



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

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



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

Direzione Scientifica



**RELAZIONE DELL'ATTIVITA' DI RICERCA
CORRENTE DELL'ANNO 2016**

Direzione Scientifica

LINEA 1

MALATTIE NEOPLASTICHE DEL FEGATO E DEL TUBO DIGERENTE

Per la linea di ricerca n. 1 - “*Malattie neoplastiche del fegato e del tubo digerente*”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2016 sono i seguenti:

Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare

L’attività del Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare è incentrata sullo studio della Carcinogenesi Epatica attraverso sperimentazioni *in vitro* su cellule umane di epatocarcinoma.

Al fine di attuare una terapia molecolare che possa sostituire chemioterapici ad alta tossicità, si studiano i meccanismi d’azione di molecole farmacologicamente attive come il Sorafenib, il Regorafenib e la Vitamina K sulla proliferazione, l’apoptosi, la migrazione e l’invasione di cellule tumorali epatiche. Si esplorano gli effetti di tali molecole, singolarmente ed in combinazione, sulla via di trasduzione del segnale biochimico che regola la crescita della cellula tumorale.

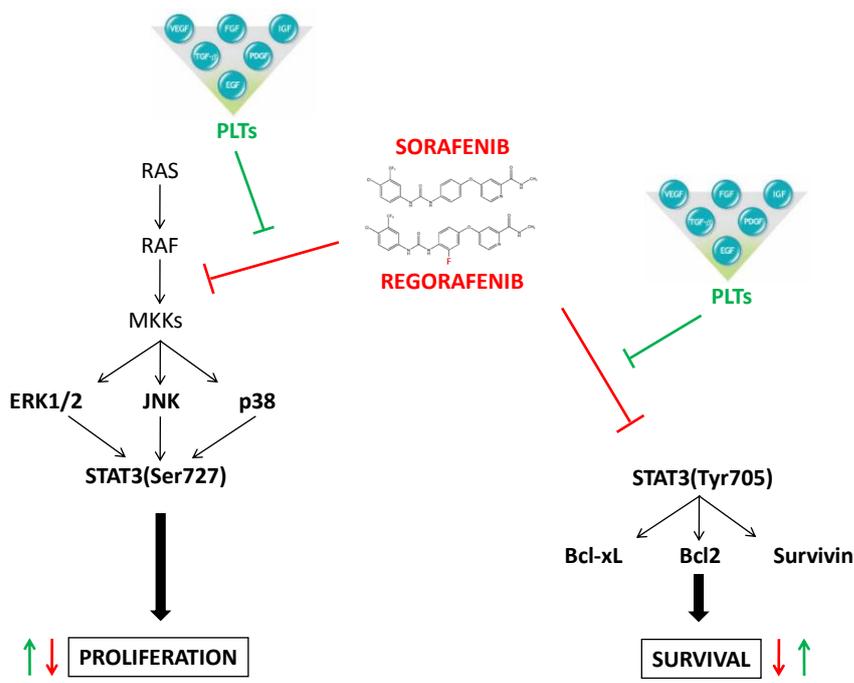
Inoltre, si studiano le interazioni tra microambiente e tumore, specificatamente il ruolo dei Fattori di Crescita e delle Citochine nel modulare l’azione dei farmaci antitumorali. A tale riguardo si sperimenta la capacità di inibitori specifici dei GFs e dei loro Recettori nel ridurre le interferenze del microambiente sull’azione inibitoria esercitata dai farmaci sulla proliferazione e diffusione del tumore.

Progetto: “Piastrine ed epatocarcinoma: studio, in vitro, degli effetti di componenti piastrinici sulla proliferazione, migrazione ed invasione in differenti linee cellulari di epatocarcinoma” (Termine del progetto: 31/12/2016).

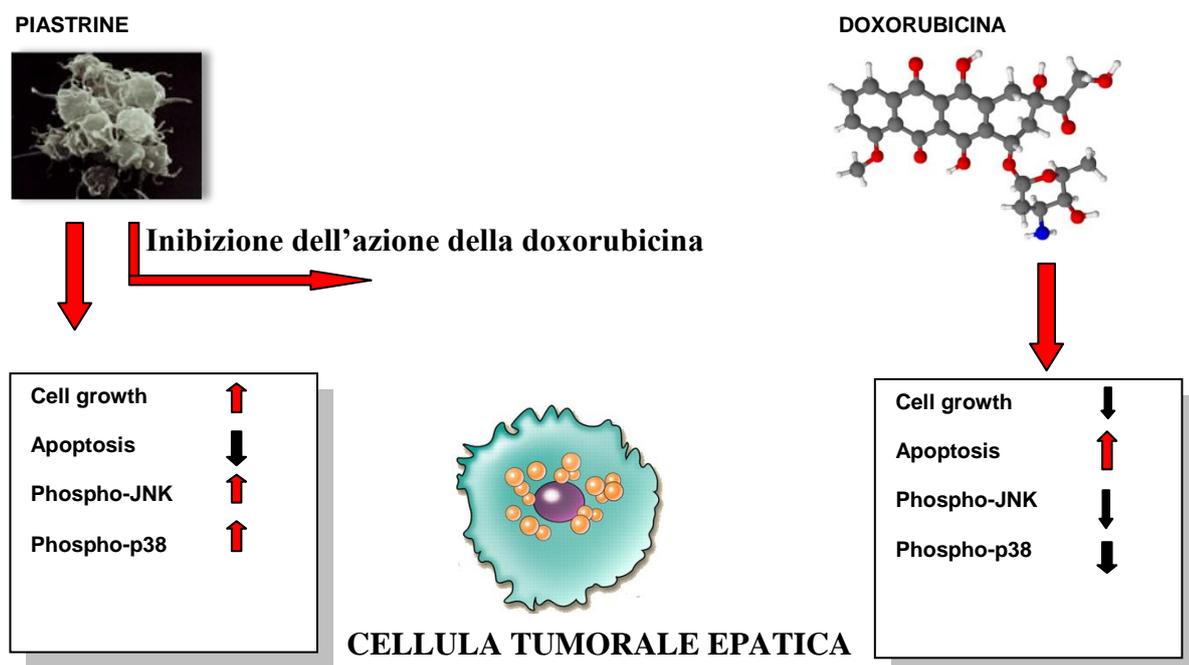
Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

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

Il progetto di ricerca sosteneva l’ipotesi che i componenti piastrinici, costituiti essenzialmente da Fattori di Crescita (GFs), erano in grado di stimolare la proliferazione, di inibire l’apoptosi e di favorire la migrazione e l’invasione di differenti linee di HCC umano, *in vitro*. Inoltre, si ipotizzava che tali componenti piastrinici potessero contrastare l’azione di molecole inibitorie della proliferazione cellulare, quali il Sorafenib ed il Regorafenib, impiegate nella terapia dell’HCC. I nostri risultati (*BMC Cancer 2014; 27,148(1):43*) hanno dimostrato che il contenuto piastrinico, non solo è in grado di stimolare la crescita e l’invasione di diverse linee cellulari di HCC umano, ma è anche capace di contrastare l’effetto inibitorio svolto dal Sorafenib e dal Regorafenib sulla crescita delle cellule di HCC, *in vitro* (*BMC Cancer 2014; 14:351*).



Inoltre, il contenuto piastrinico riesce a modulare l'azione di chemioterapici come la Doxorubicina (*Anti-Cancer Agent in Medicinal Chemistry 2014; 14(8): 1154-60*).



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

Responsabile: Dott. Aldo Cavallini

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

Sulla base di nostri dati, pubblicati nel 2015, in cui si evidenziavano gli effetti dei fattori di crescita (EGF, VEGF, PDGF, IGF) piastrinici su cellule di epatocarcinoma umano trattate con Regorafenib, si è passati a studiare i microRNA (miRNA) contenuti nelle piastrine di soggetti affetti da HCC. Poiché le piastrine durante il loro isolamento dal sangue intero subiscono un processo di attivazione

che consiste nella degranulazione e nel riversare nel medium di separazione parte del loro contenuto di miRNA, si è utilizzato come medium lo iodixanolo che possiede la proprietà di inibire l'attivazione piastrinica. Per poter valutare l'inibizione dell'attivazione piastrinica si è proceduto all'analisi mediante real-time PCR (qPCR) di 5 miRNA (RNU6, miR-146a, miR-16, miR-195, miR-30) che sono spesso utilizzati nel processo di normalizzazione dei livelli sierici dei miRNA. In base ai dati della letteratura e mediante database online (miRBase, miRTarbase) è stato possibile selezionare 49 miRNA. La selezione è stata effettuata considerando che questi ultimi sono quelli più rappresentativi nel determinare l'alterazione dei livelli dei miRNA in piastrine di soggetti con vari tipi di tumore. Nella fase iniziale dello studio si è analizzata la presenza dei 49 miRNA in campioni ematici di soggetti sani (gruppo controllo). Da 10 soggetti sani, dopo il prelievo ematico, si è proceduto all'isolamento delle piastrine. Le piastrine sono state lisate mediante kit commerciali e, dopo avere isolato l'RNA totale, si è proceduto mediante retrotrascrizione (RT) e amplificazione (qPCR) a determinare i loro livelli. La fase successiva doveva analizzare i miRNA piastrinici di pazienti con HCC. Questi campioni dovevano essere trasportati in laboratorio dopo una selezione dei pazienti condotta dal Direttore Scientifico. Tuttavia, a causa della sostituzione del Direttore Scientifico per fine mandato, i campioni suddetti non sono mai giunti in laboratorio. In attesa di poter superare questo inconveniente, si è proceduto nel 2016 a terminare la sperimentazione di due studi di collaborazione con l'Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Bari sempre seguendo la linea di ricerca n. 1 (Malattie neoplastiche). La collaborazione ha prodotto un lavoro scientifico dal titolo: *The effects of chronic lifelong activation of the AHR pathway by industrial chemical pollutants on female human reproduction. A. Cavallini et al. PLoS One (2016; 11: e 0152181)*. Lo studio aveva l'obiettivo di investigare le alterazioni metaboliche presenti in donne nate e vissute a Taranto, ed esposte per un lungo periodo ad inquinanti industriali (effetto cronico) che si erano sottoposte alla Procreazione medicalmente assistita (PMA). Come gruppo controllo sono state considerate donne residenti in zone rurali non inquinate anch'esse sottoposte a PMA. Lo studio, unico nel suo genere in quanto valutava gli effetti di un inquinamento cronico in un modello umano e non animale, ha mostrato non solo una ridotta fertilità nelle donne di Taranto, ma anche, nelle stesse, una situazione metabolica pre-cancerosa. Una seconda collaborazione aveva lo scopo di studiare il profilo dei miRNA in campioni paraffinati di tumore desmoide (sporadici e FAP-dipendenti) e in campioni di tessuto fibroso non-tumorale (gruppo controllo). I risultati dello studio, terminato alla fine del 2016, sono in corso di elaborazione per la pubblicazione.

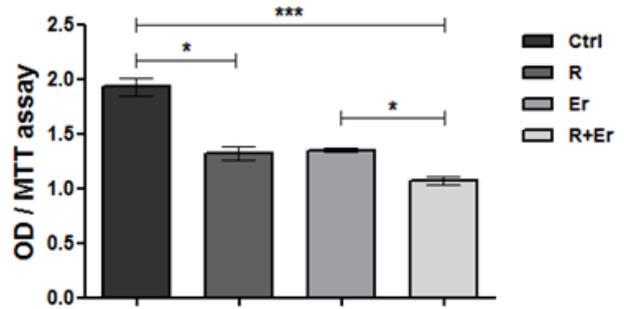
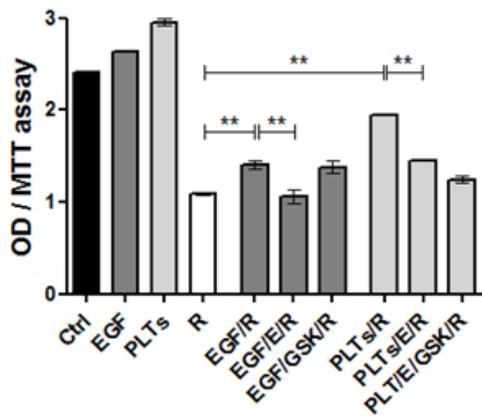
Progetto: *“Studio delle interazioni molecolari tra il Regorafenib ed i fattori di crescita piastrinici nel modulare la crescita e la diffusione di differenti linee di epatocarcinoma umano, in vitro” (Termine del progetto: 31/12/2017).*

Responsabile: *Dott.ssa Caterina Messa*

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

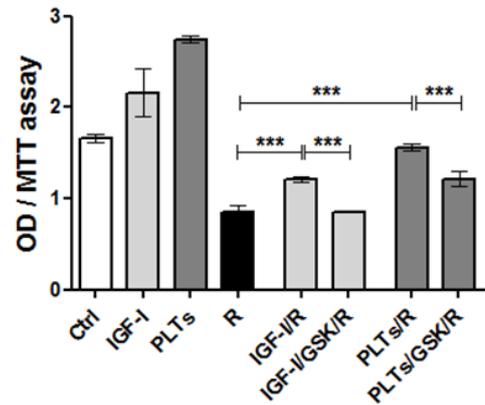
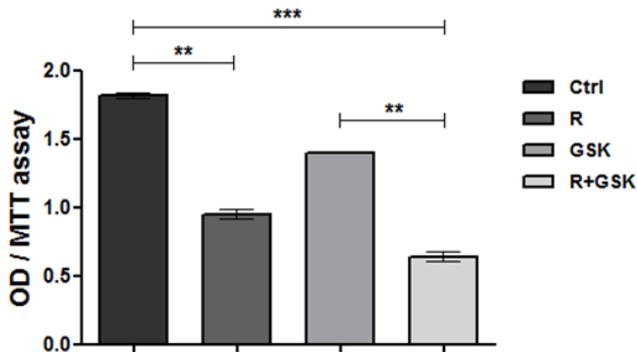
Il progetto di ricerca è stato ideato per meglio comprendere le interazioni tra GFs piastrinici e tumore epatocellulare. Le sperimentazioni da noi condotte dimostrano che l'EGF, quale componente del contenuto piastrinico, è in grado di modulare l'effetto del Regorafenib agendo come antagonista sulla capacità del farmaco di inibire la proliferazione e la diffusione del tumore in differenti linee cellulari di epatocarcinoma umano.

Questi risultati sono stati oggetto di pubblicazione scientifica (*Cancer Chemotherapy and Pharmacology 2015 Jun, 75 (6): 1237-459*).



Abbiamo, inoltre, dimostrato che l'Insulin Growth Factor-1, presente nelle piastrine, antagonizza l'effetto inibitorio esercitato dal Regorafenib sulla crescita ed invasività del tumore.

I risultati ottenuti sono stati oggetto di pubblicazione scientifica (*J of Experimental and Clinical Cancer Research* 2015, 34: 90).



Recentemente, dai nostri esperimenti è emerso che l'IGF-1 può contrastare non solo l'azione degli inibitori multichinasi quali Sorafenib e Regorafenib, ma anche quella di chemioterapici quali la Doxorubicina. Questi risultati sono stati pubblicati su *Biochem Anal Biochem* 2016, 5:1.

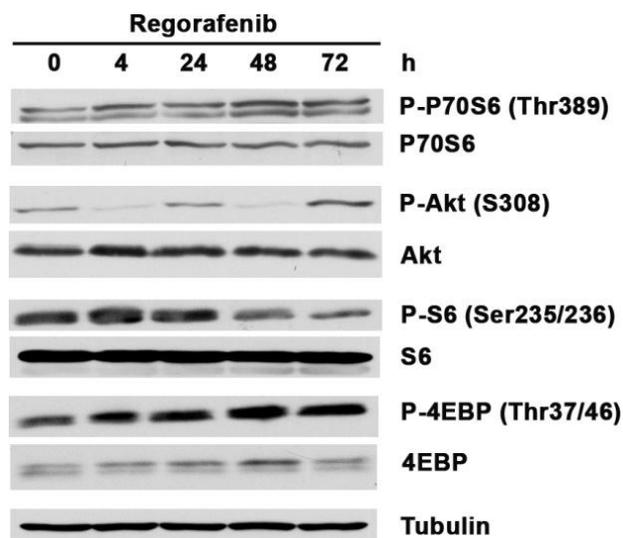
Progetto: "Effetti del Regorafenib in combinazione con inibitori di mTOR e β -catenina, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano" (Termine del progetto: 31/12/2017)

Responsabile: Dott.ssa Caterina Messa

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

Il progetto sostiene l'ipotesi che il Regorafenib, inibitore della via di trasduzione Ras/MAPK, abbia un effetto di stimolazione su altre vie del segnale, implicate nella crescita di cellule di epatocarcinoma umano, quali mTOR e β -catenina. Pertanto, una più efficace azione inibitoria sulla crescita tumorale si potrebbe ottenere dall'azione combinata del Regorafenib con inibitori specifici di mTOR e β -catenina. Infatti, studi sul Sorafenib dimostrano che sebbene tale farmaco sia in grado di inibire l'attivazione di MEK ed ERK nel contempo porti all'attivazione di Akt e di mTOR che possono, invece, essere bloccati dall'azione sinergica di inibitori di mTOR. Questi ultimi, se usati singolarmente, portano al contrario all'attivazione di MEK ed ERK, in seguito alla mancata azione

di feed-back negativo esercitato da S6K sulla cascata Ras/Raf/MAPK (*Expert Opin Pharmacother.* 2015 Oct 19:1-8).



Inoltre, data la stretta correlazione tra l'azione del complesso mTORC1, il pathway Wnt/ β -catenina, e del fattore di protezione tumorale REST, abbiamo preso in considerazione l'effetto combinato di Regorafenib e quercetina, uno dei piú importanti inibitori del pathway Wnt/ β -catenina. Un'alterazione di questa via risulta cruciale nel processo di carcinogenesi, in quanto porta ad un accumulo di β -catenina nel citoplasma e alla successiva traslocazione nel nucleo, dove interagisce con le proteine TCF/LEF, attivando la trascrizione di geni coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare (c-myc, ciclina D1). L'azione inibitoria esercitata dalla quercetina su tali processi è stata precedentemente studiata in cellule di carcinoma del colon in collaborazione con il gruppo di Biochimica Nutrizionale del nostro Istituto. I dati ottenuti sono stati oggetto della seguente pubblicazione scientifica (*J Cell Physiol.* 2015 Apr 20).

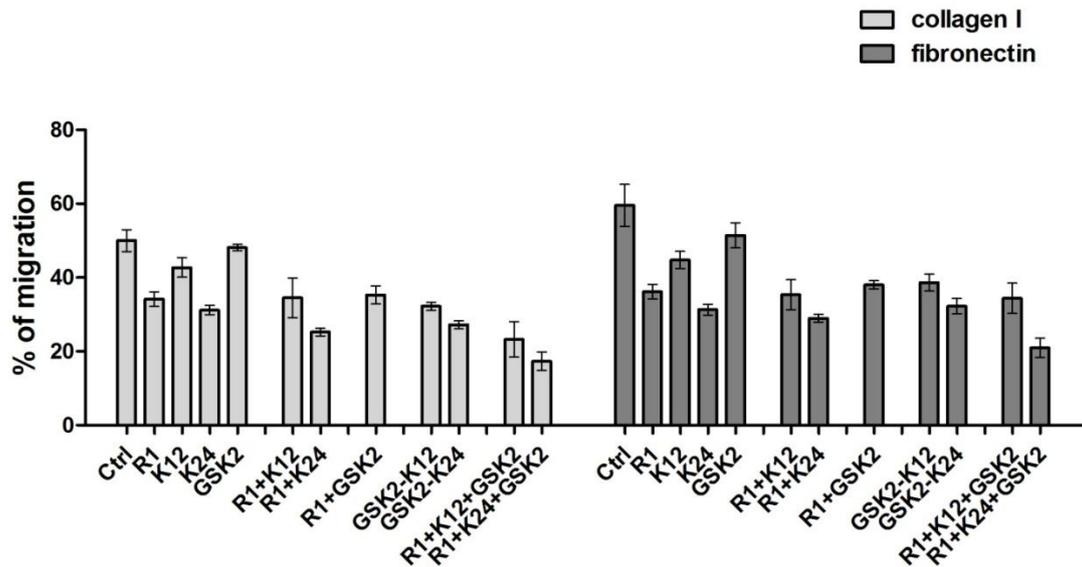
Progetto: "Effetti del Regorafenib in combinazione con Vitamina K1 e con inibitori della via IGF/IGF-R, su proliferazione, apoptosi, migrazione ed invasione in linee cellulari di epatocarcinoma umano" (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile: Caterina Messa, Dirigente Biologo

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

Il progetto sostiene l'ipotesi che l'impiego di trattamenti combinati, in cui al Regorafenib e alla Vitamina K1, entrambi inibitori della via di trasduzione Ras/MAPK, vengono associati specifici inibitori della via del segnale IGF1/IGF1-R, abbia il doppio vantaggio di potersi avvalere di dosaggi piú bassi di farmaci, nonché di ovviare a possibili fenomeni di resistenza. In questo modo sarebbe possibile ottenere una piú efficace azione inibitoria sulla crescita e motilità di cellule di epatocarcinoma umano. Sperimentazioni da noi già effettuate hanno evidenziato che quando il Sorafenib viene combinato alla Vitamina K1, la concentrazione del farmaco richiesta per l'inibizione della crescita delle cellule tumorali risulta sostanzialmente ridotta. Inoltre, la crescita delle cellule di HCC e gli effetti degli agenti terapeutici possono essere modulati da componenti del microambiente tumorale come ad esempio le piastrine secernenti diversi Fattori di Crescita ad azione mitogena. Uno dei GFs strettamente correlato alla crescita dell' HCC è l'IGF-1 il quale, attraverso il suo specifico Recettore, attiva il pathway biochimico coinvolto nella crescita cellulare e

nella motilità. Per cui abbiamo condotto uno studio in cui si è valutato l'effetto di un inibitore specifico dell'IGF1-R, il GSK1838705A, sulla migrazione già inibita dal Sorafenib e dalla vitamina K1. I nostri risultati dimostrano che l'impiego dell'inibitore dell'IGF1-R diminuisce significativamente la migrazione di cellule di HCC, *in vitro*, oltre che causare riduzione e depolarizzazione dell'actina nelle linee cellulari utilizzate. I dati ottenuti sono stati oggetto di un lavoro scientifico in corso di revisione (*Strong enhancement by an IGF1-R antagonist of migration inhibition due to Sorafenib, vitamin K1 or both in hepatocellular carcinoma cell line*).



Stabulario

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

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

Lo stabulario è dotato di:

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

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

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

Gli studi nei quali il personale dello stabulario viene coinvolto, sono studi nutrizionali, in linea con le specificità dell'Ente. Tali studi permettono di valutare gli effetti di specifici nutrienti della dieta sull'attività proliferativa del tratto gastrointestinale di topi wild type o transgenici. Inoltre, nell'ambito del progetto "breeding" si sta procedendo alla stabilizzazione di una linea murina nuova, considerata un modello unico per lo studio della colite ulcerosa (modello Winnie), in quanto, a causa della mutazione del gene *Muc2*, nell'animale si sviluppa spontaneamente una patologia infiammatoria, estremamente simile a quella umana. Per controllare il background genetico delle colonie in breeding viene effettuata periodicamente lo studio del genotipo mediante analisi del DNA estratto dalle code. Al fine di migliorare la performance del breeding si utilizzano strategie opportune per ogni ceppo allevato.

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

Nell'ambito dell'attività di ricerca, nello stabulario sono state effettuate le seguenti procedure sperimentali:

- Iniezioni intraperitoneali, intramuscolo, footpad, endovena, gavage.
- Prelievo sangue periferico intra-vitam (coda, femorale, giugulare, retrorbitale) e perimortem (intracardiaco)
- Misure e calcolo diametri tumorali
- Esame autoptico
- Campionamento dei diversi organi e/o tessuti
- Inoculo sottocutaneo di cellule tumorali

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

Responsabile: Dott.ssa Maria Notarnicola

Partecipanti: dott.ssa Angela Tafaro (biologa contrattista), dott.ssa Giusy Bianco (medico veterinario contrattista), sig. Vito Spilotro (tecnico stabularista)

Il goal di questo progetto è attivare presso lo Stabulario dell'Istituto una sezione dedicata alla riproduzione (breeding) di colonie di topo wild-type e transgenici, per soddisfare in tempi brevi e con abbattimento dei costi le necessità di *un modello animale* in loco, da utilizzare nella ricerca biomedica, per lo studio di patologie complesse a eziologia multipla, quali l'epatocarcinoma (HCC), l'infiammazione cronica intestinale (IBD), il cancro del colon retto (CRC).

La tecnica di allevamento ha previsto diverse fasi:

- Accoppiamento (2- 3 mesi),
- tempo di gestazione (19-21 gg),
- svezzamento (30 gg),
- genotipizzazione dal DNA della coda (2 settimane),
- raggiungimento del numero opportuno di animali ai fini sperimentali (5,6 mesi).

Nella tabella seguente è indicato il numero totale di animali nati nel corso dell'anno 2016 e quelli con genotipo idoneo alla sperimentazione:

	Ceppi Murini	Nome	Animali prodotti	Animali inseriti nella sperimentazione
1	LINEA 1	C57/BL6	27	27
2	LINEA 2	3243	68	16
3	LINEA 3	5540	112	36
4	LINEA 4	Winnie	101	17

Laboratorio di Biochimica Nutrizionale

Il Laboratorio di Biochimica Nutrizionale, in linea con le specificità dell'Istituto, ha identificato nello studio delle vie metaboliche e dei profili enzimatici del metabolismo lipidico e glucidico la sua principale area di ricerca. In particolare, ha focalizzato la sua attenzione sugli effetti di alimenti tipici della Dieta Mediterranea in soggetti con sindrome metabolica, obesità e steatosi epatica e con neoplasie del tratto gastrointestinale, conducendo studi sperimentali *in vitro* e studi clinici. Il personale del Laboratorio di Biochimica Nutrizionale ha partecipato attivamente allo svolgimento di Progetti di Ricerca finalizzati allo studio degli effetti dell'olio extravergine d'oliva, degli acidi grassi polinsaturi (omega-3 e omega-6) e di fitoestrogeni (Quercetina) sulla proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo*.

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

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

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

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

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

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

Responsabile: Dott.ssa Maria Notarnicola

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

Il progetto prevede una parte di studi *in vitro* e una di studi *in vivo* su un modello animale. Lo studio *in vitro* ha previsto l'utilizzo di linee cellulari di adenocarcinoma umano del colon a diverso grado di differenziazione, per valutare gli effetti della Quercetina sulla proliferazione cellulare e sull'espressione di recettori di membrana con un ruolo inibitorio sulla crescita cellulare. Lo studio sulle cellule ha dimostrato che la quercetina è in grado di regolare l'espressione del gene che codifica per il recettore degli endocannabinoidi (CB1-R).

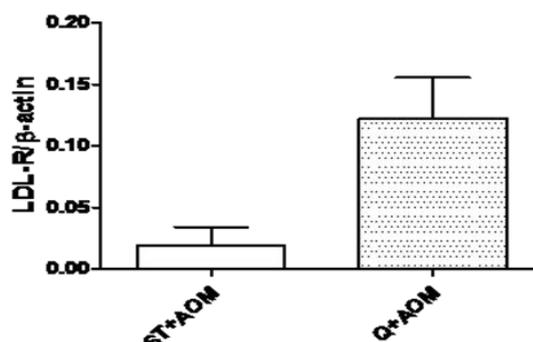
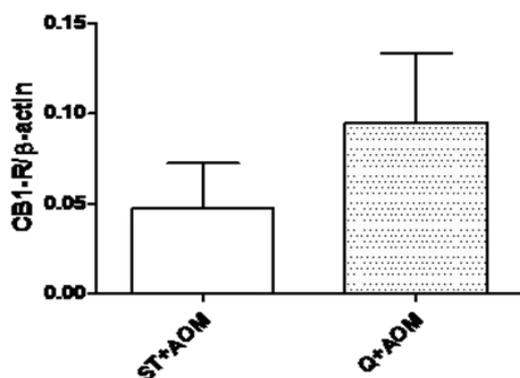
Per quanto riguarda lo studio sugli animali, nel corso del 2016 è stata ottenuta l'autorizzazione ministeriale alla somministrazione di Quercetina nella dieta di topi WT, nei quali veniva indotta la carcinogenesi intestinale attraverso l'uso di Azossimetano (AOM).

Ottenuta l'autorizzazione, abbiamo acquistato i topi e iniziato il trattamento come previsto dal progetto. Gli animali maschi e femmine sono stati randomizzati nei seguenti gruppi sperimentali:

Gruppi	Dieta
1. Controllo 8w	Dieta standard per 8 settimane
2. Q8	Dieta Standard con lo 0.5% di Quercetina per 8 settimane
3. Controllo 35w	Dieta Standard per 35 settimane
4. Q35	Dieta Standard con lo 0.5% di Quercetina per 35 settimane

Ogni gruppo sperimentale comprende animali trattati con una iniezione intraperitoneale settimanale di AOM (10 mg/Kg) e animali trattati con veicolo (PBS) per 6 settimane e poi mantenuti fino al sacrificio secondo il disegno dello studio. Ciascun gruppo prevede lo stesso numero di topi maschi e femmine per poter valutare eventuali differenze nella risposta al trattamento associate al sesso.

Ad oggi sono stati effettuati i dosaggi di espressione del recettore CB1 e del recettore delle LDL nei campioni intestinali degli animali trattati per 8 settimane. I risultati ottenuti confermano la capacità della quercetina di indurre l'espressione della proteina sia del CB1 che del LDL. Gli effetti sulla carcinogenesi potranno essere osservati solo dopo 35 settimane di trattamento.



UOC di Patologia Clinica

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

Il personale dell'UOC consta di 4 medici, 2 biologi, 9 TLB e 3 Infermiere di ruolo, oltre a 4 borsisti e 2 contrattisti e si articola nei settori di Biochimica Clinica, Immunometria e Marcatori Tumorali, Ematologia e Coagulazione, Immunologia e Protidologia e SS di Microbiologia e Virologia. Inoltre, dal 2006 è aggregata l'U.O. Laboratorio di Genetica Medica e Farmacogenetica, che consta di 2 dirigenti biologi e di 2 TLB (Del. N.156 del 12/5/06).

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

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

Responsabile: Dr. M. Correale (Pat Cli);

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

Il progetto si svolge in collaborazione con l'UO di Oncologia ed è in fase di avvio. Si sta procedendo ad attivare le procedure utili all'acquisizione dei reagenti, necessari per la preparazione dei campioni, e all'individuazione dei soggetti da includere nello studio.

Questa fase preliminare, che porterà all'estrazione del DNA da campioni di sangue di pazienti neoplastici, richiede un accurato processo di messa a punto al fine di garantire la riproducibilità dei risultati delle successive indagini molecolari.

UOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva

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

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

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

Epidemiologicamente, l'incidenza di cancro gastrico in Asia, Europa e Nord America è più alta che nel resto del mondo. La sua incidenza è in incremento e rappresenta il quinto tumore per incidenza (1 milione circa nel 2012) e il terzo per mortalità. Risulta più frequente negli uomini. L'incidenza dei cancri non cardiaci si è ridotta con l'eradicazione dell'infezione da *Helicobacter pylori*, il miglioramento dell'igiene e della sanità pubblica, l'aumentata disponibilità di frutta e verdura

fresche e l'uso meno frequente dei processi di conservazione del cibo sotto sale e con affumicatura. Tuttavia, il cancro gastrico non cardiaco resta comune in Cina, Giappone, Europa dell'Est e America Centro-Meridionale; mentre il cancro gastrico cardiaco è aumentato nei paesi Occidentali.

Il cancro colo-rettale è il terzo cancro più comune al mondo dopo quello del polmone e della mammella e produce una mortalità inferiore rispetto al cancro gastrico e al cancro bilio-pancreatico. Il cancro esofageo è l'ottavo cancro più comune al mondo. La sua incidenza aumenta con l'avanzare dell'età ed è simile tra i due sessi. Il carcinoma a cellule squamose dell'esofago (SCC) costituisce la maggior parte dei casi seguito dall'adenocarcinoma (AC). Sebbene l'incidenza del carcinoma a cellule squamose si sia ridotta nei paesi più sviluppati, dove l'incidenza annuale è generalmente meno di 10 nuovi casi su 100.000 abitanti per anno, l'incidenza è rimasta piuttosto alta in alcuni paesi meno sviluppati, dove il tasso di incidenza può superare i 100 nuovi casi su 100.000 abitanti per anno, in particolare in aree ad alto rischio della Cina, dell'Iran e del Sud Africa.

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

La diagnosi dei precursori neoplastici e delle lesioni early e il trattamento degli stessi per via endoscopica è l'obiettivo dei sistemi sanitari evoluti.

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

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

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

L'attività scientifica di ricerca, dal 2011 al 2015, è stata incentrata sulla valutazione epidemiologica della displasia nell'esperienza del nostro centro, con la casistica relativa la displasia nell'esofago di Barrett e nelle gastriti croniche atrofiche.

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

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

Responsabile: Dott.ssa Alba Panarese

Partecipanti: Dott. Pietro Giorgio, Dott. Renato Cuppone, Dott. Mauro Mastronardi, Dott.ssa Caruso Maria Lucia, Dott. Raffaele Armentano, Dott. Alberto R. Osella

I dati della letteratura documentano che le malattie infiammatorie croniche intestinali (retto colite ulcerosa e morbo di Crohn) determinano, nel tempo, rispetto alla popolazione generale, un incremento del rischio di sviluppare displasia e cancro del colon-retto, per la flogosi cronica che esse comportano, con le differenze che le due malattie presentano. La progressione da mucosa normale a displasia e, poi, a cancro è più rapida che nella sequenza adenoma-carcinoma della popolazione non affetta da colite infiammatoria cronica idiopatica e, per i pazienti che effettuano regolari controlli, più spesso associata a forme early di neoplasia colo-rettale.

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

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

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

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

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

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

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

Una rassegna sistematica ha concluso a favore di un effetto chemio preventivo della mesalazina. In ogni caso, è stata riportata un'associazione protettiva tra uso di mesalazina e cancro associato a

colite (colitis associated carcinoma CAC) con un odd ratio di 0.51 per CAC/displasia. Questi dati, in studi successivi, anche recenti, sono rimasti controversi.

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

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

Nella fase retrospettiva dello studio sono stati ricercati i casi di soggetti con colite infiammatoria cronica idiopatica valutati dal nostro centro con endoscopia e istologia per l'esclusione della displasia.

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

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

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

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

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

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

La colonscopia di sorveglianza viene effettuata con strumentazione Olympus CF190 H in white light e in magnified chromoendoscopy.

La colonscopia di sorveglianza, previa adeguata toilette intestinale (se necessario irrigando la mucosa con soluzione di lavaggio e simeticone durante l'esame), viene effettuata in cromoendoscopia con colorante di contrasto indaco carminio diluito in soluzione fisiologica alla concentrazione di 40mg (ossia due ampolle di indaco carminio 0.8% 5 ml) in 250 ml di acqua (soluzione allo 0.03%). La soluzione così ottenuta, con pompa di lavaggio, viene distribuito sulla superficie intestinale per migliorare la detection rate delle lesioni di mucosa. Individuata una lesione, viene effettuata la cromoendoscopia target iniettando, con catetere spray, la soluzione di indaco carminio diluito allo 0.13% (un'ampolla di indaco carminio 0.8% 5ml in 25 ml di acqua). Quindi, se indicato, si rimuove la lesione.

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

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

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

Il protocollo è stato registrato in ClinicalTrials.gov PRS.

Laboratorio di Immunoistochimica e Biologia Molecolare

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

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

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

Responsabile: Dott.ssa Annamaria Valentini

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

Nel 2009 l'AIFA ha reso obbligatoria analisi mutazionale dei codoni 12/13 del gene *KRAS* per la eleggibilità al trattamento con anticorpi monoclonali anti-EGFR per i pazienti con carcinoma coloretale metastatico. Poiché il *KRAS* risultava essere un imperfetto predittore di risposta alla

terapia, in seguito ai risultati degli studi di fase III PRIME e FIRE 3, l'AIFA ha divulgato ad agosto 2013 una nota informativa che rendeva obbligatoria, oltre alla determinazione dello stato WT dell'esone 2 del gene *KRAS*, anche la determinazione dell'esone 3 e 4 di *KRAS* e degli esoni 2,3,4 di *NRAS* per la eleggibilità al trattamento.

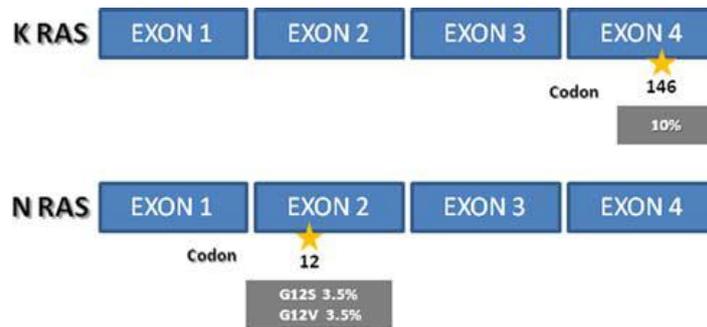
Dal 2009 al 2013 la determinazione dello stato mutazionale dei geni RAS è stata effettuata su circa 1500 pazienti. Grazie alla esperienza maturata in questo campo, nel 2016 è stato effettuato uno studio i cui risultati sono stati oggetto di una pubblicazione dal titolo "*RAS-expanded mutations and HER2 expression in metastatic colorectal cancer: A New Step of Precision Medicine*", pubblicato sulla rivista scientifica *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*.

Lo studio ha arruolato un gruppo di 29 pazienti con carcinoma coloretale metastatico, wild type nei codoni 12 e 13 di *KRAS*, trattati con il Cetuximab presso la Oncologia medica del nostro Istituto dal 2009 al 2013. Quindici di questi pazienti (52%) erano risultati non responders alla terapia, secondo i criteri RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors). Allo scopo quindi di verificare se l'alta percentuale di pazienti non responders potesse essere dovuta alla presenza di ulteriori mutazioni nei geni RAS, è stato effettuato (secondo le indicazioni AIFA 2013) la determinazione dello stato mutazionale dei geni RAS (*KRAS* e *NRAS*), non solo nei codoni 12 e 13, ma anche nei codoni 59, 61, 117, 146. Inoltre è stata effettuata su tutti i campioni la determinazione della over espressione immunoistochimica e l'amplificazione in situ del gene *HER2*.

Dapprima i campioni in studio sono stati ritestati per quanto riguarda l'analisi mutazionale relativa ai codoni 12 e 13 di *KRAS* utilizzando una metodica più sensibile (pirosequenziamento) rispetto a quella utilizzata in prima istanza (RFLP-Restriction fragment length polymorphism). Tutti i campioni ritestati si sono confermati essere wild type nei codoni 12 e 13 del gene *KRAS*. L'analisi mutazione estesa ai codoni 59, 61, 117, 146 (*KRAS* e *NRAS*) ha permesso di evidenziare 5 (17%) (TAB. 1) nuove mutazioni nel codone 12 del gene *NRAS* e nel codone 146 del gene *KRAS*. Queste nuove mutazioni erano tutte presenti nei carcinomi colorettali dei pazienti non responders. I restanti campioni sono risultati all *RAS* wild type. L'over espressione ed amplificazione di *HER2* era presente in un solo campione appartenente ad un paziente responder (Fig. 1 e 1 bis).

Tutti i pazienti con carcinoma coloretale "all *RAS* wild-type" hanno mostrato un valore mediano di PFS maggiore rispetto ai pazienti con carcinoma coloretale mutato (12 vs. 8 mesi, $P=0.05$ by log-ranktest) (Fig 2). Sebbene non statisticamente significativa, a causa dell'esiguo numero dei pazienti, la mediana di OS era maggiore nei pazienti con carcinoma all *RAS* WT rispetto a quelli con *RAS* mutato. (31 vs. 17 mo, $P=0.58$) (Fig. 3).

I risultati del nostro studio, pur in linea con i dati della letteratura per quanto riguarda la percentuale delle mutazioni riscontrate nei codoni 59, 61, 117, 146 di *KRAS* e *NRAS* e la bassa percentuale di over espressione di *HER2* nel carcinoma coloretale, sottolineano ancora una volta l'alta percentuale di pazienti che pur essendo all *RAS* wild type risultano non responders alla terapia con il Cetuximab, evidenziando la necessità di ulteriori biomarcatori per una più stringente selezione dei pazienti eleggibili alla terapia con gli anticorpi anti-EGFR.



Gene	Codon	Analyte	mutation detected
KRAS	146	A146V	437 C>T GCA>GTA
NRAS	12	G12S	34 G>A GGT>AGT
	12	G12V	35 G>T GGT>GTT

Tabella 1

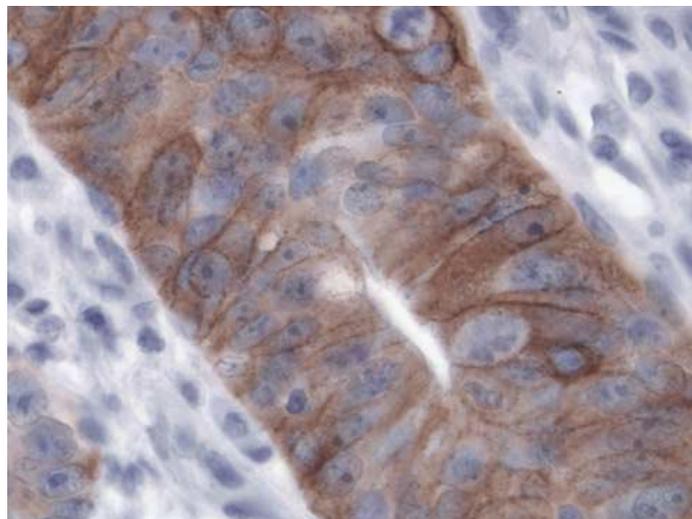


Figura 1

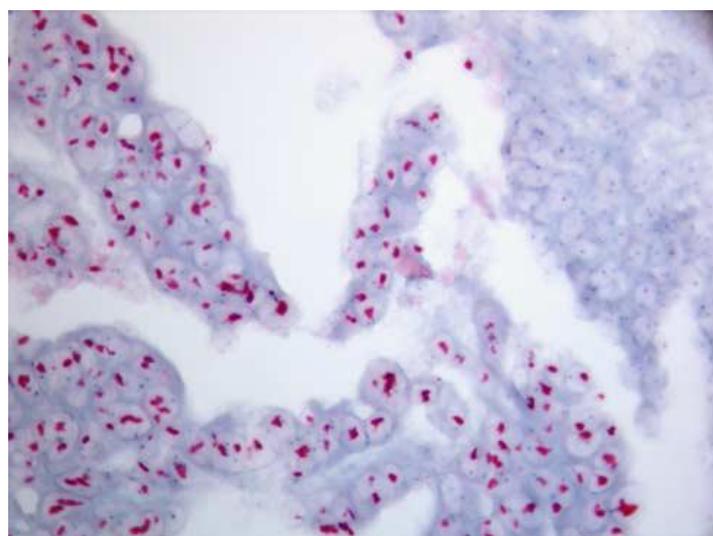


Figura 1 bis

Fig. 2

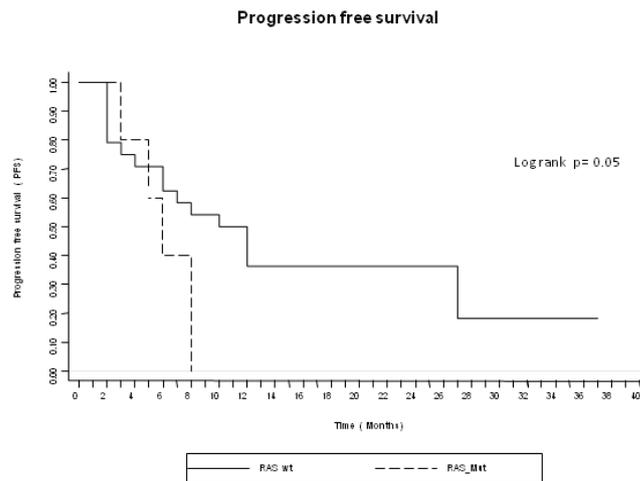
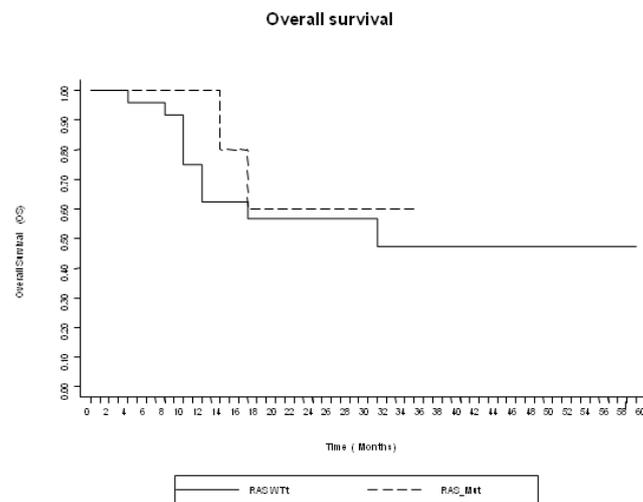


Fig. 3



Sempre nell'ambito delle terapie mirate, il laboratorio si sta ulteriormente occupando dello studio dell'espressione immunohistochimica di PD-L1 nel carcinoma coloretale. In relazione al Progetto di ricerca corrente: “PD-L1: target della immunoterapia oncologica con gli inibitori dei checkpoint immunitari. Studio preliminare nel carcinoma coloretale” si è proceduto alla selezione dei casi da reclutare ed all'allestimento del database relativo ai parametri in studio. Per ciascuno dei 60 casi di

carcinoma colo rettale è stato scelto un blocchetto relativo al tumore (presenza di mucosa normale e neoplastica) ed uno relativo ad un linfonodo locoregionale. Per ogni blocchetto sono state tagliate sezioni di 4 micron di spessore per la metodica immunohistochimica e sezioni di 10 micron per l'estrazione del DNA ai fini sia della valutazione dello stato mutazionale di KRAS e BRAF sia della instabilità dei microsatelliti.

U.O. Diagnostica per Immagini

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

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

Progetto: "Studio di correlazione tra imaging e biomarcatori nel trattamento di HCC stadio intermedio mediante debbase" (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile del progetto: dott. Fabio Fucilli

Partecipanti: Dr. M. Correale (Patologia Clinica)

È in corso la raccolta sistematica dei campioni ematici pre e post-trattamento di chemio-embolizzazione selettiva, già iniziato con dati preliminari a partire dal gennaio 2015, e che attualmente comprende un campione di 40 pazienti circa con l'obiettivo di raggiungere la quota di 60 pazienti come da disegno dello studio.

I campioni sierologici iniziali sono stati esaminati in collaborazione ad un altro IRCCS (Istituto Oncologico "Giovanni Paolo II" di BARI). Recentemente si è provveduto a generare un doppio campione da esaminare con medesime metodiche presso il nostro IRCCS e presso l'Istituto Tumori di Bari.

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

Dal lavoro pubblicato risulta che il residuo di malattia neoplastica, valutato secondo i criteri RECIST, con controllo imaging di II livello, effettuato in media 45 giorni dopo il trattamento ha evidenziato 4 risposte complete (CR) (Media AFP: 8,8 ng/mL; PIVKA II: 34,5 mAU/mL), 6 risposte parziali (PR) (Media AFP:6,4ng/mL; PIVKA II:240mAU/mL), 1 progressione (PD) (AFP: 22 ng/ml;PIVKA II: 660 mAU/ml).

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

*V.M. Garrisi¹, I. Abbate¹, A. Daniele¹, A.M. Mastrostrinie, PA Iacovazzi¹, C.M. Leone¹, R. Licinlo¹, M. Correale¹, F. Fucilli³ *1U.O.D. Patologia Clinica e Sperimentale -IRCCS Istituto Tumori "Giovanni Paolo II", Bari 2U.O.C. Patologia Clinica e Laboratori - IRCCS "S. De Bellis" - Castellana Grotte 3U.O.C. Diagnostica per immagini e Radiologia interventistica -IRCCS "S. De Bellis" - Castellana Grotte*

I dati sierologici al termine dello studio saranno correlati, come da disegni dello studio, con i dati di risposta alla terapia mediante la valutazione dell'imaging preliminare e di controllo secondo i criteri RECIST entro dicembre 2017.

LINEA 2

MALATTIE EPATICHE, DELLE VIE BILIARI E PANCREATICHE NON NEOPLASTICHE

Per la linea di ricerca n. 2 “Malattie epatiche, delle vie biliari e pancreatiche non neoplastiche”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l’anno 2016 sono i seguenti:

Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione

Il ***Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione*** è costituito da n. 2 Dirigenti Medici n. 2 Dirigenti Biologi n. 1 Tecnico di laboratorio biomedico (TLB) n. 1 biologo contrattista; n. 1 TLB borsista.

Accanto ad una attività diagnostica e terapeutica, il Laboratorio ha focalizzato la propria attività di ricerca su patologie gastrointestinali quali la dispepsia nelle sue differenti varianti funzionali e organiche, la valutazione di cibi funzionali e delle loro ripercussioni su particolari funzioni gastrointestinali, quali la permeabilità intestinale, nonché l’atteggiamento proliferativo della mucosa gastroenterica.

Le linee di ricerca che sono state sviluppate negli ultimi anni hanno dimostrato come trattamenti dietetici con prebiotico migliorino la funzione di barriera dell’epitelio intestinale (*Russo F et al. Eur J Nutr. 2011;50(4):271-7*) e che particolari peptidi GI, quali il GLP-2, intervengono fattivamente insieme alla zonulina nella regolazione della permeabilità intestinale (PI) (*Russo F et al. Nutr Res. 2012; 32(12):940-6*). Anche trattamenti farmacologici con chemioterapici quale il protocollo FEC60 (fluorouracile, epirubicina, e ciclofosfamida) in pz. con cr. mammario determinano un significativo incremento di PI negativamente correlato coi livelli sierici di diversi peptidi GI, quali il GLP-2 e l’EGF, (*Russo F et al. BMC Cancer. 2013;13:56*).

Più recentemente è stata sviluppata una produzione scientifica relativamente agli aspetti fisiopatologici della celiachia con particolare riguardo ai profili dei principali peptidi GI e in confronto con pazienti con disturbi funzionali quali il colon irritabile caratterizzati da lowinflammation. In tale contesto, il ruolo delle adipochine come la resistina, leptina e adiponectina potrebbe essere fondamentale nel crosstalk molecolare tra l’intestino infiammato e il circostante tessuto adiposo mesenterico. I nostri dati suggeriscono che queste adipochine siano coinvolte nella modulazione dei processi infiammatori sia nei pazienti IBS-D che in quelli celiaci. Alterazioni nel profilo adipochinico nonché la maggiore prevalenza dell’allele della resistina +299 G/A SNP rispetto ai controlli supportano inoltre l’ipotesi che, almeno in casi ben caratterizzati di IBS, si possa supporre l’intervento attivo di una componente genetica (*Russo F et al. Scand J Gastroenterol. 2013 Dec;48(12):1377-85*). Sempre nell’ambito dello studio delle problematiche fisiopatologiche connesse con la malattia celiaca sono stati valutati gli effetti della dieta priva di glutine (GFD) sulla qualità della vita (QoL) del paziente celiaco e sono state analizzate le concentrazioni sieriche di grelina, leptina, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) nonché del suo polimorfismo Val66Met e dei livelli di acido docosoesanoico, (DHA), considerato come un modulatore neurotrofinico nella membrana eritrocitaria, al momento dell’arruolamento e dopo 1 anno di dieta priva di glutine (GFD). I risultati indicavano un netto declino della QoL dopo la GFD. I livelli di BDNF erano significativamente più bassi dopo la GFD rispetto ai controlli ed ai pazienti al momento della diagnosi. I livelli di BDNF correlavano positivamente sia con quelli di DHA che con il punteggio totale del questionario sulla QoL. (*Russo F et al. Eur J Nutr. 2015*).

Il Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione è impegnato inoltre da anni in collaborazioni con altri gruppi di ricerca, sia esterni che interni all'Istituto, con la realizzazione di progetti di ricerca aventi come oggetto ad es. l'uso di probiotici in popolazione pediatrica (studi condotti in sinergia con la Clinica Pediatrica del Policlinico di Bari). Altre collaborazioni in essere con l'Istituto di Fisica dell'Università di Bari hanno portato alla realizzazione di modelli dell'attività elettrica dello stomaco e del colon, prima nell'animale e poi nell'uomo. In collaborazione con Il Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologia e Biofarmaceutica dell'Università di Bari e con Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari-DISBA di Bari si stanno conducendo studi sulle proprietà nutraceutiche di cibi arricchiti con probiotici (ad es. carciofi e olive) con le possibili ricadute in termini di salute dei consumatori/pazienti.

Progetto: *“Valutazione dei livelli circolanti dei principali ormoni gastrointestinali e delle loro varianti geniche in relazione all’insorgenza di mucosite e sindrome dispeptica in pazienti oncologici trattati con chemioterapia” (Termine del progetto: 31/12/2016).*

Responsabile del progetto: *Dott.ssa Caterina Clemente.*

Partecipanti: *Dott. Russo Francesco, dott. Riezzo Giuseppe, Dott. Linsalata Michele, Dott.ssa D’attoma Benedetta, Dott.ssa Orlando Antonella (Contrattista), Dott.ssa Martulli Manuela (Borsista)*

L’insorgenza di una sintomatologia GI è tra i più frequenti effetti collaterali della terapia antineoplastica e nausea e vomito sono frequentemente riferiti dal paziente. Tali sintomi dipendono dallo specifico agente utilizzato, dalla dose e dal regime terapeutico. Oltre nausea e vomito, i pz. oncologici possono soffrire dei più svariati sintomi GI incluso una vera e propria sindrome dispeptica (CADS = *cancerassociateddyspepsiasyndrome*). Purtroppo, gli ipotizzati meccanismi fisiopatogenetici che ne sono alla base non sono controllati dalla somministrazione di antiemetici, neanche da quelli più recenti, e nuove indicazioni in letteratura sembrano deporre per una multifattorialità patogenetica. Tali alterazioni possono estrinsecarsi anche in quadri di mucosite, ovvero di una infiammazione delle membrane mucosali, sia della cavità buccale (*“mucosite orale”*) che dell’intestino (*“mucosite intestinale”*). I fattori di rischio conosciuti riguardano sia il trattamento (dose e dal tipo di chemioterapico, dalla radioterapia) sia il paziente (età, sesso, obesità). Molte sostanze sono state chiamate in causa nella induzione della mucosite, quali ad es. radicali liberi o citochine pro-infiammatorie. Altri importanti fattori potenzialmente implicati sono alcuni ormoni GI, quali leptina, obestatina, motilina, pepsinogeno I e II, e gastrina. Tali peptidi sono, infatti, messaggeri chimici che oltre che regolare le funzioni del tratto GI possono avere un ruolo nell’infiammazione e nell’integrità della mucosa gastroenterica agendo come fattori trofici o inibitori (*Russo F et al. BMCCancer; 2013, 13:56*). La presenza di polimorfismi a livello genico di questi ormoni può essere inoltre un fattore determinante per l’insorgenza della CADS. Lo scopo principale del nostro studio è stato di valutare in donne con cr. mammario sottoposte a terapia antitumorale e reclutate nell’ambito di un progetto di ricerca finalizzato condotto in collaborazione con gli IRCCS Oncologico di Bari e San Raffaele la Pisana di Roma, le variazioni dei livelli di questi peptidi e delle loro varianti geniche in relazione alla insorgenza di CADS. Il progetto è stato completato per quanto riguarda la valutazione dei livelli circolanti di peptidi GI.

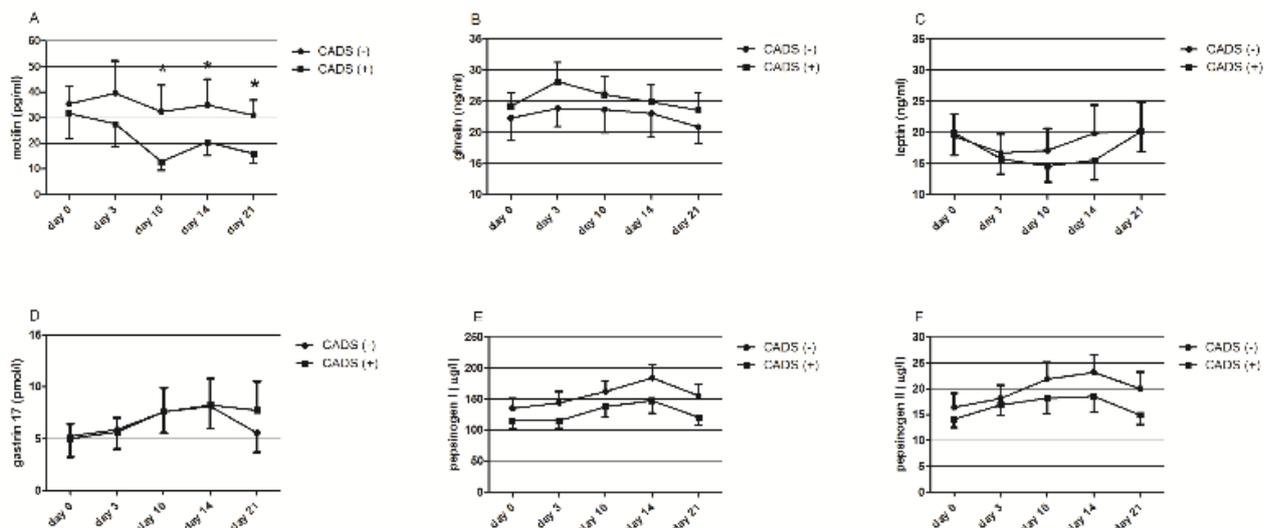


Figura 4. Profili dei peptidi GI in pz. con cr. mammario CADS+ e CADS-

Nello studio sono state considerate 37 pazienti affette da carcinoma della mammella e sottoposte a trattamento FEC60 (fluoracile, epirubicina, ciclofosfamide). In base a un questionario validato (GSRG GastrointestinalSymptoms Rating Scale) le pazienti sono state suddivise in due gruppi: il gruppo CADS(+) che presentava sintomatologia dispeptica durante la chemioterapia e il gruppo CADS(-) che non la presentava. Comparando i livelli degli ormoni durante il primo ciclo di chemioterapia nelle pazienti CADS(+) con i livelli delle pazienti CADS(-), per la motilina nelle pazienti CADS(+) si avevano livelli significativamente più bassi del 30.2% il 3° giorno, del 60.1% il 10° giorno, del 41.4% il 14° giorno, e del 48.3% il 21° giorno rispetto alle pazienti CADS(-) ($p < 0.05$, Mann-WhitneyRank Sum Test) (Fig. 1, A). Nelle pazienti CADS(+), i livelli di grelina erano il 18.0% più alti il 3° giorno, il 10.2% il 10°giorno, il 7.9% il 14° giorno e il 12.8% il 21° giorno rispetto alle pz CADS(-). Nessuna differenza fu trovata tra i due gruppi riguardo ai livelli di gastrina e leptina. Infine, i livelli di PGI e PGII si presentavano più bassi del 15-20% nel gruppo CADS(+) rispetto ai CADS(-), seppure senza raggiungere alcuna significatività statistica. Tali dati dimostrano la presenza di un differente profilo di peptidi GI, con particolare riferimento a motilina e, in minor misura, grelina. Non è stato possibile procedere all'analisi delle loro varianti geniche, in quanto non si è potuto provvedere presso l'IRCCS Oncologico di Bari al richiamo delle pazienti per ottenere, tramite prelievo ematico, i necessari campioni di globuli bianchi.

LINEA 3

MALATTIE NON NEOPLASTICHE DELL'APPARATO DIGERENTE

Per la linea di ricerca n. 3 “Malattie non neoplastiche dell'apparato digerente”, i principali risultati raggiunti dai singoli Laboratori per ciascun progetto per l'anno 2016 sono i seguenti:

UO Psicologia Clinica

Progetto: “Studio dei predittori genetici, immunologici e psichiatrici del rischio riattivazione in pazienti con retticolite ulcerosa (RCU)”(Termine del progetto: 31/03/2017¹)

Responsabile del progetto: Dott. Piero Porcelli

In collaborazione con il Laboratorio di Neuroscienze dell'Università di San Diego (California) e del Dip. Psicologia dell'Università di Torino, è stato intrapreso da circa 5 anni un progetto di valutazione integrata delle funzioni di personalità con test di personalità (Rorschach), brain imaging (EEG metodo s-LORETA, fMRI) e neuroscienze (mirror neurons system). Si tratta di un progetto di scienza di base sull'individuazione dei meccanismi neurobiologici di funzionamento mentale per i quali abbiamo dimostrato in alcune pubblicazioni come determinati parametri psicodiagnostici (M responses al test di Rorschach) sono strettamente e selettivamente associati a funzioni di mentalizzazione, empatia e social cognition (3,4). In questa prima fase del progetto, sono stati esaminati soggetti sani. Nella seconda fase ci proponiamo di iniziare la valutazione su popolazione clinica a scopo prognostico per l'outcome terapeutico.

La ricerca si è basata sostanzialmente sull'individuazione dei pattern EEG delle M-responses al test di Rorschach allo scopo di individuare l'attivazione delle aree di mirroring neurale nelle zone corticali pre-motorie tramite analisi delle onde mu. L'attività cerebrale di mirroring è stata scoperta negli anni '90 dal gruppo parmense di Giacomo Rizzolatti ed è diventata in un paio di decenni una delle aree più investigate nel rapporto tra funzioni mentali superiori (empatia, social cognition, embodied simulation) e neuroscienze, anche ai fini di possibili applicazioni terapeutiche in pazienti con deficit delle funzioni di mentalizzazione e di empatia. Le funzioni individuabili dalle M-responses al test di Rorschach sono teoricamente coerenti con l'attività mentale conseguente all'attivazione delle aree mirroring e il nostro gruppo di ricerca ha evidenziato i seguenti risultati:

- 1- le M-responses sono significativamente associate alla soppressione di onde mu nelle aree corticali centrali pre-motorie, indice EEG di attività motoria;
- 2- la soppressione di onde mu indica quindi l'attivazione psicologica della funzione di embodied simulation;
- 3- l'attivazione di attività di mirroring e di embodied simulation avviene selettivamente per le M-responses;
- 4- le M-responses sono quindi potenziali marker per l'individuazione di indicatori prognostici in terapia;
- 5- i risultati sono stati replicati usando tecniche differenti di brain imaging (fMRI e rTMS);
- 6- è necessario intraprendere una fase successiva di ricerca per la valutazione di tali ipotesi predittive su popolazione clinica.

Nella seguente tabella sono mostrati i risultati sopra citati.

¹ DDG n. 254/2017 “Concessione aspettativa non retribuita ai sensi dell'art. 10, c. 8, lett. a) CCNL del 10/02/2004, Area Dirigenza Sanitaria al Dott. P.P. matricola 31800 Dirigente Psicologo a tempo indeterminato dell'Istituto” dal 01/04/2017 al 31/10/2017

Hypothesis	N	Mu Suppression for Presence of Response		Mu Suppression for Absence of Response		Main Effect for Response (Presence vs. Absence)				
		M	SE	M	SE	F	df	p	η^2	
Hypothesis 1 (M vs. other determinants)										
Human movement responses (M)	24	-.24	.05	-.17	.05	18.76	1, 23	.000	.17	
Nonmoving human contents (non-M H contents) ^a	23	-.19	.06	-.15	.05	4.12	1, 22	.055	.06	
Nonhuman movement responses (FM/m)	24	-.17	.06	-.18	.05	.13	1, 23	.718	<.01	
Color responses (C)	22	-.17	.06	-.16	.05	.01	1, 21	.930	<.01	
Shading responses (Shading)	23	-.16	.06	-.19	.05	2.12	1, 22	.160	.03	
Pure Form responses (F)	24	-.17	.07	-.19	.05	.86	1, 23	.362	.01	
Hypothesis 2 (Subtypes of M) ^b										
Adequately (M/FQo) perceived M responses	17	-.20	.06	-.13	.07	1.95	1, 10	.193	.08	
Active (Ma) M responses	18	-.30	.07	-.21	.05	7.27	1, 17	.015	.13	
M associated with whole human figures (M/PureH)	11	-.25	.06	-.28	.05	.30	1, 16	.593	.01	

^aGiven that it is likely that M responses occur along with human contents, to avoid confounds this contrast was tested after excluding all M responses from the analysis. ^bOnly M responses are considered for this analysis; absence of M/FQo, Ma, and M/PureH responses, therefore, indicates—respectively—presence of M/FQ-/FQu, Mp, and M/NonPureH responses.

Allo studio pubblicato sul J Person Ass (3) è stato assegnato il Martin Mayman Award dalla Society for Personality Assessment come miglior lavoro pubblicato nel 2016 sull'assessment di personalità.

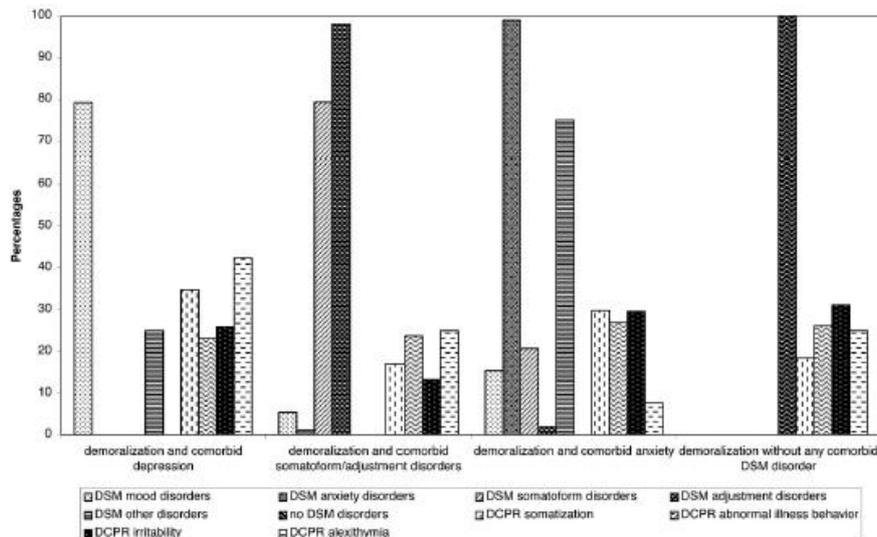
Progetto: “Prevalenza di diagnosi sottosoglia DCPR e di diagnosi SSD in pazienti con somatizzazioni funzionali” (Termine del progetto: 31/03/2017²)

Responsabile del progetto: Dott. Piero Porcelli

Questa linea di ricerca riguarda la valutazione diagnostica delle sindromi sottosoglia che compongono il Somatic Symptom Disorder, ri-classificazione nel nuovo manuale psichiatrico DSM-5 (APA, 2013) che ha sostituito i criteri di disturbo somatoforme della precedente edizione del DSM-IV-TR. La linea di ricerca si svolge in collaborazione con un gruppo italiano multicentrico (Dip. Psicologia, Università di Bologna; Dip. Psichiatria, Università di Ferrara; Dip. Psichiatria, Università di Modena; Dip. Epidemiologia, ISS, Roma), si incentra sulla diagnostica secondo i Diagnostic Criteria for Psychosomatic Research (DCPR) ed ha prodotto numerose pubblicazioni nel corso degli ultimi 20 anni (1,2). I DCPR sono in grado di individuare la psicopatologia subclinica ed i fattori psicosociali associati alle patologie mediche che invece sfuggono ai criteri classificatori della psicopatologia maggiore secondo il sistema diagnostico sia del vecchio DSM-IV, come evidenziato da un'ampia letteratura degli ultimi 20 anni. La validità e utilità clinica dei DCPR è evidenziata in una serie di studi negli ultimi 20 anni effettuati in USA, Europa, Lituania, Giappone, Cina e India.

I Diagnostic Criteria for Psychosomatic Research (DCPR) costituiscono un set di 12 sindromi psicosomatiche diagnosticabili con intervista strutturata. L'utilità clinica dei DCPR è stata dimostrata nel corso degli ultimi 20 anni dal nostro gruppo di ricerca multicentrica sui seguenti aspetti clinici: 1) sub-tipizzazione dei pazienti con patologie mediche; 2) identificazione di sindromi sottosoglia o non incluse nella classificazione psichiatrica ufficiale DSM; 3) valutazione del peso (burden) di malattia; 4) predizione di outcome terapeutici; 5) identificazione dei fattori di rischio. A titolo di esempio della sotto-tipizzazione diagnostica, è stata effettuata cluster analysis in 1560 pazienti con patologie gastrointestinali, cardiovascolari, endocrine, dermatologiche e oncologiche per la diagnosi di demoralizzazione, di cui si produce la seguente figura:

² DDG n. 254/2017 “Concessione aspettativa non retribuita ai sensi dell'art. 10, c. 8, lett. a) CCNL del 10/02/2004, Area Dirigenza Sanitaria al Dott. P.P. matricola 31800 Dirigente Psicologo a tempo indeterminato dell'Istituto” dal 01/04/2017 al 31/10/2017



Progetto: “Predittori di efficacia di intervento combinato (counseling psicologico+trattamento as-usual) nella Irritable Bowel Syndrome” (Termine del progetto: 31/03/2017³)

Responsabile del progetto: Dott. Piero Porcelli

Molti studi hanno dimostrato che i pazienti con IBS hanno elevati livelli di ansia e depressione, particolarmente alti in quegli individui che si rivolgono frequentemente a specialisti gastroenterologi a causa dei propri sintomi, soprattutto nei centri di cura terziari. Tuttavia, gran parte dei pazienti non ha sindromi ansioso-depressive di livello clinico e la sintomatologia psicopatologica è spesso diffusa, subdola e sub-clinica. Si è pertanto ipotizzato che altri meccanismi psicologici possano avere un ruolo più importante della franca psicopatologia ansioso-depressiva nell’IBS. Due costrutti importanti per determinare l’outcome terapeutico dei pazienti con IBS si sono rivelati in letteratura la gastrointestinale-specific anxiety (GSA) e l’alexithymia, entrambe riguardanti un’alterazione della regolazione emotiva e del brain-gut axis. Due nostri studi hanno dimostrato che GSA e soprattutto l’alexithymia misurate alla baseline predicono indipendentemente una scarsa risposta terapeutica dei pazienti IBS (5,6).

Evidenze cliniche, epidemiologiche e sperimentali indicano che la Irritable Bowel Syndrome (IBS) ha un’eziologia multifattoriale di tipo biopsicosociale. L’alterazione della sensibilità del sistema nervoso enterico è quasi unanimemente ritenuta uno dei fattori centrali nella mediazione delle risposte autonome e neuro-endocrine oltre che nella modulazione del dolore in risposta ad eventi stressanti (brain-gut axis). La Gastrointestinal Specific Anxiety (GSA) è definita come pattern di risposta cognitiva e comportamentale ai timori di avere sensazioni spiacevoli localizzate nel tratto GI e comprende l’iper-vigilanza verso le sensazioni GI e l’evitamento fobico dei contesti ambientali in cui queste ultime possono manifestarsi. L’alexithymia è un deficit di elaborazione cognitiva delle emozioni composta da deficit della consapevolezza affettiva e stile cognitivo operatorio ed è considerata una delle caratteristiche di personalità più importanti nella predisposizione a disturbi della regolazione affettiva, inclusi i disturbi di somatizzazione. Nella nostra linea di ricerca abbiamo studiato il peso congiunto di GSA e alexithymia nel predire severità e outcome terapeutico in 177

³ DDG n. 254/2017 “Concessione aspettativa non retribuita ai sensi dell’art. 10, c. 8, lett. a) CCNL del 10/02/2004, Area Dirigenza Sanitaria al Dott. P.P. matricola 31800 Dirigente Psicologo a tempo indeterminato dell’Istituto” dal 01/04/2017 al 31/10/2017

pazienti consecutivi IBS sottoposti a trattamento as-usual (per massimizzare la validità esterna), con valutazione a 6 mesi, ed abbiamo raggiunto i seguenti risultati:

- 1) GSA e alexithymia predicano in maniera indipendente la severità IBS (in termini di frequenza, intensità e qualità di vita) al reclutamento, controllando per le altre co-variabili;
- 2) l'alexithymia spiega una porzione significativamente maggiore della GSA dello score di severità IBS;
- 3) GSA e alexithymia sono significativamente associate all'outcome terapeutico, come si evince dalla seguente tabella:

Comparisons of GI-specific anxiety (VSI), alexithymia (TAS-20), IBS symptoms (GSRS-IBS), and psychological distress (HADS) before (T1) and after (T2) treatment in improved and unimproved groups.

	Improved group (N = 111)				Unimproved group (N = 39)				Improved versus unimproved	
	T1 Mean ± SD	T2 Mean ± SD	t _(df=110) (p)	d	T1 Mean ± SD	T2 Mean ± SD	t _(df=38) (p)	d	T2 t _(df=148) (p)	d
VSI	40.00 ± 8.71	21.05 ± 6.08	27.39 (<.001)	2.52	44.31 ± 5.55	48.23 ± 5.24	8.51 (<.001)	0.73	24.84 (<.001)	4.63
TAS-20*	55.97 ± 12.22	51.49 ± 10.18	6.21 (<.001)	0.40	63.46 ± 7.35	63.92 ± 8.54	0.31 (.76)	0.06	6.83 (<.001)	1.27
DIF	20.68 ± 7.52	18.95 ± 5.82	2.99 (.003)	0.21	22.00 ± 6.93	23.77 ± 3.28	1.42 (.16)	0.33	4.90 (<.001)	0.91
DDF	13.78 ± 5.31	12.57 ± 5.41	2.05 (.04)	0.23	18.23 ± 4.07	18.62 ± 4.42	0.50 (.62)	0.09	6.28 (<.001)	1.17
EOT	21.51 ± 5.72	19.97 ± 4.67	2.55 (.01)	0.29	23.23 ± 5.88	21.54 ± 2.86	1.57 (.12)	0.37	1.96 (.05)	0.37
GSRS-IBS	3.41 ± 0.78	1.46 ± 0.34	26.37 (<.001)	3.24	3.52 ± 0.49	4.16 ± 0.62	9.19 (<.001)	1.14	33.51 (<.001)	6.28
Bloating	3.86 ± 1.07	1.48 ± 0.52	23.43 (<.001)	2.83	4.23 ± 0.60	4.85 ± 0.78	5.32 (<.001)	0.89	30.25 (<.001)	5.64
Diarrhea	3.26 ± 1.46	1.44 ± 0.47	15.63 (<.001)	1.68	3.36 ± 1.69	3.85 ± 1.86	5.28 (<.001)	0.28	12.53 (<.001)	2.35
Constipation	2.46 ± 1.59	1.32 ± 0.47	8.51 (<.001)	0.97	2.23 ± 1.38	3.00 ± 1.82	6.81 (<.001)	0.48	8.93 (<.001)	1.16
Pain	4.32 ± 0.80	1.78 ± 0.71	25.73 (<.001)	3.36	4.38 ± 0.63	5.11 ± 0.69	7.05 (<.001)	1.10	25.48 (<.001)	4.72
Satiety	3.13 ± 1.32	1.16 ± 0.37	16.12 (<.001)	2.03	3.53 ± 1.30	4.31 ± 1.34	4.52 (<.001)	0.59	22.51 (<.001)	4.20
HADS-A	6.95 ± 4.21	4.00 ± 2.92	14.68 (<.001)	0.81	6.77 ± 3.98	5.85 ± 3.44	3.38 (.002)	0.25	4.61 (<.001)	0.60
HADS-D	6.32 ± 3.88	3.51 ± 3.09	17.61 (<.001)	0.80	6.15 ± 4.01	6.38 ± 3.52	0.58 (.57)	0.06	4.81 (<.001)	0.89

VSI = Visceral Sensitivity Index; TAS-20 = Toronto Alexithymia Scale-20; DIF = difficulty identifying feelings; DDF = difficulty describing feelings; EOT = externally oriented thinking; GSRS-IBS = Gastrointestinal Symptom Rating Scale-IBS; HADS-A = Hospital Anxiety and Depression Scale-Anxiety subscale; HADS-D = Hospital Anxiety and Depression Scale-Depression subscale.

* Prevalence of alexithymia (TAS-20 > 60): At T1: improved group =51 (45.9%), unimproved group =33 (84.6%), between-group difference: $\chi^2 = 17.51$, $p < .001$. At T2: improved group =27 (24.3%), unimproved group =32 (82%), between-group difference: $\chi^2 = 40.30$, $p < .001$.

- 4) la regressione logistica ha mostrato che l'alexithymia alla baseline ha un maggior peso predittivo della GSA alla baseline nello spiegare la varianza del risultato terapeutico, come si evince dalla seguente tabella.

Individual variable logistic regression predicting treatment outcome.

Variables	Cox & Snell R ²	ΔR ²	χ ²	p	df	Final model			
						B	SE	Wald	p
Age	0.007		1.143	.48	1	0.009	0.028	0.052	.83
GSRS-IBS	0.014	0.007	4.136	.009	1	0.263	0.103	6.501	.011
HADS-A	0.019	0.005	2.226	.14	1	0.187	0.105	2.059	.073
HADS-D	0.023	0.004	2.112	.15	1	0.133	0.107	1.537	.21
VSI	0.054	0.031	1.675	.21	1	0.010	0.037	0.074	.78
TAS-20	0.155	0.101	12.145	<.001	1	0.787	0.291	10.410	.001
DIF	0.143	0.089	9.354	<.001	1	0.684	0.243	8.194	.001
DDF	0.148	0.094	7.547	.001	1	0.714	0.294	9.994	.001
EOT	0.094	0.040	2.245	.08	1	0.198	0.097	3.154	.09

GSRS-IBS = Gastrointestinal Symptom Rating Scale-IBS; HADS-A = Hospital Anxiety and Depression Scale-Anxiety subscale; HADS-D = Hospital Anxiety and Depression Scale-Depression subscale; VSI = Visceral Sensitivity Index; TAS-20 = Toronto Alexithymia Scale-20; DIF = difficulty identifying feelings; DDF = difficulty describing feelings; EOT = externally oriented thinking.

Laboratorio di Farmacologia Sperimentale

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

Vista le frequenti differenze di genere osservate nelle patologie dell'apparato digerente, tutti gli studi effettuati dall'Unità prevedono una raccolta ed analisi dei dati considerando genere ed età. Altro aspetto unificante dei progetti è il particolare interesse per lo studio delle molecole antinfiammatorie ed antiossidanti che potrebbe svolgere un ruolo cardine negli effetti benefici della dieta mediterranea (i.e. idrossitiroso dell'olio d'oliva).

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

In particolare si effettuano studi di:

- motilità nei pazienti con IBD, malattia diverticolare, cancro colon-rettale, obesità, cancro dello stomaco, calcolosi della colecisti;
- permeabilità (assorbimento e secrezione) nei pazienti con cancro colon-rettale.

Inoltre gli studi di motilità vengono effettuati non solo su strip ma anche su colture cellulari primarie di colon.

L'unità operativa collabora con altri enti di ricerca (università, ospedali, industrie farmaceutiche) per favorire lo scambio di competenze scientifiche e di conoscenze avanzate attraverso:

- iniziative comuni con il mondo della clinica e della ricerca scientifica;
- istituzione di stage formativi per tesi di laurea su temi attinenti alle linee di ricerca dell'istituto;
- creazione di percorsi professionali all'interno dell'unità operativa stessa.

COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE

- Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna;
- Dipartimento di Medicina Interna e Terapia Medica, Sez. di Farmacologia Clinica e Sperimentale, Università di Pavia;
- Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica - Università degli Studi di Bari;
- Dipartimento di Medicina Interna e Specialità Mediche dell'Università Sapienza di Roma;
- Centro Studi e Ricerche in Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano Bicocca;
- Industria Farmaceutica, ROTTAPHARM S.p.A., Monza.

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

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

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

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

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

La DD viene classificata in:

- **DIVERTICOLOSI:** presenza di diverticoli (erniazione della mucosa e sottomucosa colica attraverso una zona di maggiore debolezza della parete muscolare) in assenza di sintomatologia clinica. I diverticoli possono essere sia intra che extramurali.
- **DIVERTICOLITE:** infiammazione/infezione dei diverticoli associata a sintomi e segni laboratoristici di infiammazione sistemica (febbre, leucocitosi, incremento degli indici di flogosi).

Lo scopo dello studio è stato quindi quello di investigare la presenza di alterazioni funzionali e molecolari nel muscolo colico sia nella diverticolosi che nella diverticolite.

Pertanto per studiare i vari stadi della malattia abbiamo classificato i pazienti in tre gruppi:

- CONTROLLI:** neoplasia del colon in assenza di diverticoli;
- DIVERTICOLOSI:** Il tessuto è stato prelevato in aree in presenza ed assenza di diverticoli identificato come diverticoli+ e diverticoli-;
- DIVERTICOLITE**

Dai tessuti provenienti dai pazienti operati per le diverse patologie secondo la classificazione di cui sopra sono state effettuate:

- 1) coltura estremamente pura (purezza del 99%) di cellule muscolari lisce (SMC) di muscolatura circolare e longitudinale;
- 2) strip di muscolatura liscia circolare e longitudinale.

Nei tre gruppi A, B e C sono state effettuati due tipi di studi:

- morfofunzionale della muscolatura liscia (sia sulle SMC che sugli strip muscolari) valutando la risposta ad agenti contratturanti, quali l'acetilcolina (Ach) e il carbacholo che ad agenti rilascianti quali il VIP (1 μ M) sulla muscolatura liscia circolare e longitudinale;
- molecolare valutando l'espressione genica dei recettori muscarinici per l'Ach (M2/M3) e delle molecole implicate nella pathway del rilascio cellulare come i recettori del VIP (VPAC1/2, NPR-C) e l'ossido nitrico sintasi (e-NOS) associato alla via dell' NPR-C, presso l'Università la Sapienza di Roma.

Risultati

Effetto della contrazione indotto dal carbacholo e dall'acetilcolina

Stimolando con carbacholo gli strip (longitudinale e circolare) di colon sia del gruppo controllo che dei due gruppi di studio (diverticolosi e diverticolite) abbiamo osservato che la curva dose-risposta del carbacholo, come risposta massima (alla concentrazione 3×10^{-4} M), è maggiore nel gruppo controllo rispetto agli altri gruppi e in modo statisticamente significativo solo nella muscolatura circolare del gruppo diverticolosi (diverticoli +) e diverticolite (fig.1 A, B)

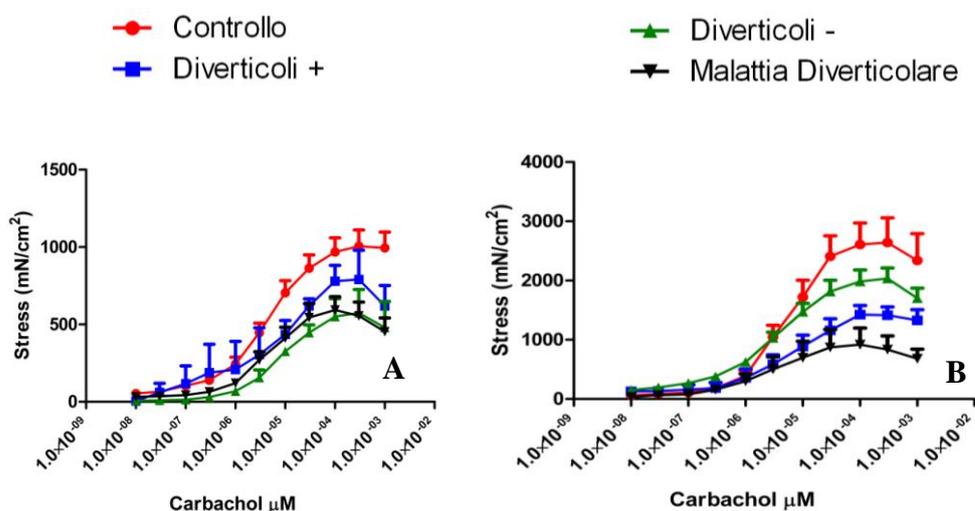


Fig.1 (A-B) Effetto del carbacolo (curva dose-risposta) su strip di muscolatura circolare e longitudinale di colon nei diversi gruppi di pazienti

Anche nelle SMC abbiamo osservato una maggiore risposta alla concentrazione massima di acetilcolina solo nella muscolatura circolare del gruppo controllo rispetto agli altri gruppi presi in esame. (Fig.2)

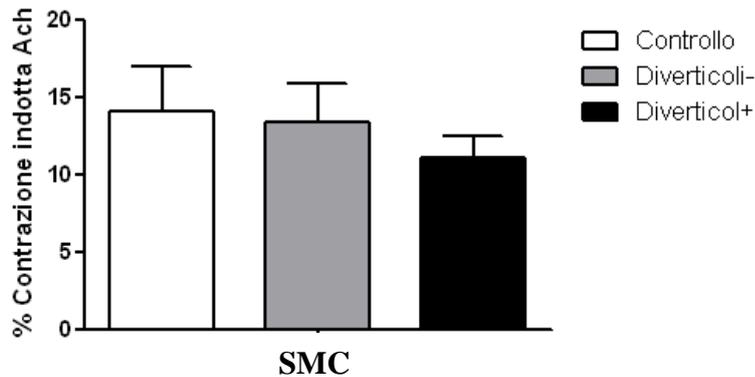


Fig. 2 Effetto dell'acetilcolina sulle SMC circolari di colon.

Effetto del rilasciamento indotto dal VIP

L'effetto massimale di rilasciamento al VIP sia negli strip che nelle SMC risulta essere maggiore nel gruppo controllo rispetto agli altri gruppi e in modo statisticamente significativo solo nella muscolatura circolare del gruppo Diverticolosi (diverticoli +). (Fig. 3 A,B)

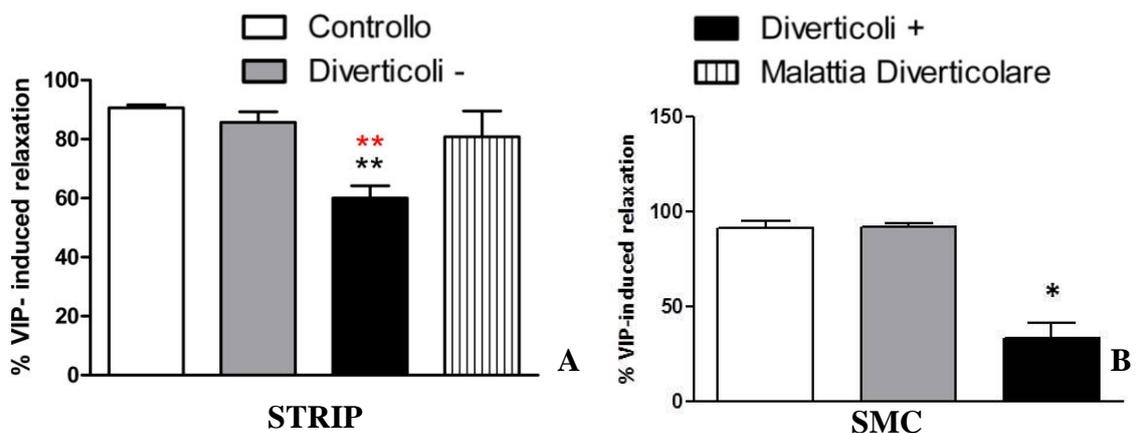


Fig.3 (A-B) Effetto rilasciante del VIP su strip e SMC. (strip: controllo vs diverticoli + ** p<0.01; diverticoli - vs diverticoli + ** p<0.01; SMC controllo vs diverticoli + * p<0.05)

Da questi risultati si evince che la malattia diverticolare (diverticolosi, diverticolite) ha una compromissione della muscolatura circolare (strip, SMC) in seguito ad una riduzione della risposta sia contrattile che di rilasciamento. Questa ridotta risposta è associata ad una diminuzione dell'espressione recettoriale. Infatti nelle cellule abbiamo osservato che la diminuzione della risposta contrattile è associata ad una diminuzione dell'espressione dei trascritti per il recettore muscarinico M3, mentre la diminuzione del rilasciamento è associata ad una significativa

diminuzione dei trascritti del recettore del VIP (VPAC1-2) e NPR-C e delle co molecole (e-NOS) associate al recettore stesso nella via di trasduzione del segnale.

Dai dati ottenuti fin'ora possiamo dire che la malattia diverticolare presenta una compromissione della muscolatura circolare dovuta ad un'alterata risposta dei neurotrasmettitori enterici e ad una diversa espressione dei recettori di membrana. Queste alterazioni miogeniche rappresentano un ulteriore elemento che contribuisce alla dismotilità colica osservate nei diversi stadi della malattia diverticolare, sia nella diverticolosi che nella diverticolite.

Per comprendere fino in fondo il ruolo della muscolatura nella patogenesi della diverticolosi e della diverticolite dobbiamo ancora effettuare studi su:

- A) Pathways infiammatorie;
- B) Switch fenotipico.

Questo studio è stato oggetto di un poster presentato al 22nd National Congress of Digestive Diseases, Italian Federation of Societies of Digestive Diseases – FISMAD Naples, 24 February 2016 - 27 February 2016:

Pallotta L, Scirocco A, Ignazzi A, Maselli MA, Cicenia A, Carabotti M, De Toma G, Tellan G, Pezzolla F, Corazziari E, Severi C. Diverticular Disease: altered response to enteric neurotransmitters in human colonic longitudinal and circular smooth muscle. Digestive and Liver Disease 48S2 (2016) e67–e231 (Page. e173)

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

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

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

Il progetto si basa su uno studio, precedentemente pubblicato, nel quali abbiamo dimostrato che l'età e il genere influenzano la risposta motoria del colon umano. Ciò sembra essere dovuto al recettore muscarinico e al sistema nitrergico, gender-dipendente.

Pertanto gli obiettivi del nuovo progetto sono: caratterizzare "in vitro" nella muscolatura liscia di colon di pazienti di diversa età e genere

- 1) il significato funzionale dei recettori per gli estrogeni (ERs);
- 2) il ruolo degli ERs nel mediare la risposta esogena colinergica;
- 3) il ruolo degli ERs nel mediare la risposta esogena- ed endogena-nitrergica,;
- 4) l'espressione del recettore beta (ER β ,) nella mucosa e nella muscolatura liscia e l'espressione delle NOS.

Pertanto inizialmente abbiamo messo a punto la metodica per individuare il contratturante ideale per le curve di rilassamento indotte dagli agonisti dei recettori ER quali: 17-beta-estradiolo (E2, attivatore della maggior parte dei recettori ER), PPT (selettivo agonista dei ER α) e DPN (agonista selettivo degli ER β). Il contratturante ideale tra il Carbacolo e il KCl, testati a diverse concentrazioni, è risultato essere il KCl. Quest'ultimo, infatti, aveva una risposta costante e duratura per un periodo di circa 20 min tempo necessario per effettuare le curve di rilassamento.

Successivamente abbiamo effettuato curve dose-risposta di E2, PPT e DPN con concentrazioni da 10^{-8} M a $3 \cdot 10^{-4}$ M. Dai risultati ottenuti abbiamo osservato che dei tre agonisti (E2, DPN, PPT) quello che induceva un maggiore rilassamento era E2, con una percentuale del 41.8% nei maschi e una percentuale del 62.2 % nelle femmine. Comunque l'effetto di rilassamento indotto dall'E2 era

più accentuato nelle femmine rispetto ai maschi confermando la presenza maggiore dei recettori estrogenici nelle femmine come già riportato in letteratura. Invece, per quanto riguarda la risposta degli altri due agonisti recettori specifici, osserviamo che il DPN (agonista recettore β) ha un effetto di rilassamento sulla muscolatura liscia del colon umano sovrapponibile nei due gruppi, contrariamente a quella indotta dal PPT (agonista recettore α) il cui effetto risulta essere maggiore nelle femmine rispetto ai maschi. Questi dati devono essere confermati da ulteriori sperimentazioni. Il 2° obiettivo del progetto, ruolo degli ERs nel mediare la risposta esogena colinergica, è stato realizzato effettuando curve dose-risposta di betanecolo, (contratturante specifico per i recettori muscarinici), in presenza e assenza dei tre agonisti, sopra menzionati, alla concentrazione iniziale di $3 \times 10^{-4} M$.

I risultati preliminari mostrano che l'E2 e il DPN hanno un effetto inibitorio sulla risposta massimale indotta dal betanecolo mentre il PPT non ha alcun effetto.

Il progetto sarà completato indagando:

- il ruolo degli ERs nel mediare la risposta esogena- ed endogena-nitrergica;

l'espressione del recettore beta ($ER\beta$) nella mucosa e nella muscolatura liscia e l'espressione delle NOS.

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

Responsabile: Dott.ssa M.A. Maselli

Partecipanti: Dott. Pezzolla Francesco, Dott. Lorusso Dionigi, Dott.ssa Caruso Maria Lucia, Dott.ssa Notanicola Maria, Dott. Chiappa Marcello, Dott.ssa Ignazzi Antonia (Contrattista), Dott.ssa D'Onghia Rossella (Borsista), Dott.ssa Scirocco Annunziata (Borsista)

Questo studio è la continuazione di uno precedente in cui abbiamo dimostrato che l'idrossitiroso (HT) ha un effetto procinetico sulla muscolatura liscia del colon umano poiché aumenta l'attività miogena e riduce la risposta endogena bloccando i radicali liberi che si formano durante un processo infiammatorio conclamato. Quest'ultimo effetto è stato indagato mettendo a confronto l'HT in presenza ed assenza di tre sostanze, l' L-Name (inibitore specifico dell'NO sintasi), la SOD (catalizzatore della conversione dei radicali superossidi) e il SIN-1 (generatore di perossinitriti) che sono coinvolte nel processo infiammatorio.

Dai dati ottenuti possiamo affermare che l'effetto dell'HT è sovrapponibile all'effetto indotto dalla SOD poiché sia l'HT che la SOD, da soli e in associazione, determinano la riduzione della formazione di perossinitriti.

Alla luce di questi risultati possiamo concludere che l'HT modula la formazione dei ROS, riducendo la formazione di perossinitriti. Pertanto l'HT potrebbe rappresentare un nuovo target per le malattie infiammatorie croniche.

Per quanto riguarda invece l'azione di trasporto dell'HT sulla mucosa di colon, studiata con la camera di Ussing, abbiamo osservato che questo polifenolo produce una lenta e progressiva riduzione dose-dipendente del potenziale transepiteliale (V_t) e della corrente di cortocircuito (ICC) senza alcuna variazione della resistenza transepiteliale (R_t) nel tessuto stimolato con secretagoghi, quali carbacolo, foskolina e 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Questa azione inibitoria coinvolge il flusso basolaterale del cloro e del potassio. Dai risultati ottenuti possiamo affermare che l'HT riduce l'attività di trasporto dell'epitelio colonico stimolato e incrementa la permeazione paracellulare nell'epitelio non stimolato. Quindi esso è candidato ad essere una sostanza che migliora la permeabilità intestinale.

Attualmente per il nuovo progetto stiamo mettendo a punto l'induzione del processo infiammatorio assimilabile all'IBD.

Laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione

(le attività del Laboratorio sono descritte nella Linea 2, pag. 20)

Progetto: *“Effetto protettivo del Lactobacillus rhamnosus GG (L.GG) sulla barriera epiteliale intestinale in seguito a danno indotto dalla gliadina. Ruolo delle poliammine cellulari” (Termine del progetto: 31/12/2017).*

Responsabile: *Dr. Francesco Russo*

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

Tale progetto prevede quale obiettivo primario la valutazione sia *in vitro*, su una linea cellulare di adenocarcinoma del colon (Caco-2), che *in vivo*, su campioni di tessuto intestinale provenienti da ratti Wistar, della capacità del ceppo probiotico *Lactobacillus rhamnosus* GG (L.GG) di proteggere l'integrità della barriera epiteliale intestinale in seguito al danno indotto dalla gliadina. Nel corso del 2016 su cellule Caco-2, trattate con estratti peptici di gliadina (PTG) da soli o in combinazione con l'L.GG, è stata valutata: la resistenza elettrica transepiteliale, il rilascio di zonulina, l'espressione genica delle principali proteine delle tight junctions (ZO-1, occludina e claudina-1) e delle adherensjunctions (E-caderina, α e β - catenina) nonché il metabolismo cellulare delle poliammine e il ruolo delle stesse sull'attività protettiva dell'epitelio intestinale da parte dell'L.GG. I risultati dello studio *in vitro* hanno dimostrato come il trattamento con PTG sia in grado di determinare un'alterazione significativa della permeabilità paracellulare attraverso la rapida diminuzione della resistenza elettrica trans-epiteliale e il contemporaneo rilascio di zonulina. La somministrazione dell'L.GG è risultata in grado di contrastare l'azione del PTG ripristinando in tal modo la funzione di barriera. La presenza delle poliammine cellulari si è dimostrata inoltre un pre-requisito per l'L.GG nell'esplicare la sua funzione riparatrice attraverso la modulazione dell'espressione di differenti proteine delle tight junctions e delle adherensjunctions. I risultati ottenuti sono stati analizzati ed è in corso la stesura di una pubblicazione scientifica dal titolo: *“Changes in paracellular permeability induced by Pepsin-Trypsin digested Gliadin (PTG): role of polyamines in the Lactobacillus rhamnosus GG protective action”*.

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

Responsabile: *Dr. Michele Linsalata*

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

Lo studio della malattia celiaca e della sensibilità al glutine è uno degli assi portanti del laboratorio di Fisiopatologia della Nutrizione sia come attività di ricerca che diagnostica-assistenziale. La malattia celiaca (MC) è contraddistinta da modificazioni strutturali e funzionali dell'epitelio

intestinale e da un'alterata permeabilità intestinale (PI). E' stata riportata la presenza di una forma di "intolleranza al glutine" (GlutenSensitivity, GS) con sintomi gastrointestinali (GI) simili a quelli della MC, ma con quadro clinico meno severo. Inoltre, i sintomi GI della MC spesso si sovrappongono a quelli della variante diarroica della sindrome di intestino irritabile (IBS-d). Nella malattia celiaca un ruolo importante sembra essere svolto oltre che dall'infiammazione e dalle alterazioni immunologiche, anche da cambiamenti nella PI e dai livelli dei differenti peptidi GI che la regolano (ad es. zonulina e GLP-2). La permeabilità GI può essere valutata "in vivo", con metodi non invasivi, attraverso la misura dell'escrezione urinaria di zuccheri (saccarosio, lattulosio, mannitolo, sucralosio) somministrati al paziente per via orale. Differenti metodi possono essere impiegati per il dosaggio urinario di tali zuccheri sebbene la cromatografia ionica con rivelazione amperometrica rimane quello più sensibile e selettivo (*Linsalata M et al. ClinChem Lab Med 2014*). Dati in letteratura evidenziano il coinvolgimento anche di peptidi GI quali grelina e obestatina nella patogenesi delle suddette malattie. La grelina è coinvolta nel controllo della barriera mucosale ed è considerata un agente protettivo della mucosa intestinale. Inoltre, il gene che codifica per la grelina mostra numerosi polimorfismi di singolo nucleotide che sembrano modulare il rischio di numerose patologie infiammatorie e neoplastiche. La obestatina è un ormone derivante dalla preprogrelina e sembra reprimere l'assunzione di cibo. I livelli di grelina così come il rapporto obestatina/grelina sono stati proposti come markers di attività in pazienti con colite ulcerosa. Tuttavia non ci sono dati in letteratura circa il ruolo di tali ormoni nella patogenesi della malattia celiaca e dell'IBS né, tantomeno, ci sono dati di eventuali relazioni tra i livelli circolanti di tali ormoni e le alterazioni della permeabilità intestinale che caratterizzano tali patologie. Nel 2016 è stato portato a termine uno studio caso-controllo che ha evidenziato l'esistenza di un'alterazione della permeabilità intestinale non solo in pz celiaci ma anche in pz IBS-d ed un ruolo della grelina e dei polimorfismi del suo gene nel sostenere la componente infiammatoria di entrambe le patologie che presentano simile profilo sintomatologico e differente eziologia. I risultati di tale studio sono stati oggetto di pubblicazione scientifica su rivista internazionale (*Russo F et al. Eur J GastroenterolHepatol. 2017 Feb;29(2):160-168.*) e le figure sottostanti riportano le differenze nei livelli di obestatina e grelina e del rapporto obestatina/grelina tra soggetti sani e pazienti con IBS o celiachia (Fig. 2) nonché nei pazienti celiaci prima e dopo un anno di dieta priva di glutine (Fig. 3)

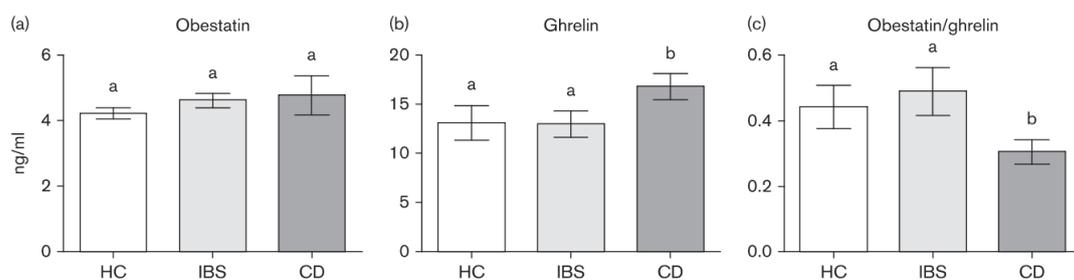


Fig. 2. The levels of obestatin (a), ghrelin (b) and the obestatin/ghrelin ratio (c) in healthy individuals (HC), patients with the diarrhea variant of irritable bowel syndrome (IBS-d), and celiac disease (CD) patients. Data are reported as mean \pm SEM and analyzed using the Kruskal-Wallis test and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

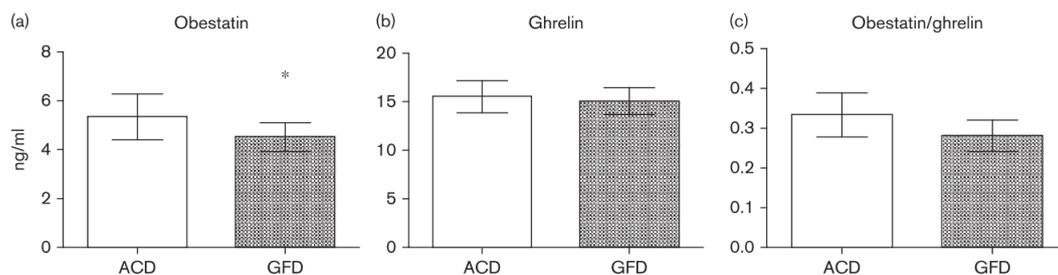


Fig. 3. The levels of obestatin (a), ghrelin (b) and the obestatin/ghrelin ratio (c) in patients with active celiac disease (ACD) and after 1 year of a gluten-free diet (GFD). Data are reported as mean \pm SEM and analyzed using the Wilcoxon rank sum test for differences (* $P < 0.05$).

L'integrità della barriera intestinale può essere studiata valutando anche il danno epiteliale cellulare mediante quantificazione sierica di proteine quali le I-FABP (intestinal-fatty acid binding proteins) e la DAO (diamine ossidase). Queste proteine presenti a livello dell'epitelio intestinale, sono quindi rilasciate in circolo in seguito alla perdita dell'integrità di membrana. Nel 2016 è iniziato uno studio caso controllo volto a valutare l'associazione tra alterazioni della permeabilità intestinale, i peptidi GI coinvolti nella sua regolazione (Zonulina, GLP-2) e i markers di danno epiteliale cellulare (I-FABP, DAO). I dati preliminari confermano un incremento significativo della permeabilità intestinale in pazienti celiaci rispetto ai soggetti sani e ai pz con IBS-d, sebbene anche questi ultimi presentino una alterazione dei livelli urinari di Lattulosio e Mannitolo. Anche i livelli sierici delle I-FABP, zonulina e GLP-2 risultano essere più alti nei pz. celiaci rispetto ai pz. con IBS-d e ai soggetti sani. Inoltre, è stato evidenziato che la dieta priva di glutine è in grado di migliorare la funzione di barriera intestinale e di ridurre i livelli sierici di zonulina e GLP-2 senza, tuttavia, raggiungere quelli i valori dei soggetti sani. Nel corso dello studio, si considereranno inoltre eventuali differenze circa la popolazione microbica intestinale, la produzione di SCFA e i livelli di D-lattato. Valutare, pertanto, l'integrità dell'epitelio GI e tutti i fattori in essa coinvolti può avere ripercussioni sostanziali per migliorare le nostre conoscenze sulla fisiopatologia di alcune patologie da trasferire poi nella pratica clinica quotidiana e per meglio identificare strategie mirate di intervento.

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

Responsabile: *Dr. Giuseppe Riezzo*

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

Lo studio prevede come obiettivo primario la valutazione della presenza/assenza di anticorpi anti-tTG nella mucosa duodenale dei pazienti che, sulla scorta dell'esame endoscopico e istologico,

saranno individuati come affetti da “celiachia potenziale” (definiti come pz. con positività ai marcatori della celiachia, ma senza danno istologico intestinale) e dei pazienti DQ2-DQ8 positivi con sintomatologia suggestiva di celiachia, ma con sierologia negativa. L’obiettivo secondario è quello del follow-up dei pazienti con anticorpi anti-tTG nella mucosa duodenale per dimostrarne l’utilità come marcatore della fase iniziale di “intolleranza al glutine”. Il concetto di celiachia potenziale proviene dalla consensus conference di OSLO 2011 dove vennero definite le differenti reazioni al glutine che includevano: le reazioni autoimmuni, ossia tutte le forme di celiachia; l’allergia al frumento; la *nonceliacglutensensitivity* (sensibilità al glutine non celiaca). La celiachia, definita come una reazione autoimmune al glutine, può essere suddivisa in “*celiachia sintomatica*” (suddivisa a sua volta in classica e non classica), “*celiachia silente o asintomatica*” e “*celiachia potenziale*”, caratterizzata da incremento dei livelli di marker sierologici per celiachia ma senza atrofia dei villi, Anticorpi anti-tTG su biopsie di mucosa intestinale sono stati individuati in pazienti con celiachia potenziale caratterizzati da sintomi correlati al glutine, positività per marcatori per celiachia e assenza di danno intestinale evidente. E’ peculiare il fatto che sia i sintomi sia gli anticorpi anti-tTG a livello mucosale scompaiano dopo GFD. La problematica relativa ai pazienti con *nonceliacglutensensitivity o wheatsensitivity* si è sviluppata notevolmente negli ultimi anni in considerazione di una evidente difficoltà nell’individuazione di marcatori per tale patologia, pertanto sarà interessante verificare la eventuale presenza di autoanticorpi nelle biopsie di questi pazienti che di solito sono diagnosticati come sensibili al glutine sulla base della storia clinica e della risposta alla sottrazione e reintroduzione del glutine. Trattandosi di studio esplorativo, il calcolo della potenza dello studio, non è applicabile. Il gruppo di studio comprenderà pazienti così suddivisi da reclutare in 3 anni. 10 pazienti DQ2DQ8 +, con sintomi suggestivi di celiachia, marcatori per celiachia positivi ma senza danno istologico (celiachia potenziale) e con presenza di anticorpi anti-tTG nella biopsia di mucosa duodenale. 10 pazienti DQ2DQ8 +, con sintomi suggestivi di celiachia, marcatori per celiachia positivi ma senza danno istologico (celiachia potenziale) e in cui non si individueranno anticorpi anti-tTG nella biopsia di mucosa duodenale. Questi due gruppi saranno confrontati con: 10 pazienti DQ2DQ8 + e con sintomi suggestivi di celiachia, marcatori per celiachia negativi e senza danno istologico con anticorpi anti-tTG nella biopsia di mucosa duodenale. 10 pazienti DQ2DQ8 + e con sintomi suggestivi di celiachia, marcatori per celiachia negativi e senza danno istologico senza anticorpi anti-tTG nella biopsia di mucosa duodenale. Dopo una serie di difficoltà iniziali la collaborazione con i colleghi dell’endoscopia digestiva ha raggiunto la sua piena funzionalità grazie al supporto di un assistente sanitario borsista che svolge in maniera efficace la funzione di tramite tra i colleghi endoscopisti e i ricercatori. Tale figura professionale, infatti, dopo adeguato training è in grado di supportare il medico nella selezione del paziente, la compilazione del consenso informato, la somministrazione dei questionari sintomatologici la raccolta dei campioni biologici e il continuo aggiornamento del database pazienti. Con l’inizio del 2017 abbiamo raggiunto il pieno regime di reclutamento e a tutt’oggi abbiamo reclutato 20 pazienti.

I sintomi gastrointestinali sono valutati utilizzando questionari sintomatologici quali il GSRS (Gastrointestinal Symptom Rating Scale). I campioni di sangue e le biopsie duodenali sono ottenuti nel corso della esofagogastroduodenoscopia. Per quanto riguarda l’esame istologico, quattro campioni sono sottoposti a valutazione istologica di routine, e due campioni sono coltivati a tempi e condizioni idonee per il dosaggio degli anticorpi anti-tTG nel terreno di coltura. Il prelievo ematico consentirà il dosaggio dei marcatori della celiachia e il test genetico per la celiachia, nonché eventuali dosaggi per la valutazione metabolica, lipidomica e il profilo dei peptidi gastrointestinali.

Progetto: “Valutazione dell’efficacia di *Lactobacillusparacasei* ceppo IMPC 2.1 somministrato con prodotti ittici pronti per l’uso in soggetti con stipsi funzionale” (Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile: Dr. Francesco Russo

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

Sono state effettuate prove di realizzazione di diverse tipologie di prodotto a base pesce contenente il ceppo probiotico *Lactobacillusparacasei* IMPC 2.1. L’obiettivo è stato quello di individuare tipologie di prodotto che possano fungere da carrier delle popolazioni del batterio e che abbiano una qualità sensoriale elevata e una adeguata compliance per un consumo previsto di circa 20 giorni in una dieta ordinaria.

Lo studio ha previsto una fase preliminare di valutazione della performance di crescita del ceppo mediante l’impiego di Bioscreen C. In particolare sono state ottenute le cinetiche di crescita del ceppo in substrato liquido mediante il metodo turbidimetrico (*Membré et al., 2002MatforskNorwegianFoodResearchInstitute, Lillehammer, Norway, pp. 143-146.*) al fine di individuare le condizioni ottimali di crescita. E’ stata realizzata una prima precoltura in MRS incubata a 37°C fino al raggiungimento della fase stazionaria monitorando la densità cellulare e conta in piastra su terreni selettivi e non selettivi. Il fattore k viene determinato applicando l’equazione $OD=k \times N$ con OD (660 nm) ed N (CFU/ml). In seguito alla valutazione del fattore k si è proceduto all’allestimento delle prove per la determinazione dei parametri di crescita relativi all’ottenimento di valori T_{min}, T_{max}, T_{opt} e μ_{max} , utilizzando il Bioscreen C L’analisi dei dati ha portato all’individuazione di un valore ottimale di temperatura di 35.55 ± 0.01 °C. Sono in corso prove volte all’individuazione dei parametri cinetici di pH e aw.

Tipologie di prodotto testate

- Filetto di pesce spada. Da prove precedenti questa tipologia di prodotto realizzato con una marinatura in presenza del ceppo probiotico, che ha dimostrato di avere anche caratteristiche pro-tecnologiche, risulta carrier idoneo al trasporto nell’intestino di adeguate popolazioni del ceppo - circa 1 miliardo di cellule vive per porzione di prodotto (circa 100 g) (*Valerio et al. Journal of Functionalfoods 2015; 17: 468–475*)
- Filetto di ombrina. Recentemente questo pesce, di elevata qualità sensoriale e nutrizionale è stato introdotto negli allevamenti. Pertanto la sua disponibilità sul mercato è notevolmente aumentata. Si è proceduto quindi alla realizzazione, con le stesse modalità di preparazione del filetto di spada, del filetto di ombrina marinato in presenza del ceppo probiotico. Anche questa tipologia è risultata carrier idoneo al trasporto delle cellule vive del probiotico.
- Burger di pesce. Sono state realizzate preparazioni di pesce fresco (ombrina e orata) biopreservati con popolazioni del ceppo probiotico. Il ceppo sopravvive ad elevate concentrazioni (circa 107 CFU/gr di prodotto) nel corso di tutta la shelf-life (7 gg). L’analisi del profilo REP delle colonie isolate dai vari campioni ha permesso di identificare e quantificare il ceppo inoculato (Figura 1). Durante tutta la shelf-life è stato visualizzato un unico profilo REP coincidente con il ceppo probiotico. Nel controllo, nessuna delle colonie analizzate ha presentato profilo REP simile al ceppo inoculato.

Per tutte le tipologie di prodotto la presenza del ceppo inoculato è stata monitorata mediante metodologie molecolari (*Sisto et al. Int J Food Microbiol 2009;136: 59–65; De Bellis et al. Int J Food Microbiol 2010; 140:6-13*). L’analisi degli amplificati è stata eseguita mediante elettroforesi

microfluidica su chip (Bioanalyzer2100, Agilent) utilizzando il kit DNA7500 per la visualizzazione dei profili REP-pcr e il software Expert2100 per l'analisi dei dati. L'analisi ha stabilito che il 100% delle colonie analizzate è stato identificato come *Lactobacillusparacasei*.

Al momento della redazione della presente relazione, i ricercatori sono ancora in attesa di un parere da parte del Comitato Etico circa la possibilità di iniziare il trial clinico. La richiesta è stata inoltrata a Ottobre 2016.

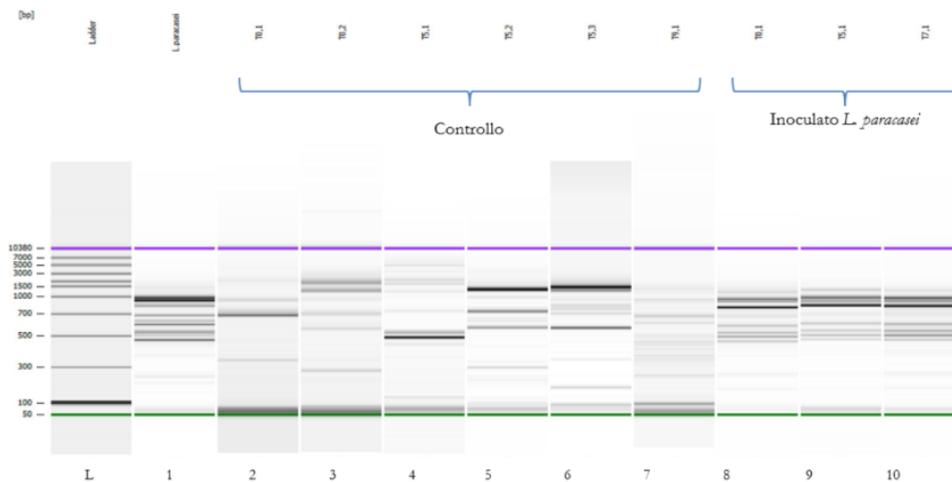


Figura 1. Profili REP delle colonie nei campioni.

UO di Anatomia ed Istologia Patologica

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

Le prestazioni comprendono:

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

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

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

Responsabile: Dott.ssa Maria L. Caruso

Partecipanti: Dott. Macello Chieppa (Contrattista), Dott.ssa Elisabetta Cavalcanti (Contrattista)

La stabilizzazione della linea Winnie e la creazione delle nuove linee murine (Winnie-TNF α -KO e Winnie-TNF α R1/R2-KO) ha dato ottimi risultati. La prima importante milestone del progetto è stata l'approvazione della sperimentazione animale (codice n°768/2015 –PR del 27/07/2015). La stabilizzazione della linea Winnie in un background C57/Bl6 puro ci ha permesso di caratterizzare questo modello all'interno del nostro stabulario. Abbiamo osservato il fenotipo, caratterizzato da feci meno solide e peso inferiore rispetto ai topi wild type. Abbiamo inoltre ottenuto informazioni sulla sopravvivenza ed all'aumento di peso a partire dalle 4 settimane di vita fino alle 16 settimane, considerate l'end point della sperimentazione. Nello specifico, i topi con mutazione puntiforme nel gene Muc2 allo svezzamento (4 settimane) hanno un peso corporeo minore se confrontati con topi wild-type (il 40% in meno circa), ma nel corso del tempo la differenza di peso tende a diminuire. Inoltre, tale fenotipo è specifico di topi omozigoti per la mutazione nel gene Muc2; difatti essa risulta essere assente in topi che presentano la stessa mutazione in eterozigosi. Per quanto concerne la sopravvivenza, i dati finora ottenuti ci permettono di affermare che le femmine Winnie, a partire dalle otto settimane di vita, presentano una riduzione più marcata della sopravvivenza rispetto ai maschi con mutazione nel gene Muc2. Alla luce delle considerazioni sopra descritte è stato possibile ottimizzare le strategie di breeding al fine di ottenere topi con mutazione del gene Muc2 in omozigosi. Difatti, per ovviare al problema dell'aumentata mortalità (riscontrata in particolare nelle femmine Winnie) e del peso corporeo ridotto in topi omozigoti per la mutazione nelle prime settimane di vita, si è passati ad utilizzare nelle coppie breeder topi che presentano la mutazione Muc2 in eterozigosi. Tale ottimizzazione nella strategia di breeding ci sta permettendo di stabilizzare definitivamente la linea murina Winnie che andrà a rappresentare la nostra piattaforma di studio del ruolo del TNF α nell'infiammazione intestinale cronica per i prossimi anni con conseguente caratterizzazione molecolare ed immunologica di questi nuovi ed esclusivi modelli murini. Attualmente è in corso la caratterizzazione dal punto di vista istologico della linea Winne alle 5, 12 e 16 settimane secondo le linee guida pubblicate dalla British Society of Gastroenterology (Jenkins D et al J. Clin Pathol. 1997 Feb;50(2):93-105).

In parallelo abbiamo cominciato la valutazione dei topi winnie alle 5 settimane. Per ogni genotipo, Wild type, Winnie, TNF-KO e Winnie-TNF-KO sono state raccolte le feci, da queste estratto il genoma batterico che è stato poi sequenziato. Analisi comparative sono attualmente in corso per valutare eventuali differenze nel microbiota di questi animali. Contemporaneamente gli stessi topi sono stati sacrificati, il colon è stato espianato per estrarne l'mRNA che è stato sequenziato mediante RNAseq. Siamo in attesa dei risultati di questa analisi per confermare ed espandere le nostre valutazioni preliminari effettuate mediante PCR quantitativa.

Infine, abbiamo raccolto il siero e ne abbiamo valutato il contenuto citochinico (mediante 23plex) per evidenziare eventuali biomarkers predittivi presenti a livello sistemico in topi geneticamente predisposti a sviluppare colite ulcerosa.

Riteniamo, nel prossimo anno, di poter identificare markers molecolari e/o metagenomici e/o sistemici in grado di discriminare topi predisposti a sviluppare colite ulcerosa da topi wild type. Tali target verranno poi valutati nei pazienti, in modo da poter contribuire alla diagnosi precoce dei pazienti predisposti a sviluppare UC.

UOC di Patologia Clinica

(le attività del Laboratorio sono descritte nella Linea 1, pag. 11)

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

Responsabile Dr. M. Correale (Patologia Clinica);

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

Attualmente per la cura delle IBD vengono utilizzati anticorpi monoclonali che si legano al TNF α , inibendone il legame con i suoi recettori, con conseguente riduzione della produzione di citochine infiammatorie. Di questi farmaci biologici il più adoperato finora è l'AbMo chimerico Infliximab (Remicade).

Lo scopo del presente progetto consiste nel valutare l'effetto del blocco del TNF α da parte dei farmaci biologici anti-TNF α sui livelli degli indicatori dell'insulino-resistenza, del metabolismo lipidico e dell'infiammazione. Il razionale dello studio si basa proprio sul ruolo che questa citochina svolge negli stati infiammatori e nella patogenesi dell'insulino-resistenza.

Il protocollo prevede l'accesso dei pazienti all'Ambulatorio delle IBD (U.O.C. di Gastroenterologia ed Endoscopia digestiva), nei giorni programmati per l'infusione ed in concomitanza con il monitoraggio della terapia, dove viene eseguito un prelievo venoso, a digiuno, prima della infusione della terapia biologica. Il prelievo è finalizzato al dosaggio di diversi parametri laboratoristici, tra i quali: glicemia, insulinemia, colesterolo, trigliceridi, ferro, ferritina, proteina C-reattiva, vitamina D, secondo metodiche già da tempo in uso nel nostro laboratorio e sottoposte a controlli di qualità. I dati finora ottenuti sono raccolti in un file excel dedicato (Vedi tabella allegata). Inoltre, sui campioni opportunamente congelati saranno effettuate anche la determinazione di una glicoproteina ad attività immunomodulante (90K/Mac-2BP) e di altre citochine infiammatorie.

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

Responsabile Dr. M. Correale (Patologia Clinica);

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

Ricorrendo alla seroteca raccolta a partire da ottobre 2014 presso il nostro laboratorio, abbiamo arruolato circa 300 soggetti sottoposti a più cicli di trattamento con farmaci anti-TNF alfa. In questi campioni abbiamo iniziato lo studio effettuando oltre 700 determinazioni dei livelli ematici del farmaco biologico anti-TNF e altrettanti dosaggi per evidenziare la presenza di eventuali anticorpi, con metodica ELISA. Inoltre, i dati ottenuti sono stati correlati con le relative valutazioni cliniche. A queste informazioni ci proponiamo di affiancare ulteriori biomarcatori in grado di migliorare le modalità di monitoraggio dell'andamento della malattia e la predittività alla risposta. In tal senso, è già in corso la determinazione di alcune citochine infiammatorie, come l'interleuchina 1 beta e, a breve, sarà effettuata anche la misurazione della vitamina D.

Il progetto, oltre a questa analisi retrospettiva, procede anche in modo prospettico, con l'arruolamento consecutivo dei nuovi soggetti trattati presso il nostro Ente.

La raccolta di tutti i dati sta avvenendo mediante uno specifico database, che comprende i dati clinici, i cicli e le modalità di trattamento, la risposta al trattamento, eventuali effetti collaterali ed i risultati di laboratorio ottenuti.

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

Responsabile: *Dott.ssa Iacovazzi Palma Aurelia*

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

Il progetto prevede lo studio di indicatori sierologici per la valutazione non invasiva delle gastriti croniche correlate e non all'infezione da *Helicobacter Pylori* (HP). Nell'ambito di tale progetto si prevede il reclutamento di almeno 50 pazienti, arruolati tra i soggetti afferenti al servizio di endoscopia del nostro Istituto, con diagnosi endoscopica di gastrite cronica, confermata con l'esame istologico delle biopsie. Gli indicatori da valutare sono la Grelina totale ed Acilata e il TNF α . La grelina è un interessante ormone peptidico coinvolto nella regolazione dello svuotamento gastrico e nella regolazione dell'appetito. Nel plasma esiste in due maggiori forme molecolari: la grelina acilata e la des-acil-grelina. Molto recentemente sembra che la forma acilata ha anche funzioni anti infiammatorie mediate dall'inibizione del rilascio dai linfociti T della citochina proinfiammatoria TNF α ("Functions of Ghrelin in brain, gut and liver". Stasi C, Milani S., CNS Neurol Disord Drug Targets, 2016). Tale osservazione supporta il nostro studio. Il TNF α plasmatico sembra invece correlare con la gravità dell'infezione da HP. I livelli di entrambi verranno confrontati con quelli dei pepsinogeni I e II, già comunemente utilizzati per la valutazione non invasiva delle gastriti. I pazienti verranno arruolati previo consenso informato. A tale riguardo si è provveduto a predisporre la modulistica richiesta, ancora al vaglio del comitato etico. A scopo preliminare, tuttavia, in collaborazione con la **dott.ssa Panarese** del Servizio di Endoscopia digestiva del nostro Istituto sono stati recuperati i campioni di siero di pazienti ricoverati nei reparti di Gastroenterologia1 e Gastroenterologia2 del nostro Istituto che presentano un esame endoscopico positivo per la gastrite cronica. Attualmente abbiamo aliquotato e congelato a -80°C i campioni di siero di 14 pazienti. A tutt'oggi stiamo proseguendo l'arruolamento preliminare dei pazienti interni in attesa di poter iniziare il reclutamento vero e proprio secondo le modalità previste dallo studio.

UOC di Gastroenterologia ed Endoscopia Digestiva

(le attività sono descritte nella Linea 1, pag. 11)

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

Responsabile: *Dott.ssa Alba Panarese*

Partecipanti: *Dott. Alberto R. Osella, Dott.ssa Iacovazzi Palma Aurelia, Dott. Riezzo Giuseppe*

I soggetti con STC presentano un quadro addominale caratterizzato da globosità e distensione addominale, dovuto all'aumentato volume di contenuto e gas intestinali. Questa condizione fisica determina variazione della tipologia di alimenti ingeriti e della funzione intestinale. Inoltre, si determina anche contaminazione batterica intestinale. I soggetti con STC lamentano astenia, spossatezza, dolorabilità articolare.

Il nostro studio arruola soggetti con STC che abbiano manifestato, nel corso del tempo (anni o mesi, se la stipsi ha insorgenza più recente), una stazionarietà del disturbo o, più spesso, un decorso ingravescente.

In questi soggetti viene dosata la vitamina D. Essi non presentano condizioni note che producano riduzione dei livelli plasmatici della vitamina D (patologie endocrino-metaboliche, renali, cardiovascolari, etc).

Nel 2016 il nostro centro ha arruolato 30 soggetti con STC, in cui è stato effettuato il dosaggio di vitamina D.

Il valore medio del dosaggio di vitamina D è stato di 16,04 ng/ml. Il gruppo di soggetti con STC è costituito quasi esclusivamente da donne. Infatti, vi sono solo due uomini. L'età media è di 47,3 anni (tab 1).

Il valore medio del dosaggio di vitamina D nel gruppo controllo è stato di 24,92 ng/ml. Il gruppo controllo è risultato omogeneo per sesso ed età al gruppo con STC ed è costituito da soggetti sani afferiti al nostro centro per screening (tab 2).

STC	Dosaggio vitamina D (ng/ml) (v.r. 30-100 ng/ml)
F 40 aa	4.7
F 27 aa	12.3
F 55 aa	28.9
F 21 aa	5.6
F 20 aa	10.0
F 23 aa	12.4
F 57 aa	14.2
F 62 aa	10.5
F 54 aa	6.4
F 40 aa	11
F 48 aa	9.1
F 70 aa	16.2
F 72 aa	5.2
F 35 aa	9.1
F 39 aa	18.4
F 59 aa	16.9
F 81 aa	16
F 53 aa	16.6
F 50 aa	8.2
F 82 aa	7.7
F 48 aa	11.2
F 46 aa	4.4
F 31 aa LF	6.4
M 36 aa MA	7,1
M 20 aa SA	4
F 62 aa MG	6.6
F 49 aa CC	21
F 53 aa PM	16
F 42 aa SA	7,2
F 44 aa VC	34

Tab 1. Dosaggio di vitamina D nei soggetti con STC.

CONTROLLI	Dosaggio vitamina D (ng/ml) (v.r. 30-100 ng/ml)	CONTROLLI	Dosaggio vitamina D (ng/ml) (v.r. 30-100 ng/ml)
1	17,2	31	48,1
2	13,3	32	34,9
3	15,2	33	30,2
4	22,7	34	25

5	18,7	35	18,1
6	21,3	36	15,8
7	18,2	37	32,8
8	15,1	38	32,1
9	16,6	39	16,6
10	10	40	20,5
11	24,6	41	7,78
12	9,02	42	20,3
13	21,7	43	24,2
14	18,7	44	29,4
15	43,3	45	30,7
16	25	46	12,1
17	40,8	47	12,4
18	12,7	48	41
19	45,1	49	34,9
20	11,1	50	32,1
21	17,6	51	17,9
22	25,4	52	35,8
23	26,3	53	34,2
24	36,6	54	35,4
25	23,3	55	45,2
26	29,8	56	14,8
27	46,1	57	31,3
28	25,8	58	30,6
29	19,6	59	22,5
30	13,1		

Tab 2. Dosaggio di vitamina D nei controlli

I soggetti con STC sono stati suddivisi in 3 gruppi considerando che il transito sia rallentato fino al cieco, nel colon o globalmente rallentato per tutto il tratto oro-cecale. Dei soggetti in studio (con STC e controlli) sono stati valutati l'indice di massa corporea, la scolarità e le abitudini alimentari. Il gruppo dei soggetti con STC ha incluso i soggetti con CIPO. Questi ultimi hanno presentato i valori di vitamina D più bassi.

I dati, raccolti in schede informative individuali dei casi studiati, verranno analizzati alla chiusura dello studio che si prevede avverrà entro la fine del 2017.

Il protocollo è stato registrato in ClinicalTrials.gov PRS.

U.O.S. Microbiologia e Virologia

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

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

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

Responsabile: Dott. Antonio Lippolis

Partecipanti: Dott. Russo Francesco (Fisiopatologia della Nutrizione) , Dott.ssa Stasi Elisa (Endoscopia digestiva), Dott. Trisolini Piero (Farmacia), Dott.ssa Palmitessa Valeria (borsista)

Scopo della ricerca è quello di mettere a punto:

1. tecniche di isolamento tradizionale di ceppi di *H. pylori* isolati da pazienti con diverse patologie gastriche a carattere infettivo;
2. 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;
3. Caratterizzare dal punto di vista molecolare le resistenze agli antibiotici, nonché la diffusione di ceppi di *H. pylori* esprimenti il gene *cag A*, i quali sono associati a patologie gastriche più gravi come ulcera peptica e carcinoma gastrico.

Sono stati raccolti i dati anamnestici e messe in coltura le biopsie gastriche dei primi 50 pazienti. Hanno dato esito positivo allo screening colturale una percentuale di biopsie pari al 20%. I ceppi isolati sono stati sottoposti a test biochimici di identificazione e sottocolturali al fine di sottoporli ai test di sensibilità agli antibiotici utilizzati nelle terapie di primo e secondo intervento indicate dal Maastricht Consensus Report. I ceppi di *H. Pylori* isolati ed identificati sono stati sottoposti a procedure di conservazione (stoccati in glicerolo e conservati alla temperatura di -80°C) al fine di renderli disponibili alle successive indagini biomolecolari. I test di biologia molecolare che verranno utilizzati sono stati scelti al fine di individuare la presenza sia delle tre mutazioni del DNA più frequentemente rilevate come le responsabili dei fenomeni di antibiotico-resistenza in *H. Pylori*, sia di altre mutazioni che recentemente da un punto di vista epidemiologico stanno assumendo sempre maggiore importanza.

LINEA 4 NUTRIZIONE

Per la linea di ricerca su “Nutrizione”, i principali risultati dai singoli Laboratori per l’anno 2016 sono i seguenti:

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica

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

I principali interessi di ricerca del Laboratorio sono:

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

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

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

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

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

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

Sono stati formati quattro gruppi di reclutamento nelle seguenti date:

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

Il trattamento è terminato nelle seguenti date

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

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

Prima di iniziare i programmi di lavoro, per tutti i soggetti reclutati, è stato valutato lo stato di forma(T₀) e il livello di fitness attraverso dei test effettuati su strada (walking test) e all’interno

della palestra (push up test e sit and reach test) che saranno ripetuti al 45°giorno(T_1) e al 90°giorno (T_2) .

Tablelle riassuntive:

Distribuzione del campione per sesso ed età

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

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

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

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

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

Distribuzione del campione per bracci di trattamento e tempo di osservazione

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

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

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

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

Responsabile: Dott. Alberto R. Osella

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

La coorte MICOL (Castellana Grotte) è stata assemblata nel 1985 ed era costituita da 2472 soggetti. La coorte è stata oggetto di studio nel 1992 e nel 2005, anno in occasione del quale è stato effettuato un nuovo campionamento della popolazione per sopperire all’invecchiamento della coorte. Infine, tra il 2013 ed il 2014 sono stati ulteriormente reclutati i soggetti aventi un’età uguale o superiore a 65 anni. Per il completamento di questo terzo follow-up, quindi, si rende necessario contattare ancora all’incirca 1800 soggetti.

Il richiamo per la quarta volta del progetto Micol (di età > 65 anni) ha previsto una fase iniziale di creazione dei file operativi per lo svolgimento dello studio: foglio informativo, consenso informato,

lettera da inviare ai medici di famiglia, lettera di invito dei soggetti facenti parte del campione, predisposizione della routine ematica, questionario di anamnesi.

Lo stile di vita (dieta) è misurato con Food-frequency Questionnaire sviluppato dal Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica dell'IRCCS Saverio de Bellis e che è stato usato in molti studi epidemiologici condotti dal Laboratorio. La misurazione dell'attività fisica tramite il questionario internazionale per l'attività fisica (IPAQ), nella sua forma lunga e versione italiana.

Il follow-up dei soggetti appartenenti alla coorte Micol under 65 anni ha cominciato la sua fase operativa il 15 Febbraio 2016 e sono stati arruolati 55 soggetti a tutt'oggi.

Laboratorio di Biochimica Nutrizionale

(le attività del Laboratorio sono descritte nella Linea 1, pag. 9)

Progetto: “Studio dei meccanismi di inibizione e “reversione” degli Acidi Grassi Polinsaturi omega-3 (n-3-PUFA) sulla crescita dei polipi intestinali in topi APC Min/+” (Scadenza: 31/12/2016)

Responsabile scientifico: Dott.ssa Maria Notarnicola

Personale coinvolto: dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott.ssa Valeria Tutino (biologa contrattista), dott.ssa Angela Tafaro (biologa contrattista), dott.ssa Giusy Bianco (medico veterinario), sig. Vito Spilotro (tecnico stabularista)

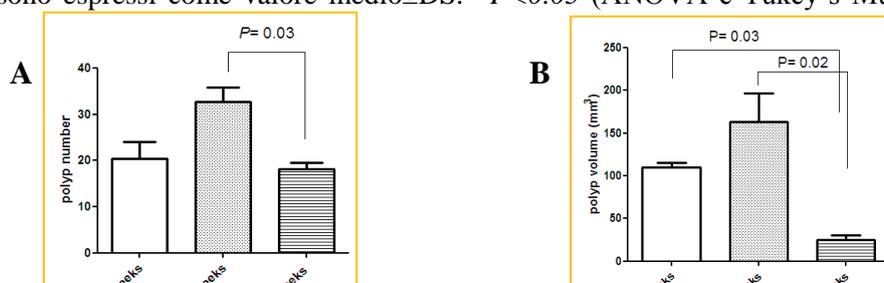
Il progetto, concluso a dicembre 2016, sostiene l'ipotesi che una dieta arricchita di n-3-PUFA sia in grado di invertire il processo di sviluppo dei polipi intestinali attraverso la regolazione dell'espressione di geni coinvolti nel processo di carcinogenesi. Nostri studi precedenti sull'attività anti-proliferativa dei n-3-PUFA in modelli *in vitro* e *in vivo* hanno mostrato come questi acidi grassi polinsaturi della serie omega-3 siano in grado di inibire e/o attivare geni o meccanismi enzimatici coinvolti nel processo proliferativo e apoptotico.

Al fine di confermare gli effetti anti-proliferativi di una dieta supplementata con n-3-PUFA e per valutare la possibilità che i n-3-PUFA siano in grado di invertire il processo di formazione dei polipi nel modello animale, sono stati allestiti i seguenti gruppi di trattamento:

Gruppi	Topi APC ^{Min/+}	Dieta e Durata del Trattamento
Gruppo A	10	Dieta Standard per 5 settimane
Gruppo B	10	Dieta Standard per 10 settimane
Gruppo C	10	Dieta Standard per 5 settimane, seguita da Dieta ricca di n-3-PUFA per altre 5 settimane

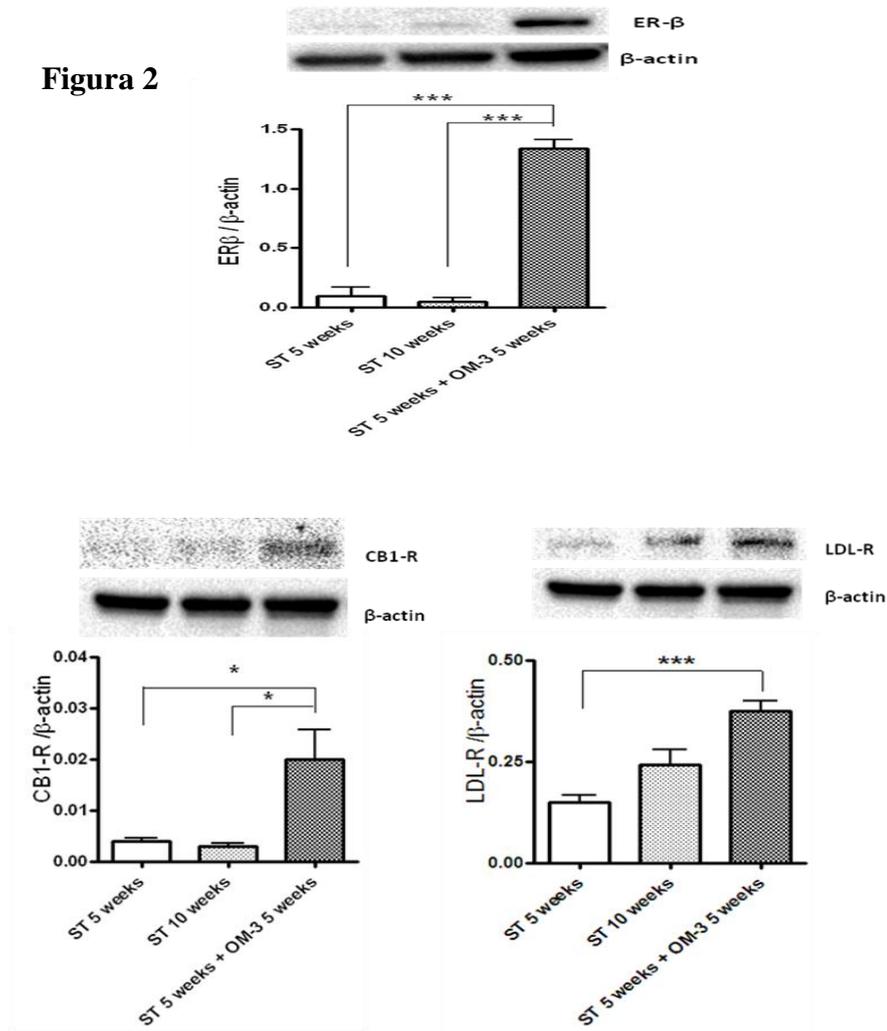
Tutti gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale e l'intero tratto intestinale è stato analizzato per la valutazione del numero e del volume dei polipi.

La Figura 1 mostra il numero (A) e volume totale (B) dei polipi trovati nell'intero tratto intestinale dei topi Apc^{Min/+} trattati con Dieta Standard per 5 settimane (ST 5 weeks), Dieta Standard per 10 settimane (ST 10 weeks), Dieta Standard per 5 settimane + Dieta ricca di omega-3 per altre 5 settimane (ST 5 weeks + OM-3 5 weeks). I dati sono espressi come valore medio±DS. *P<0.05 (ANOVA e Tukey's Multiple Comparison Test)



Questa prima osservazione dimostra che il trattamento dietetico con omega-3 nel topo sia in grado di invertire il processo proliferativo dei polipi intestinali. Pertanto, al fine di comprendere i meccanismi molecolari che sostengono la capacità degli omega-3 di invertire il processo neoplastico, abbiamo studiato l'espressione di geni e proteine coinvolte sia nel processo proliferativo che apoptotico.

Lo studio genico e proteico ha dimostrato che la riduzione del numero e del volume dei polipi osservata nell'intestino dei topi trattati con dieta ST + OM3 non è legata a meccanismi apoptotici, dal momento che non ci sono variazioni nei livelli di espressione delle proteine Bax e Bcl-2; al contrario, è stata dimostrata una significativa induzione dell'espressione di recettori cellulari che modulano negativamente la proliferazione cellulare, come il recettore ER β , il recettore degli endocannabinoidi CB1 e il recettore delle LDL (Figura 2).



Questi dati sono parte integrante di un lavoro scientifico pubblicato sulla rivista *Oncology Reports*:

Progetto: “Studio in vivo e in vitro dei fattori che regolano l’attività degli enzimi lipogenici e del sistema endocannabinoide nel tessuto adiposo” (Termine del progetto: 31/12/2016)

Responsabile scientifico: Dott.ssa Maria Notarnicola

Personale coinvolto: dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott. Francesco Russo, dott.ssa Valeria Tutino (biologa contrattista), dott.ssa Antonella Orlando (biologa contrattista)

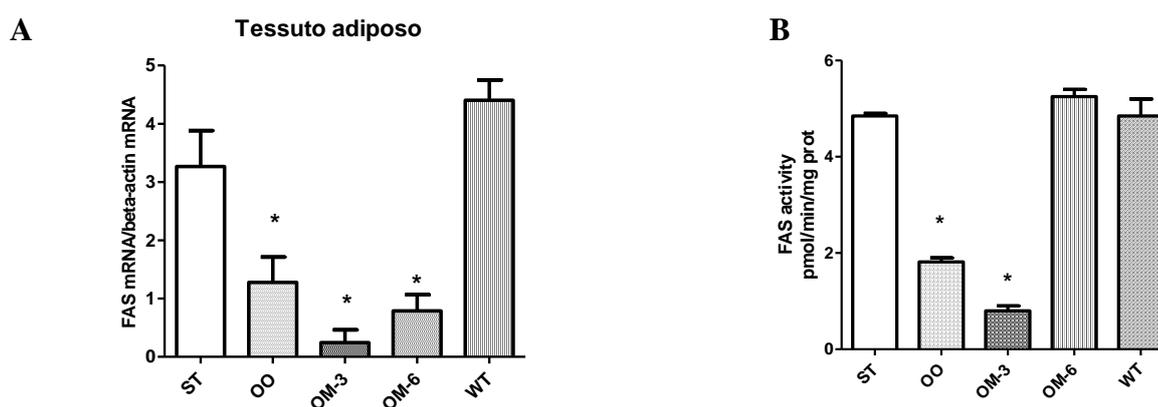
Il progetto, concluso a dicembre 2016, si proponeva di acquisire informazioni sugli effetti degli acidi grassi polinsaturi (omega-3 e omega-6) e dell’olio d’oliva sull’attività metabolica dei lipidi e sul sistema endocannabinoide in un modello animale e in colture di adipociti. Sia nel tessuto adiposo dei topi $Apc^{Min/+}$ che negli adipociti in coltura sono stati valutati i livelli di espressione genica e di attività enzimatica di LPL e della FAS e di recettori come il CB1-R, noto avere un tono inibitorio sulla crescita e proliferazione cellulare e il PPAR gamma, che è un marker di differenziazione delle cellule del tessuto adiposo.

Studio in vivo

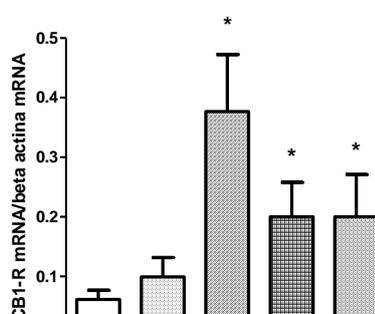
Tutte le analisi biochimiche e di espressione genica previste dal progetto sono state effettuate su campioni di tessuto adiposo già stoccati a -80°C . Il tessuto adiposo viscerale è stato prelevato da topi $Apc^{Min/+}$ trattati per 10 settimane con diete isocaloriche descritte nella seguente tabella:

Gruppi	N° topi	Dieta
1) Controllo	10	• Dieta standard
2) Olio d’oliva	10	• Dieta Standard con il 12% di olio d’oliva
3) OM-3	10	• Dieta Standard con il 12% di n-3 PUFAs
4) OM-6	10	• Dieta Standard con il 12% di n-6 PUFAs

La **Figura 1** mostra i livelli di mRNA e di attività dell’enzima FAS (A) e di LPL (B) nel tessuto adiposo dei topi trattati. $*P < 0.05$ (ANOVA e Tukey’s Multiple Comparison Test); WT= topo wilde type



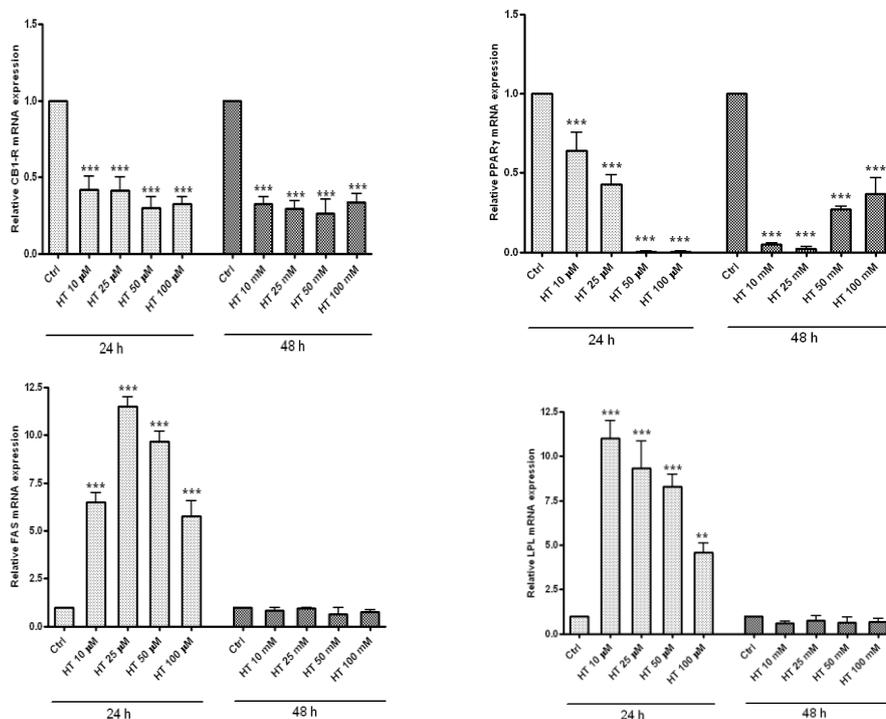
La **Figura 2** mostra i livelli di espressione del gene CB1-R nel tessuto adiposo dei topi trattati. $*P < 0.05$ (ANOVA e Tukey’s Multiple Comparison Test)



Questi risultati dimostrano come i PUFAs, soprattutto gli omega-3, siano in grado di ridurre l'espressione e l'attività degli enzimi lipogenici e di indurre il recettore degli endocannabinoidi.

Studio in vitro

Al fine di studiare i meccanismi cellulari e molecolari che sostengono gli effetti biologici dei PUFAs e dell'olio d'oliva, sono state allestite colture di pre-adipociti, trattate con concentrazioni crescenti di idrossitirosole, componente fenolico dell'olio d'oliva, di acido α -Linolenico e acido Linoleico (acidi grassi capostipiti della famiglia degli omega-3 e omega-6, rispettivamente). In queste cellule trattate abbiamo valutato la risposta proliferativa e i livelli di mRNA del recettore CB1, del PPARgamma, di FAS e LPL. I grafici di seguito riportati mostrano i risultati relativi ai livelli di espressione genica ottenuti dopo trattamento dei pre-adipociti con concentrazioni crescenti di idrossitirosole.



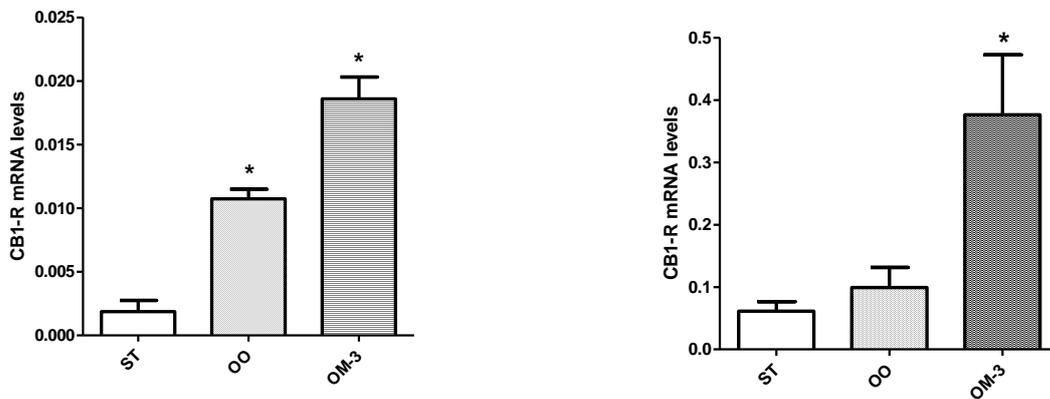
Progetto: “Analisi del profilo degli acidi grassi e dell’espressione dei recettori CB1e CB2 in campioni ematici di pazienti operati per cancro del colon-retto con e senza metastasi sincrone”
(Termine del progetto: 31/12/2018)

Responsabile scientifico: Dott.ssa Maria Notarnicola

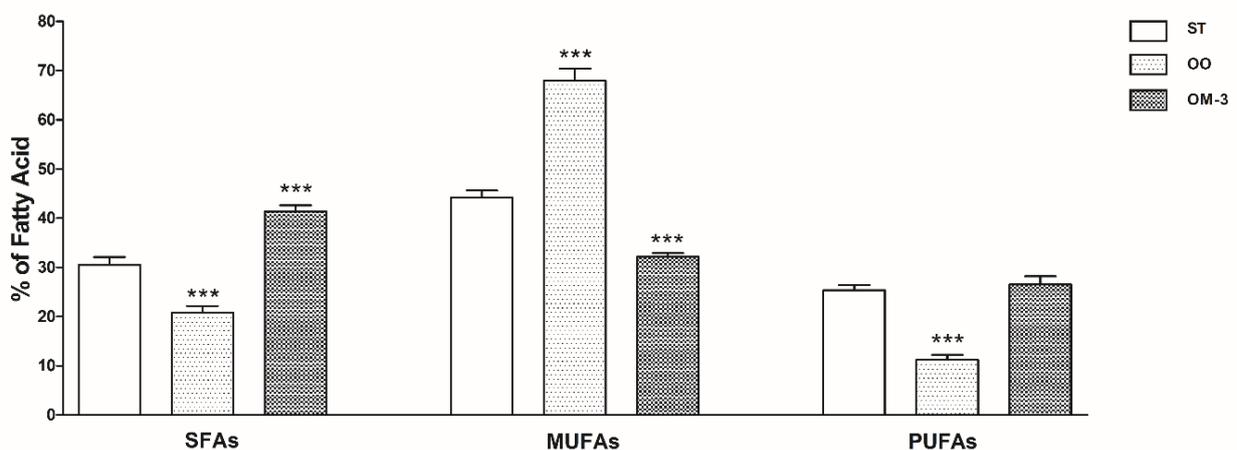
Personale coinvolto: dott. Dionigi Lorusso (direttore UOC di Chirurgia), dott.ssa Maria Gabriella Caruso, dott.ssa Valeria Tutino (biologa contrattista), sig. Giampiero De Leonardis (perito chimico, borsista), sig.na Valentina De Nunzio (perito chimico, borsista), sig.na Gisella Marascelli (operatore sanitario borsista)

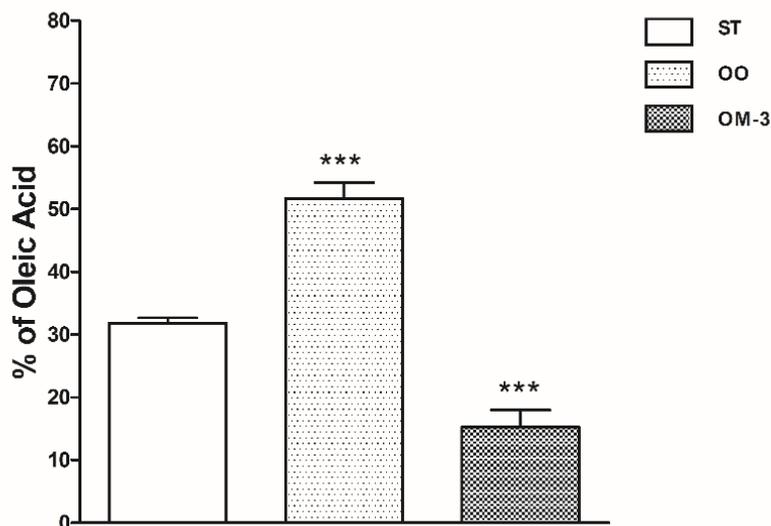
L'idea di base del progetto è ottenere profili "metabolici," in grado di individuare e raggruppare soggetti che hanno sviluppato una neoplasia del colon-retto con o senza presenza di metastasi al momento dell'intervento chirurgico. Da questi profili sarà successivamente possibile individuare, nel follow-up di questi pazienti, deficit, carenze o componenti nutrizionali associate alla comparsa di eventuali recidive. La valutazione della composizione degli acidi grassi contenuti nella membrana eritrocitaria associata allo studio dei recettori degli endocannabinoidi nei tessuti degli stessi pazienti sarà in grado di fornire informazioni sullo loro stato nutrizionale ed infiammatorio che consentiranno di progettare formulazioni nutraceutiche protettive.

Nel corso del 2016 sono state messe a punto le metodologie di gas cromatografia applicate al dosaggio degli acidi grassi e dei recettori nei tessuti. A tale scopo abbiamo utilizzato campioni di tessuto adiposo e intestinale di animali di laboratorio trattati con diete modificate e di pazienti operati per carcinoma coloretale nel nostro Istituto. I grafici mostrano i livelli di espressione genica e proteica del recettore CB1 nei tessuti murini di topi trattati con dieta standard (ST), con olio d'oliva (OO) e PUFAs omega-3 (OM-3) e nei campioni di mucosa e tumore di pazienti con carcinoma coloretale.



Bassi livelli di recettore CB1 sono stati osservati nel tumore umano del colon. Nei topi APCMin/+ il trattamento con omega-3 PUFAs induceva a livello tissutale il recettore, giustificando il ruolo degli acidi grassi omega-3 nel contrastare la trasformazione neoplastica intestinale. Inoltre, abbiamo dosato il profilo lipidomico intestinale dei topi trattati con olio d'oliva e degli acidi grassi omega-3.





I risultati dimostrano che il profilo lipidomico di membrana dei topi ApcMin/+ viene modulato diversamente dall'olio d'oliva e dagli acidi grassi omega-3. Differenze statisticamente significative si osservano soprattutto nei livelli di acido oleico.

Laboratorio di Biologia Cellulare e Molecolare

(le attività del Laboratorio sono descritte nella Linea 1, pag. 2)

Progetto: "Biodisponibilità dei microRNA (miRNA) di carciofo e azione dei suoi polifenoli sull'espressione dei microRNA umani. Studio *in vitro*" (Termine del progetto: 31/12/2016).

Responsabile: Dott. Aldo Cavallini

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

L'influenza dei miRNA vegetali sull'organismo umano è stato descritto per la prima volta da un gruppo di ricercatori cinesi nel 2012 (Cell Res 2012; 22: 107-126). Lo stesso gruppo aveva anche dimostrato che alcuni miRNA di riso erano in grado di modificare l'assorbimento del colesterolo nelle cellule epatiche di topo. Poiché studi più recenti hanno messo in dubbio questa possibilità, il nostro primo obiettivo è stato quello di valutare la resistenza dei miRNA vegetali ai fluidi digestivi umani prima di poterne valutare un loro possibile effetto sulle cellule umane. Come vegetale è stato considerato il carciofo, per il suo largo consumo nella popolazione pugliese, e come processo digestivo sarebbe stato utilizzato un modello *in vitro*, che mimava quello umano, già descritto in un precedente lavoro da un gruppo di ricerca dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA-CNR) di Bari (J Funct Foods 2014; 10: 456-464), partner del progetto.

Dei 60 miRNA (cca-miRNA) recentemente scoperti mediante microarray nel carciofo, ne abbiamo selezionati 30 e precisamente quelli che avevano mostrato livelli più alti. Porzioni del capolino del carciofo, parte edibile di esso, sono stati sottoposti al processo digestivo *in vitro* che consisteva di due fasi: fase salivare-gastrica e successiva fase di digestione intestinale. Dal fluido digestivo salivare-gastrico e da quello intestinale è stato estratto l'RNA totale e successivamente analizzato mediante RT-qPCR ed opportuni primer i 30 miRNA selezionati. Dopo la fase salivare-gastrica 13 dei 30 miRNA erano ancora presenti, mentre dopo la fase di digestione intestinale venivano rilevati solo 4 dei 30 miRNA. Si è proceduto successivamente a valutare la bio-disponibilità dei 4 miRNA mediante un sistema *in vitro* utilizzando la linea cellulare umana Caco-2. I risultati ottenuti, in fase di elaborazione, hanno evidenziato che i miRNA vegetali non sono assorbiti dalle cellule umane. Pertanto, l'effetto sul nostro organismo da parte dei vegetali, in particolare del carciofo, è imputabile principalmente al loro contenuto in polifenoli, come più volte descritto in letteratura. A

tal proposito si è passati a valutare gli effetti di alcuni polifenoli del carciofo su linee cellulari umane di epatocarcinoma trattate e con il Regorafenib come terapia adiuvante. Fra i vari polifenoli contenuti nella pianta, si è considerato l'acido clorogenico (CGA) sulla base di precedenti esperimenti che ne evidenziavano l'alto contenuto nel capolino della pianta e la sua alta biodisponibilità. I primi risultati, su linee cellulari di epatocarcinoma, hanno permesso di stabilire che il CGA in combinazione con il Regorafenib sembra potenziare gli effetti di quest'ultimo consentendo così un uso del farmaco a più basse concentrazioni.

Ambulatorio di Nutrizione clinica

Progetto: “Effetti di una dieta latte ovo vegetariana arricchita in omega tre sul profilo lipidomico in donne in postmenopausa”(Scadenza: 31/05/2017)

Responsabile: Dott.ssa Maria Gabriella Caruso

Partecipanti: dott.ssa O. Rotolo, biotecnologa borsista (fondi regionali) Amb. Nutrizione Clinica, dott.ssa I. Zinzi, dietista borsista (fondi regionali) Amb. Nutrizione Clinica, dott.ssa M. Notarnicola, dirigente biologa, Lab. di biochimica nutrizionale, dott.ssa V. Tutino, biologa contrattista, Lab. di biochimica nutrizionale, sig. V. De Nunzio, perito chimico borsista, Lab. di biochimica nutrizionale, sig. G. De Leonardis, perito chimico borsista, Lab. di biochimica nutrizionale

Obiettivo di questo studio è quello di valutare gli effetti di una dieta latte ovo vegetariana arricchita con omega tre (DIETA L ω VE) rispetto ad una dieta latte ovo vegetariana tradizionale (DIETA LoVE) sul profilo lipidico, glucidico, parametri antropometrici e bioimpedenziometrici, nonché il profilo lipidomico delle membrane dei globuli rossi in donne in menopausa afferenti al nostro ambulatorio di nutrizione clinica. Inoltre nello stesso gruppo di soggetti saranno valutati parametri biochimici dello stato ossidativo ed infiammatorio e studiate le variazioni dei comuni disturbi vasomotori correlati alla menopausa. Ad oggi sono state arruolate 32 donne e l'arruolamento si intende concluso al raggiungimento di 42 donne.

I dati preliminari di tale studio (vedi tabella sottostante) hanno prodotto un abstract che è stato presentato al convegno ADI 2016, e pubblicato sulla rivista “ADI Magazine” Rivista Scientifica dell'Associazione Italiana di Dietetica e Nutrizione Clinica, n° 3, settembre 2016. Gli stessi dati sono oggetto di tesi di laurea specialistica (anno 2017) in Nutrizione Umana di un tesista frequentante l'ambulatorio.

I dati sono espressi come media \pm DS (n.° soggetti 10, età 54 \pm 6 anni)

	DIETA L ω VE T0	DIETA L ω VE T4	p \leq 0.05	DIETA LoVE T0	DIETA LoVE T4	p \leq 0.05
Peso corporeo (Kg)	82.3 \pm 13	75.6 \pm 12	0.03	70.9 \pm 11	64.0 \pm 8.7	0.03
Indice Massa Corporeo	30.6 \pm 4.5	28.2 \pm 3.9	0.03	28.1 \pm 3.5	25.4 \pm 2.8	0.03
Circ. Vita (cm)	95.7 \pm 12	86.6 \pm 8.6	0.03	95.0 \pm 11	86.4 \pm 8.8	0.03
Massa Grassa (kg)	31.4 \pm 9.3	24.5 \pm 7.3	0.03	24.6 \pm 6	19.1 \pm 4.8	0.03
Massa Magra (kg)	50.9 \pm 4.6	51.3 \pm 4.5	ns	46.1 \pm 5	44.9 \pm 4.2	ns
Col.Tot (mg/dl)	199.0 \pm 35	203.8 \pm 33	ns	218.4 \pm 45	194.4 \pm 49	ns
Trigliceridi (mg/dl)	115.6 \pm 33	104.2 \pm 55	ns	148.4 \pm 13	135.8 \pm 45	ns
HDLCol (mg/dl)	48.9 \pm 9.5	43.7 \pm 6.4	ns	45.4 \pm 15	53.8 \pm 16**	0.03
Col tot/HDL col	4.2 \pm 0.9	4.7 \pm 0.5	ns	5.2 \pm 1.7	3.7 \pm 0.5	0.03
Glicemia (mg/dl)	95.8 \pm 4.6	91.1 \pm 5.4	0.03	89.2 \pm 7.2	85.8 \pm 1.5	ns
Insulina (mg/dl)	9.4 \pm 4.7	5.3 \pm 3.05	0.03	8.6 \pm 4.8	4.6 \pm 0.7	0.06

**Mann-Whitney test p= 0.009

Elenco Pubblicazioni anno 2016

LINEA 1

Malattie neoplastiche del fegato e del tubo digerente: modelli sperimentali in ambito gastroenterologico

1. Carr, Brian I.; Guerra, Vito. A Hepatocellular Carcinoma Aggressiveness Index and Its Relationship to Liver Enzyme Levels. In: *Oncology*, 15.03.2016, p. 37-42.
2. Orlando, Antonella; Linsalata, Michele; Russo, Francesco. Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Journal of Oncology*, Vol. 48, No. 6, 2016, p. 2629-2638.
3. Gion, Massimo; Trevisiol, Chiara; Rutjes, Anne W S; Rainato, Giulia; Fabricio, Aline S C. Circulating tumor markers: a guide to their appropriate clinical use | Comparative summary of recommendations from clinical practice guidelines (PART 1). In: *International Journal of Biological Markers*, Vol. 31, No. 4, 23.12.2016, p. e332-e367.
4. Blondel, S.; Egesipe, A. L.; Picardi, P.; Jaskowiak, A. L.; Notarnicola, M.; Ragot, J.; Tournois, J.; Le Corf, A.; Brinon, B.; Poydenot, P.; Georges, P.; Navarro, C.; Pitrez, P. R.; Ferreira, L.; Bollo, G.; Bauvais, C.; Laustriat, D.; Mejat, A.; De Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N.; Bifulco, M.; Peschanski, M.; Nissan, X. Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. In: *Cell Death and Disease*, Vol. 7, No. 2, e2105, 2016.
5. Azzariti, Amalia; Mancarella, Serena; Porcelli, Letizia; Quatrone, Anna Elisa; Caligiuri, Alessandra; Lupo, Luigi; Dituri, Francesco; Giannelli, Gianluigi. Hepatic stellate cells induce hepatocellular carcinoma cell resistance to sorafenib through the laminin-332/ α 3 integrin axis recovery of focal adhesion kinase ubiquitination. In: *Hepatology*, Vol. 64, No. 6, 12.2016, p. 2103-2117.
6. Carr, Brian I.; Guerra, Vito. Hepatocellular Carcinoma Extrahepatic Metastasis in Relation to Tumor Size and Alkaline Phosphatase Levels. In: *Oncology*, 12.02.2016.
7. Shah, Rajal B.; Leandro, Gioacchino; Romerocaces, Gloria; Bentley, James; Yoon, Jiyoung; Mendrinos, Savvas; Tadros, Yousef; Tian, Wei; Lash, Richard. Improvement of diagnostic agreement among pathologists in resolving an "atypical glands suspicious for cancer" diagnosis in prostate biopsies using a novel "Disease-Focused Diagnostic Review" quality improvement process. In: *Human Pathology*, Vol. 56, 01.10.2016, p. 155-162.
8. Notarnicola, Maria; Barone, Michele; Francavilla, Antonio; Tutino, Valeria; Bianco, Giusy; Tafaro, Angela; Minoia, Mario; Polimeno, Lorenzo; Napoli, Anna; Scavo, Maria Principia; Caruso, Maria Gabriella. Lovastatin, but not orlistat, reduces intestinal polyp volume in an *ApcMin/+* mouse model. In: *Oncology Reports*, Vol. 36, No. 2, 01.08.2016, p. 893-899.
9. Carr, Brian I.; Guerra, Vito. Low Alpha-Fetoprotein Levels Are Associated with Improved Survival in Hepatocellular Carcinoma Patients with Portal Vein Thrombosis. In: *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 61, No. 3, 01.03.2016, p. 937-947.
10. Notarnicola, Maria; Tutino, Valeria; Caruso, Maria Gabriella; Francavilla, Antonio. N-3 polyunsaturated fatty acids reverse the development of polyps in *ApcMin/+* transgenic mice. In: *Oncology Reports*, Vol. 35, No. 1, 01.01.2016, p. 504-510.
11. Pinto, Carmine; Di Fabio, Francesca; Rosati, G.; Lolli, Ivan; Ruggeri, Enzo Maria; Ciuffreda, Libero; Ferrari, Daris; Lo Re, Giovanni; Rosti, G.; Tralongo, Paolo; Ferrara, Raimondo; Alabiso, Oscar; Chiara, Silvana; Ianniello, G.; Frassoldati, A.; Bilancia, D.; Campanella, Giovanna; Signorelli, Carlo; Racca, Patrizia; Benincasa, Elena; Stroppolo, Maria Elena; Di Costanzo, Francesco. Observational study on quality of life, safety, and

effectiveness of first-line cetuximab plus chemotherapy in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer patients : The ObservEr Study. In: Cancer Medicine, 2016.

LINEA 2

Malattie epatiche, delle vie biliari e pancreatiche non neoplastiche

12. Ascione, Antonio; Adinolfi, L.; Amoroso, Pietro; Andriulli, Angelo; Armignacco, Orlando; Ascione, T.; Babudieri, Sergio; Barbarini, Giorgio; Brogna, Michele; Cesario, Francesco; Citro, Valentina; Claar, Ernesto; Cozzolongo, Raffaele; D'Adamo, Giuseppe; D'amico, Emilio; Dattolo, Pellegrino; De Luca, Massimo; De Maria, Vincenzo; De Siena, Massimo; De Vita, G.; Di Giacomo, Antonio; De Marco, Rosanna; De Stefano, G.; De Stefano, Giulio; Di Salvo, Sebastiano; Di Sarno, Raffaele; Farella, Nunzia; Felicioni, Laura; Fimiani, Basilio; Fontanella, Luca; Foti, Giuseppe; Furlan, Caterina; Giancotti, Francesca; Giolitto, Giancarlo; Gravina, Tiziana; Guerrera, Barbara; Gulminetti, Roberto; Iacobellis, A.; Imperato, M.; Iodice, Angelo; Iovinella, V.; Izzi, Antonio; Liberti, Alfonso; Leo, Pietro; Lettieri, Gennaro; Luppino, Ileana; Marrone, Aldo; Mazzoni, Ettore; Messina, V.; Monarca, R.; Narciso, Vincenzo; Nosotti, Lorenzo; Pellicelli, Adriano M.; Perrella, Alessandro; Piai, G.; Picardi, Antonio; Pierri, Paola; Pietromatera, G.; Resta, F.; Rinaldi, Luca; Romano, Mario; Rossini, Angelo; Russello, M.; Russo, Grazia; Sacco, Rodolfo; Sangiovanni, V.; Schiano, Antonio; Sciambra, Antonio; Scifo, Gaetano; Simeone, Filomena; Sullo, Annarita; Tarquini, Pierluigi; Tundo, Paolo; Vallone, Alfredo. Boceprevir or telaprevir in hepatitis C virus chronic infection: The Italian real life experience. In: World Journal of Hepatology, Vol. 8, No. 22, 01.08.2016, p. 949-956.
13. Facciorusso, Antonio; Stasi, Elisa; Di Maso, Marianna; Serviddio, Gaetano; Ali Hussein, Mohammed Salah; Muscatiello, Nicola. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration of pancreatic lesions with 22 versus 25 Gauge needles: A meta-analysis. In: United European Gastroenterology Journal, 17.11.2016.
14. Mangia, Alessandra; De Ledinghen, Victor; Bailly, François; Brahm, Javier; Keiss, Jazeps; Valantinas, Jonas; Rasmann, Nele; Messinger, Diethelm; Tatsch, Fernando; Bakalos, Georgios; Foster, Graham R; Gen-C study group. IL28B genotype is associated with cirrhosis or transition to cirrhosis in treatment-naive patients with chronic HCV genotype 1 infection : the international observational Gen-C study. In: SpringerPlus, Vol. 5, No. 1, 2016, p. 1990.

LINEA 3

Malattie non neoplastiche dell'apparato digerente

15. Scarpignato, Carmelo; Gatta, Luigi; Zullo, Angelo; Blandizzi, Corrado; SIF-AIGO-FIMMG Group. Effective and safe proton pump inhibitor therapy in acid-related diseases - A position paper addressing benefits and potential harms of acid suppression. In: BMC Medicine, Vol. 14, No. 1, 09.11.2016, p. 179.
16. Elli, Luca; Tomba, Carolina; Branchi, Federica; Roncoroni, Leda Rosalba; Lombardo, Vincenza; Bardella, Maria Teresa; Ferretti, F.; Conte, Dario; Valiante, Flavio; Fini, Lucia; Forti, Edoardo; Cannizzaro, Renato; Maiero, Stefania; Londoni, Claudio; Lauri, Adriano; Fornaciari, G.; Lenoci, Nicoletta; Spagnuolo, Rocco; Basilisco, Guido; Somalvico, Francesco; Borgatta, Bruno; Leandro, Gioacchino; Segato, Sergio; Barisani, Donatella; Morreale, Gaetano; Buscarini, E. Evidence for the presence of non-celiac gluten sensitivity

in patients with functional gastrointestinal symptoms : Results from a multicenter randomized double-blind placebo-controlled gluten challenge. In: *Nutrients*, Vol. 8, No. 2, 84, 08.02.2016.

17. De Santis, Stefania; Kunde, Dale; Serino, Grazia; Galleggiante, Vanessa; Caruso, Maria Lucia; Mastronardi, Mauro; Cavalcanti, Elisabetta; Ranson, Nicole; Pinto, Aldo; Campiglia, Pietro; Santino, Angelo; Eri, Rajaraman; Chieppa, Marcello. Secretory leukoprotease inhibitor is required for efficient quercetin-mediated suppression of TNF β secretion. In: *Oncotarget*, Vol. 7, No. 46, 2016, p. 75800-75809.

LINEA 4

Nutrizione

18. Becaria Coquet, Julia; Tumas, Natalia; Osella, Alberto Ruben; Tanzi, Matteo; Franco, Isabella; Diaz, Maria Del Pilar. Breast Cancer and Modifiable Lifestyle Factors in Argentinean Women: Addressing Missing Data in a Case-Control Study. In: *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, Vol. 17, No. 10, 01.10.2016, p. 4567-4575.
19. Misciagna, G.; Del Pilar Díaz, M.; Caramia, D. V.; Bonfiglio, C.; Franco, I.; Noviello, M. R.; Chiloiro, M.; Abbrescia, D. I.; Mirizzi, A.; Tanzi, M.; Caruso, M. G.; Correale, M.; Reddavide, R.; Inguaggiato, R.; Cisternino, A. M.; Osella, Alberto Rubén. Effect of a Low Glycemic Index Mediterranean Diet on non-alcoholic fatty liver disease. A randomized controlled clinical trial. In: *Journal of Nutrition, Health and Aging*, 29.09.2016, p. 1-9.
20. Leandro, Gioacchino; Giliberti, Aurore; Cisternino, Annamaria; Inguaggiato, R.; Reddavide, Rosa; Caruso, Maria Gabriella. How a Gastroenterologist interprets the Mediterranean diet. Human nutrition from the gastroenterologist's perspective. 2016. p. 13-25. **Chapter in Book**
21. Tutino, Valeria; Orlando, Antonella; Russo, Francesco; Notarnicola, Maria. Hydroxytyrosol Inhibits Cannabinoid CB1 Receptor Gene Expression in 3T3-L1 Preadipocyte Cell Line. In: *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 231, No. 2, 01.02.2016, p. 483-489.
22. Cavallini, Aldo; Lippolis, Catia; Vacca, Margherita; Nardelli, Claudia; Castegna, Alessandra; Arnesano, Fabio; Carella, Nicola; Depalo, Raffaella. The effects of chronic lifelong activation of the AHR pathway by industrial chemical pollutants on female human reproduction. In: *PLoS One*, Vol. 11, No. 3, e0152181, 01.03.2016.
23. Porcelli, Piero; Kleiger, James H. The "Feeling of Movement" : Notes on the rorschach human movement response. In: *Journal of Personality Assessment*, Vol. 98, No. 2, 03.03.2016, p. 124-134.
24. Rizzi, Massimiliano; Mazzuoli, Silvia; Regano, Nunzia; Inguaggiato, Rosa; Bianco, Margherita; Leandro, Gioacchino; Bugianesi, Elisabetta; Noè, Donatella; Orzes, Nicoletta; Pallini, Paolo; Petroni, Maria Letizia; Testino, Gianni; Guglielmi, Francesco William. Undernutrition, risk of malnutrition and obesity in gastroenterological patients : A multicenter study. In: *World journal of gastrointestinal oncology*, Vol. 8, No. 7, 15.07.2016, p. 563-72.

Castellana Grotte, 19 Aprile 2017

Il Direttore Scientifico

(Prof. Gianluigi Giannelli)

