudini alimentari della popolazione del comune di Castellana Grotte, per una valutazione quali-quantitativa della dieta. Come base principale si è deciso di utilizzare il questionario EPIC, al quale sono state aggiunte le domande di interesse per la costruzione della nuova matrice; Le nuove domande, inserite dopo un attento studio, indagano la stagionalità e la provenienza dei prodotti, aspetti che mai nessuno studio ha preso in considerazione prima d'ora. Per facilitare e velocizzare la raccolta dei dati, nel tentativo di aumentare il numero di risposte, abbiamo informatizzato il questionario accessibile attraverso il link <https://forms.gle/CUkg9cQPURwdwtD36>, presente anche sul sito internet dell'ente. Un altro modo per accedervi è la scansione del **QR CODE** dedicato che abbiamo stampato sulle locandine affisse nelle sale d'attesa dell'ospedale.

Per la validazione del nuovo questionario sono necessarie 200 risposte provenienti da una popolazione random di età compresa tra i 30 e i 60 anni. La popolazione di studio è stata selezionata dalle liste elettorali del comune di Castellana Grotte con l'intercessione dell'ufficio anagrafe che ha fornito la lista degli indirizzi di residenza. A tali indirizzi stiamo provvedendo gradualmente ad inviare una lettera nella quale presentiamo gli obiettivi dello studio e esortiamo i soggetti selezionati a collaborare attraverso la compilazione del questionario.

Le risposte costituiranno il bagaglio d'informazione preziosissimo e utile alla progettazione della nuova dieta mediterranea più legata ai consumi e alle potenzialità del nostro territorio.

Allo stato attuale sono stati ricevuti 25 FFQ compilati via sito dell'IRCCS e sono stati predisposti in tutte le sale d'attesa dell'ospedale sia la pubblicità del progetto sia il QR code che può essere utilizzati dagli utenti in attesa di essere ricevuti da un operatore sanitario e mentre aspettano un parente.

Il controllo di qualità degli FFQ pervenuti evidenzia un'ottima percentuale di completezza e coerenza delle risposte. Sono state, inoltre, inviate le lettere di invito a tutti i 400 soggetti selezionati in modo random dall'elenco elettorale del Comune di Castellana Grotte e siamo in attesa delle risposte delle quali siamo molto fiduciosi.

CRITICITA' INCONTRATE: Tra le maggiori criticità c'è la lunghezza del questionario che presenta circa 150 domande per un tempo di risposta stimato intorno ai 20 minuti. Per minimizzare il rischio di non risposta, invieremo lettere a circa 400 persone. Attualmente ne sono state inviate 100 e le risposte pervenute sono in totale 34.

Obiettivi 2-3: Costruzione del nuovo modello dietetico e trial clinico.

Per la definizione del nuovo modello dietetico da utilizzare stiamo provvedendo alla ricerca bibliografica e allo studio di ogni gruppo alimentare presente nella piramide alimentare mediterranea.

Aggiornamento:

A causa delle criticità riscontrate e già descritte in questo documento e in seguito al numero insufficiente di risposte pervenute (Ad Ottobre 2019 soltanto 64), abbiamo deciso a Novembre 2019 di modificare e snellire il questionario. Dalle 150 domande iniziali siamo arrivati a 27 domande che indagavano la stagionalità e la provenienza dei prodotti. Abbiamo deciso quindi di eliminare le domande relative al questionario EPIQffq con l'obiettivo di sottoporre il nuovo questionario ad un campione di soggetti di della coorte NUTRIEP di cui avevamo già le risposte al questionario EPIQ. Questo ci ha permesso, dopo una nuova fase di reclutamento, di arrivare a 146 risposte fino a Marzo 2020.

Il 10 marzo 2020 il progetto è stato sospeso a causa dell'emergenza sanitaria legata alla diffusione del Covid 19.

Publicazioni:

- Association of the Glycaemic Index and Glycaemic Load With Colorectal Cancer in the Population of Córdoba (Argentina): Results of a Case-Control Study Using a Multilevel Modelling Approach. Eugenia Haluszka, Valentina Luciana Dávila, Laura Rosana Aballay, Maria del Pilar Diaz, Osella Alberto Ruben, Camila Niclis. BRITISH JOURNAL OF NUTRITION
- Effects of some food components on non-alcoholic fatty liver disease severity. Mirizzi Antonella, Franco Isabella, Leone Carla Maria, Bonfiglio Caterina, Cozzolongo Raffaele, Notarnicola Maria, Giannuzzi Vito, Tutino Valeria, De Nunzio Valentina, Bruno Irene, Buongiorno Claudia, Campanella Angelo, Valentina Deflorio, Pascale Annamaria, Procino Filippo, Sorino Paolo, Osella Alberto Ruben. Nutrients
- Mediterranean Diet Pyramid: A Proposal for Italian People. A Systematic Review of Prospective Studies to Derive Serving Sizes. Annunziata D'Alessandro, Lampignano Luisa, Giovanni De Pergola. Nutrients
- Association between adherence to the Mediterranean Diet and circulating Vitamin D levels Roberta Zupo, Luisa Lampignano, Antonio Lattanzio, Francesco Mariano, Alberto R. Osella, Caterina Bonfiglio, Gianluigi Giannelli & Giovanni De Pergola Int J of Food Sciences and Nutr
- "Traditional dietary patterns and risk of mortality in the longitudinal cohort of Salus in Apulia Study". R Zupo, R Sardone, R Donghia, F Castellana, L Lampignano, I Bortone, G Misciagna, G De Pergola, F Panza, A Passantino, N Veronese, V Guerra, H Boeing, G Giannelli. Nutrients
- The Effect of Three Mediterranean Diets on Remnant Cholesterol and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Secondary Analysis A Campanella, PA Iacovazzi, G Misciagna, C Bonfiglio, A Mirizzi, I Franco, A Bianco, P Sorino, MG Caruso, AM Cisternino, C Buongiorno, R Liuzzi and AR Osella. Nutrients
- Preliminary Trajectories in Dietary Behaviors during the COVID-19 Pandemic: A Public Health Call to Action to Face Obesity. R Zupo, F Castellana, R Sardone, AM Sila, VA Giagulli, V Triggiani, RI Cincione, G Giannelli, G De Pergola International Journal of Environmental Research and Public Health.
- Traditional Old Dietary Pattern of Castellana Grotte (Apulia) is Associated with Healthy Outcomes. F Castellana, R Zupo, I Bortone, G Giannelli, R Donghia, L Lampignano, C Griseta, G De Pergola, H Boeing, AM Cisternino, G Logroscino, R Sardone, V Guerra. Nutrients.

Progetto n. 17/2020: “Valutazione dell’indice glicemico ed insulinemico di varie tipologie di pasta con diversi formati e con diverse tipologie di farina, utili nella prevenzione e nella terapia della sindrome metabolica”

Responsabile: dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Risultati / stato di avanzamento per la XX annualità del progetto (max 1000 parole)

da poco è stato approvato dal comitato etico e siamo in attesa di convocare le aziende agroalimentari e trovare volontari sani da sottoporre allo studio

Progetto n. 18/2020: Trattamenti dietetici personalizzati ed attività fisica adattata per giovani adulti in sovrappeso: effetti sul profilo lipidomico, stato infiammatorio, sistema immunitario e permeabilità intestinale

Responsabile: dott. Alberto R Osella

Partecipanti: Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Ambulatorio di Nutrizione Clinica, Laboratorio di Biochimica Nutrizionale, Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione, Laboratorio di Medicina Personalizzata, Laboratorio di Immunopatologia e Laboratorio di Patologia Clinica.

Background:

L'inflammation è una componente centrale dell'immunità innata (aspecifica) e quindi un meccanismo essenziale nella preservazione dello stato di salute. Al contrario, uno stato di infiammazione cronica di basso grado è una caratteristica patologica comune a molte condizioni croniche come sindrome metabolica, epatosteatosi non alcolica (NAFLD), diabete tipo 2 e patologie cardiovascolari.

Numerosi studi hanno osservato un'associazione tra stato di infiammazione cronica di basso grado, obesità e sovrappeso, disbiosi intestinale ed alterata permeabilità intestinale.

Obiettivi dello studio:

Lo studio prevede l'arruolamento di una popolazione di giovani adulti (18-35 anni) sani, in sovrappeso ($25 \text{ Kg/m}^2 \leq \text{BMI} \leq 30 \text{ Kg/m}^2$), caratterizzati da squilibrio nel profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi.

Verranno create diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 1: Creare diete a composizione lipidica adattata, da utilizzare quali trattamenti dietetici personalizzati, potenzialmente capaci di modulare specifici modelli di squilibrio del profilo lipidomico.

Obiettivo specifico 2: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sul profilo lipidomico di soggetti con squilibrio della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi, rispetto ad una dieta di controllo. Stimare gli stessi effetti sul profilo lipidomico e proteico degli esosomi estratti dal plasma dei soggetti inclusi nello studio rispetto ai controlli, sottoposti o meno a dieta di controllo.

Obiettivo specifico 3: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla permeabilità intestinale e microbiota intestinale, rispetto alla dieta di controllo.

Obiettivo specifico 4: Stimare gli effetti dell'intervento dietetico sulla differenziazione dei linfociti T helper in Th1, Th2 o TH17 mediante caratterizzazione delle sottopopolazioni linfocitarie secondo analisi dei "cluster of differentiation" (CD).

Obiettivo specifico 5: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, sul Dispendio Energetico a Riposo (REE) sul metabolismo basale e sul Dietary Inflammatory Index (DII) prima e dopo l'intervento dietetico in tutti i soggetti arruolati.

Obiettivo specifico 6: Stimare gli effetti di trattamenti dietetici personalizzati (diete a composizione lipidica adattata) sulla composizione corporea, rispetto alla dieta di controllo.

Materiali e metodi

La popolazione di studio sarà composta da soggetti in sovrappeso con squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi, selezionata per i seguenti criteri di inclusione ed esclusione, randomizzata e distribuita in un gruppo di intervento ed un gruppo di controllo.

Criteri di inclusione:

- Età: 18-35 anni
- BMI compreso tra 25 e 29.9 Kg/m²
- Apparente stato di buona salute
- Squilibrio del profilo lipidomico della membrana dei globuli rossi

Criteri di esclusione:

Patologie infiammatorie croniche e/o autoimmuni

Patologie acute

Diabete in trattamento farmacologico

Dislipidemia in trattamento farmacologico (compresi nutraceutici a base di Monacolina K)

Patologie cardiovascolari in atto

Terapie interferenti con lo stato infiammatorio (cortisonici, FANS ecc.)

Valutazione della composizione lipidica della membrana dei globuli rossi e degli esosomi plasmatici

Composizione Lipidica della Membrana dei Globuli Rossi:

Valutazione semi-quantitativa delle proteine FZD-7 e FZD-9 degli esosomi plasmatici

Analisi della permeabilità intestinale
Analisi della condizione di eubiosi/disbiosi intestinale
Attività Fisica
Intervento dietetico
Analisi lipidomica
Analisi delle proteine esosomiali
Valutazione dello stato immunitario
Valutazione della permeabilità intestinale.
Valutazione Composizione Corporea e DII

Publicazioni:

- Higher Body Mass Index, Uric Acid Levels, and Lower Cholesterol Levels Are Associated With Greater Weight Loss. G De Pergola, R Zupo, L Lampignano, C Bonfiglio, G Giannelli, AR Osella and V Triggiani. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets
- Remnant Cholesterol as a risk factor for cardiovascular, Cancer or other causes mortality: a competing risks analysis. C Bonfiglio, CM Leone, L Vaz de Arruda Silveira, R Guerra, G Misciagna, MG Caruso, I Bruno, C Buongiorno, A Campanella, VMB Guerra, M Notarnicola, V Deflorio, I Franco, A Bianco, A Mirizzi, LR Aballay, AM Cisternino, P Sorino, PL Pesole, AR Osella. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases

Castellana Grotte, 26 marzo 2021

Il Direttore Scientifico
IRCCS "Saverio de Bellis"


Prof. Gianluigi Giannelli