

SR

San Raffaele Research Institute  
IRCCS San Raffaele Pisana

ANNUAL REPORT **2013**



I progetti di ricerca corrente contenuti in questo volume si sono svolti grazie al finanziamento del Ministero della Salute.

**Redazione:** Daniela Pernice

La responsabilità dei dati tecnico-scientifici è dei singoli autori.

**1 | Messaggio del Presidente****2 | Report del Direttore Scientifico****3 | Attività Scientifica**

Comitato Scientifico

Pubblicazioni

Linee di Ricerca

3.2.1. **LINEA 1.** Studio dei determinanti cellulari, molecolari, genetici, elettrofisiologici e nutrizionali della riabilitazione motoria e sensoriale nelle malattie neurodegenerative e nel dolore.

3.2.2. **LINEA 2.** Studio dei meccanismi di recupero funzionale nelle patologie croniche, disabilitanti dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.

3.2.3. **LINEA 3.** Sviluppo di sistemi innovativi per il monitoraggio ed il controllo della risposta al trattamento riabilitativo.

3.2.4. **LINEA 4.** Studio delle disabilità dello sviluppo e neuroriabilitazione pediatrica.

3.2.5. **LINEA 5.** Identificazione di nuovi modelli organizzativi e gestionali per ottimizzare la risposta riabilitativa nel paziente disabile.

Ricerca Finalizzata

Altra tipologia di ricerca

Clinical Trial Center

Convenzioni

Collaborazioni istituzionali nazionali ed internazionali

Servizi Bibliotecari

Scuole Universitarie

**4 | Attività di formazione****5 | Attività assistenziale**

Corsi ECM

**6 | Indirizzi utili**

## MESSAGGIO DEL PRESIDENTE

Fare ricerca è la nostra missione e questo volume né è la testimonianza fedele e concreta. L'IRCCS San Raffaele Pisana conferma e migliora le performances degli anni precedenti frutto del costante impegno dei nostri ricercatori che, con abnegazione si sono applicati per il continuo miglioramento dei risultati. Da alcuni anni la crisi ha pesantemente condizionato tutti i settori ed in special modo quello della salute e della ricerca ad essa applicata, ma crediamo di aver comunque garantito il valore aggiunto della ricerca targata San Raffaele dedicata alla riabilitazione. I risultati conseguiti che si aggiungono a quelli del decennio appena trascorso ci confortano nel proseguire nel cammino intrapreso. I nuovi strumenti messi a disposizione della ricerca da parte dell'Azienda hanno già consentito un miglioramento qualitativo e quantitativo della nostra produzione scientifica e siamo certi che così sarà negli anni a venire. La passione, l'impegno e la tenacia dei nostri ricercatori ci impongono sempre nuove scelte coraggiose pur se non sempre le Istituzioni sembrano percepire l'importanza strategica della ricerca e del lavoro che svolgiamo. Ma questo non ci abbatte ma anzi ci stimola ancor di più nella nostra battaglia per far comprendere che solo con una ricerca moderna e coraggiosa si vincono le sfide del futuro e si può aspirare ad essere vincenti in un contesto internazionale sempre più aggressivo. La nostra filosofia è basata sul lavoro la professionalità e la dedizione al paziente verso il quale dobbiamo sempre di più indirizzare il nostro sguardo finalizzando le nostre attività di ricerca al miglioramento delle prestazioni riabilitative. Questa pubblicazione rappresenta quindi il lavoro, spesso nascosto e silenzioso, di decine e decine di giovani e di professionisti affermati che hanno dedicato il loro ingegno all'obiettivo alto e nobile di contribuire ad una assistenza riabilitativa di eccellenza. Ad essi indistintamente va il nostro ringraziamento e la nostra riconoscenza ed a loro trasmettiamo un messaggio chiaro ed inequivocabile: siamo un'azienda che mantiene gli impegni e quello di continuare ad investire nella ricerca è uno di quelli primari che terremo fermi. La tutela della salute è un nostro obbligo prima di tutto morale oltreché giuridico e supportare le attività della nostra ricerca è parte di questo nostro impegno al quale non ci sottrarremo anche se l'attuale situazione economica del nostro paese consiglierebbe scelte conservative e prudenti. Ma la ritirata non è nel nostro dna. Dal gennaio di quest'anno l'IRCCS San Raffaele Pisana è divenuto autonomo, pur mantenendo un rapporto sinergico e collaborativo con tutte le altre strutture San Raffaele e questo ci consente certamente il costante miglioramento delle prestazioni assistenziali e di ricerca.

Buona lettura.

**Dottor Carlo Trivelli**

*Presidente IRCCS San Raffaele Pisana*

## REPORT DEL DIRETTORE SCIENTIFICO

Questo volume costituisce una rassegna delle attività che hanno visto lo staff del nostro Istituto impegnato a garantire la continuità nell'eccellenza dell'assistenza, della ricerca e della formazione.

Il costante impegno del personale è volto a garantire una ricerca coerente con la mission del nostro IRCCS, per assicurare e valorizzare un miglioramento costante di tutti gli aspetti legati alla ricerca che hanno un impatto rilevante sulla società.

L'obiettivo principale di migliorare la qualità della vita delle persone che si rivolgono al nostro Istituto rimane il punto da cui partire per potenziare ed espandere le nostre conoscenze e competenze sia consolidando le collaborazioni a livello nazionale ed internazionale già esistenti, sia creandone delle nuove.

Dai progetti riportati nel volume si evince la imprescindibile collaborazione tra i nostri ricercatori e quelli afferenti ad altri centri di ricerca nazionali ed internazionali. La collaborazione nella ricerca biomedica e di base è proseguita con le altre regioni Italiane, con l'Europa e con gli Stati Uniti attraverso varie reti che hanno visto l'Istituto presente su più fronti e che hanno contribuito a consolidarne l'immagine come centro di eccellenza impegnato anche insieme agli altri IRCCS e alle aziende del SSN, in tutte le attività di promozione della salute.

Sempre nell'ottica della mission del nostro IRCCS, le energie dei professionisti sono state anche convogliate verso la ricerca continua di collaborazioni con associazioni di pazienti e familiari per poter migliorare i protocolli riabilitativi standardizzati e innovativi per il trattamento di differenti patologie. A conferma della disponibilità e dell'apertura dell'Istituto alla collettività, vi è la grande adesione di visitatori alla Notte dei ricercatori, tenutasi il 27 Settembre. L'ampia partecipazione e l'interessamento mostrato dagli ospiti in quella occasione, nei confronti delle attività sia cliniche che di ricerca presentate, costituiscono un riconoscimento di quell'aspetto traslazionale che coniuga la ricerca con l'attività clinico-diagnostica, dove le prestazioni sanitarie di eccellenza si fondono anche con l'attività di aggiornamento e formazione.

Particolare attenzione è rivolta alle ricerche sulla gestione del dolore, sul reinserimento sociale e lavorativo delle persone con disabilità e alla robotica riabilitativa, nell'ottica di volere garantire una riabilitazione personalizzata.

Tutte le tematiche di ricerca trattate nel volume sono affrontate con un approccio multidisciplinare per consentire la massima espressione della ricerca traslazionale, per poter studiare al meglio modelli di malattia ed essere in grado di trasferire le conoscenze acquisite dal laboratorio alla pratica clinica.

**Professor Massimo Fini**

*Direttore Scientifico*

### COMITATO SCIENTIFICO

Nel corso dell'anno 2013, il Comitato Scientifico dell'IRCCS San Raffaele Pisana si è riunito in due occasioni.

I componenti hanno analizzato e valutato le lettere di intenti proposte dai ricercatori in occasione del bando di Ricerca Finalizzata 2011-2012 prima che il Destinatario Istituzionale certificasse l'effettiva appartenenza del ricercatore proponente alla Istituzione indicata nel progetto. Il Destinatario Istituzionale infatti doveva accreditare i progetti in coerenza con la propria mission e con la propria programmazione sanitaria e di ricerca.

Inoltre il Comitato ha dato un apporto alla pianificazione delle nuove strutture e dei nuovi laboratori di ricerca dell'IRCCS San Raffaele Pisana, mettendo a disposizione, in previsione dei lavori di ampliamento degli spazi dedicati alla ricerca, la competenza e professionalità dei componenti per l'individuazione dei locali idonei alle diverse esigenze di ricerca dell'Istituto.

#### COMITATO SCIENTIFICO IRCCS SAN RAFFAELE

**Presidente: Giuseppe Rotilio**

Lucio Annunziato

Massimo Fini

Renato Lauro

Giovanni Muto

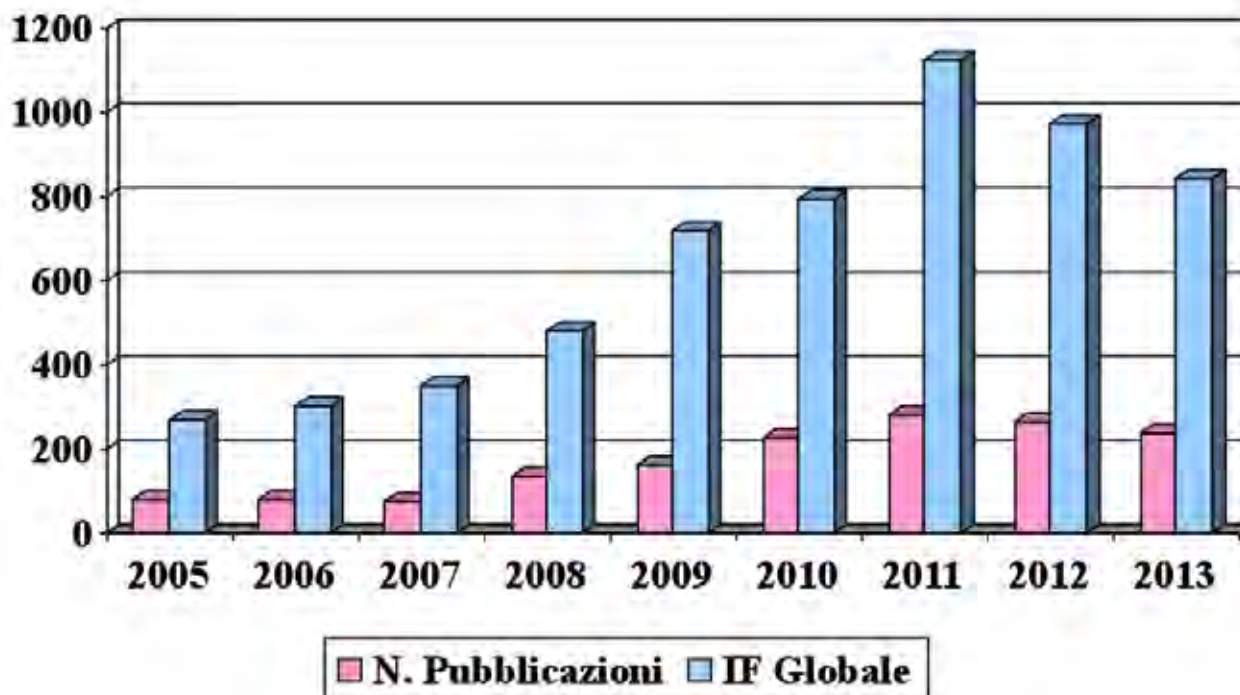
Giuseppe Nicoletti

Matteo Antonio Russo

Nel 2013 l'attività scientifica dell'IRCCS San Raffaele è documentata da 254 pubblicazioni, che comprendono:

- ☐ 238 articoli originali su riviste recensite dal JCR
- ☐ 16 articoli originali su riviste non recensite dal JCR

L'impact factor totale per gli articoli pubblicati nel 2013 è 843.



*Impact Factor totale degli articoli pubblicati dall' IRCCS San Raffaele Pisana nel periodo 2005-2013.*

## PUBBLICAZIONI SU RIVISTE IMPATTATE

### LINEA 1

**Studio Dei determinanti cellulari, molecolari, genetici, elettrofisiologici e nutrizionali della riabilitazione motoria e sensoriale nelle malattie neurodegenerative e nel dolore.**

Franceschini M, Rampello A, Agosti M, Massucci M, Bovolenta F, Sale P.

**Walking performance: Correlation between energy cost of walking and walking participation. new statistical approach concerning outcome measurement.**

PLoS ONE. 2013 02/28;8(2):e56669. Epub 2013 Feb 28.

Geroin C, Mazzoleni S, Smania N, Gandolfi M, Bonaiuti D, Gasperini G, Sale P, Munari D, Waldner A, Spidalieri R, Bovolenta F, Picelli A, Posteraro F, Molteni F, Franceschini M; Italian Robotic Neurorehabilitation Research Group.

**Systematic review of outcome measures of walking training using electro-mechanical and robotic devices in patients with stroke.**

J Rehabil Med. 2013 Oct 23; 45(10):987-996.

Gison A, Bruti L, Dall'armi V, Palma E, Giaquinto S.

**Return to work and painkiller medication after rehabilitation for subacute back conditions.**

**A 2-year follow-up.**

Advances in Applied Sociology. 2013; Vol.3, No.2, 106-113.

Mazzoleni S, Sale P, Franceschini M, Bigazzi S, Carrozza MC, Dario P, Posteraro F.

**Effects of proximal and distal robot-assisted upper limb rehabilitation on chronic stroke recovery.**

NeuroRehabilitation. 2013;33(1):33-39.

Mazzoleni S, Sale P, Tiboni M, Franceschini M, Carrozza MC, Posteraro F.

**Upper limb robot-assisted therapy in chronic and subacute stroke patients: a kinematic analysis.**

Am J Phys Med Rehabil. 2013 Oct;92 (10 Suppl 2):e26-37.

Sale P, Bovolenta F, Agosti M, Clerici P, Franceschini M.

**Short-term and long-term outcomes of serial robotic training for improving upper limb function in chronic stroke.**

Int J Rehabil Res. 2013 Oct 11. [Epub ahead of print]

Sale P, De Pandis MF, Stocchi F, Domenica LP, Sova I, Cimolin V, Ancillao A, Albertini G, Galli M, Franceschini M.

**Robot-assisted walking training for individuals with Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial.**

BMC Neurol. 2013 May 24;13(1):50. [Epub ahead of print]

Tavernese E, Paoloni M, Mangone M, Mandic V, Sale P, Franceschini M, Santilli V.

**Segmental muscle vibration improves reaching movement in patients with chronic stroke. A randomized controlled trial.**

NeuroRehabilitation 2013 01/01; 32(3):591-599.

Borghain R, Szasz J, Stanzione P, Meshram C, Bhatt M, Chirilineau D, Stocchi F, Lucini V, Giuliani R, Forrest E, Rice P, Anand R; for the Study 016 Investigators.

**Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in Parkinson's disease with motor fluctuations.**

Mov Disord. 2013 Dec 9. [Epub ahead of print]

Ray Chaudhuri K, Rojo JM, Schapira AHV, Brooks DJ, Stocchi F, Odin P, Antonini A,



Brown RJ, Martinez-Martin P.  
**A proposal for a comprehensive grading of parkinson's disease severity combining motor and non-motor assessments: Meeting an unmet need.**  
PLoS ONE. 2013 02/27;8(2):e57221.  
Epub 2013 Feb 27.

Olanow CW, Kieburtz K, Rascol O, Poewe W, Schapira AH, Emre M, Nissinen H, Leinonen M, Stocchi F; Stalevo Reduction in Dyskinesia Evaluation in Parkinson's Disease (STRIDE-PD) Investigators.  
**Factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease.**  
Mov Disord. 2013 Jul;28(8):1064-1071.

Olanow CW, Obeso JA, Stocchi F.  
**The vatican meeting on neuroprotection for Parkinson's disease.**  
Mov Disord. 2013 Jan;28(1):1-2.

Onofrj M, Varanese S, Bonanni L, Taylor JP, Antonini A, Valente EM, Petrucci S, Stocchi F, Thomas A, Perfetti B.  
**Cohort study of prevalence and phenomenology of tremor in dementia with Lewy bodies.**  
J Neurol. 2013 Jul;260(7):1731-1742.

Quadri M, Fang M, Picillo M, Olgiati S, Breedveld GJ, Graafland J, Wu B, Xu F, Erro R, Amboni M, Pappatà S, Quarantelli M, Annesi G, Quattrone A, Chien HF, Barbosa ER; International Parkinsonism Genetics Network, Oostra BA, Barone P, Wang J, Bonifati V.  
**Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism.**  
Hum Mutat. 2013 Sep;34(9):1208-1215.

Stocchi F, Antonini A, Barone P, Tinazzi M, Zappia M, Onofrj M, Ruggieri S, Morgante L, Bonuccelli U, Lopiano L, Pramstaller P, Albanese A, Attar M, Posocco V, Colombo D, Abbruzzese G.  
**Early DEtection of wEaring off in par-**

**kinson disease: The DEEP study.**  
Parkinsonism Relat Disord 2013.10.027.  
Epub 2013 Nov 5.

Stocchi F, The ADAGIO investigators.  
**Benefits of treatment with rasagiline for fatigue symptoms in patients with early Parkinson's disease.**  
Eur J Neurol. 2013 Jun 21.  
[Epub ahead of print]

Stocchi F, Olanow CW.  
**Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease.**  
Mov Disord. 2013 Jan;28(1):3-7.

Stocchi F, Rascol O, Destee A, Hattori N, Hauser RA, Lang AE, Poewe W, Stacy M, Tolosa E, Gao H, Nagel J, Merschhemke M, Graf A, Kenney C, Trenkwalder C.  
**AFQ056 in Parkinson patients with levodopa-induced dyskinesia: 13-week, randomized, dose-finding study.**  
Mov Disord. 2013 Jul 12.

Barbanti P, Aurilia C, Egeo G, Fofi L, Vanacore N.  
**A case-control study on excessive daytime sleepiness in chronic migraine.**  
Sleep Med. 2013 Mar;14(3):278-281.

Barbanti P, Fofi L, Aurilia C, Egeo G.  
**Dopaminergic symptoms in migraine.**  
Neurol Sci. 2013 May;34 Suppl 1:67-70.

Bonini F, Egeo G, Fattouch J, Fanella M, Morano A, Giallonardo AT, di Bonaventura C.  
**Natural evolution from idiopathic photosensitive occipital lobe epilepsy to idiopathic generalized epilepsy in an untreated young patient.**  
Brain Dev. 2013 Jun 28.  
[Epub ahead of print]

Fanciulli M, Di Bonaventura C, Egeo G, Fattouch J, Dazzo E, Radovic S, Spadotto A, Giallonardo AT, Nobile C.

**Suggestive linkage of familial mesial temporal lobe epilepsy to chromosome 3q26.**

Epilepsy Res. 2013 [Epub ahead of print]

Fanella M, Egeo G, Fattouch J, Casciato S, Lapenta L, Morano A, Giallonardo AT, Di Bonaventura C.

**Oxcarbazepine-induced myoclonic status epilepticus in juvenile myoclonic epilepsy.**

Epileptic Disord. 2013 Jun; 15(2):181-187.

Palmirotta R, Barbanti P, Ludovici G, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Spila A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F. **Establishment of a biorepository for migraine research: the experience of Interinstitutional Multidisciplinary Bio-Bank (BioBIM).**

Neurol Sci. 2013 Jan 26. [Epub ahead of print]

Palmirotta R, Ludovici G, Egeo G, Ialongo C, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Della-Morte D, Barbanti P, Guadagni F. **Prion Protein Gene M129V polymorphism and variability in age at migraine onset.**

Headache. 2013 Mar;53(3):540-545.

Tullo V, Bussone G, Omboni S, Barbanti P, Cortelli P, Curone M, Peccarisi C, Benedetto C, Pezzola D, Zava D, Allais G. **Efficacy of frovatriptan and other triptans in the treatment of acute migraine of hypertensive and normotensive subjects: a review of randomized studies.**

Neurol Sci. 2013 May;34 Suppl 1:87-91.

Tullo V, Valguarnera F, Barbanti P, Cortelli P, Sette G, Allais G, d'Onofrio F, Curone M, Zava D, Pezzola D, Benedetto C, Frediani F, Bussone G.

**Comparison of frovatriptan plus dexketoprofen (25 mg or 37.5 mg) with frovatriptan alone in the treatment of mi-**

**graine attacks with or without aura: A randomized study.**

Cephalalgia. 2013 Dec 20. [Epub ahead of print]

Cardinale A, Biocca S.

**Gene-Based Antibody Strategies for Prion Diseases.**

Int J Cell Biol. 2013 Epub 2013 Aug 21. Review.

Cifelli P, Palma E, Roseti C, Verlengia G, Simonato M.

**Changes in the sensitivity of GABAA current rundown to drug treatments in a model of temporal lobe epilepsy.**

Front Cell Neurosci. 2013 Jul 11;7:108.

Conti L, Limon A, Palma E, Miledi R.

**Microtransplantation of cellular membranes from squid stellate ganglion reveals ionotropic GABA Receptors.**

Biol Bull. 2013 Feb;224(1):47-52.

Roseti C, Fucile S, Lauro C, Martinello K, Bertollini C, Esposito V, Mascia A, Catalano M, Aronica E, Limatola C, Palma E. **Fractalkine/CX3CL1 modulates GABAA currents in human temporal lobe epilepsy.**

Epilepsia. 2013;54(10):1834-1844.

Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Marzano N, Infarinato F, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Bonforte C, Tedeschi G, Montella P, Baglieri A, Rodriguez G, Famà F, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state electroencephalographic alpha rhythms deteriorate across time in subjects with amnesic mild cognitive impairment.**

Neurobiol Aging. 2013 Jul 30. [Epub ahead of print]

Babiloni C, Lizio R, Del Percio C, Marzano N, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Cosentino FI, Tedeschi G, Montella P, Marino S, De Salvo S, Rodriguez G, Nobili F,

Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Richardson JC, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state EEG rhythms are sensitive to the progression of Alzheimer's disease at early stage.**

J Alzheimers Dis. 2013 Jan 1; 34(4):1015-1035.

Capotosto P, Babiloni C, Romani GL, Corbetta M.

**Resting-state modulation of alpha rhythms by interference with angular gyrus activity.**

J Cogn Neurosci. 2013 Aug 12. [Epub ahead of print]

Del Percio C, Triggiani AI, Marzano N, De Rosas M, Valenzano A, Petito A, Bellomo A, Soricelli A, Cibelli G, Babiloni C.

**Subjects' hypnotizability level affects somatosensory evoked potentials to non-painful and painful stimuli.**

Clin Neurophysiol. 2013 Jul;124(7):1448-1455.

Del Percio C, Triggiani AI, Marzano N, Valenzano A, De Rosas M, Petito A, Bellomo A, Lecce B, Mundi C, Infarinato F, Soricelli A, Limatola C, Cibelli G, Babiloni C.

**Poor desynchronisation of resting-state eyes-open cortical alpha rhythms in obese subjects without eating disorders.**

Clin Neurophysiol. 2013 Feb 21. 2013 Jun;124(6):1095-1105.

Ferreri F, Vecchio F, Ponzio D, Pasqualetti P, Rossini PM.

**Time-varying coupling of EEG oscillations predicts excitability fluctuations in the primary motor cortex as reflected by motor evoked potentials amplitude: An EEG-TMS study.**

Hum Brain Mapp. 2013 Jul 19. [Epub ahead of print]

Luigetti M, Padua L, Mazza S, Rossini PM, Sabatelli M, Lo Monaco M.

**Clinical-neurophysiological correlations in a series of patients with IgM-related neuropathy.**

Clin Neurophysiol. 2013 Sep;124(9):1899-1903.

Sizonenko SV, Babiloni C, de Bruin EA, Isaacs EB, Jönsson LS, Kennedy DO, Lattulippe ME, Hasan Mohajeri M, Moreines J, Pietrini P, Walhovd KB, Winwood RJ, Sijben JW.

**Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies?**

Br J Nutr. 2013 Aug;110 Suppl 1:S1-S30.

Sizonenko SV, Babiloni C, Sijben JW, Walhovd KB.

**Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies?**

Adv Nutr. 2013 Sep 1;4(5):554-556.

Vecchio F, Babiloni C, Lizio R, Fallani Fde V, Blinowska K, Verrienti G, Frisoni G, Rossini PM.

**Resting state cortical EEG rhythms in Alzheimer's disease: toward EEG markers for clinical applications: a review.**

Suppl Clin Neurophysiol. 2013; 62: 223-236.

Carducci F, Onorati P, Condoluci C, Di Gennaro G, Quarato PP, Pierallini A, Sarà M, Miano S, Cornia R, Albertini G.

**Whole-brain voxel-based morphometry study of children and adolescents with Down syndrome.**

Funct Neurol. 2013 Jan-Mar;28(1):19-28.

Garaci F, Toschi N, Lanzafame S, Meschini A, Bertini E, Simonetti G, Santorelli FM, Guerrisi M, Floris R.

**Diffusion tensor imaging in SPG11-and SPG4-linked hereditary spastic paraplegia.**

Int J Neuroscience 2013; early online 1-10.

Hampel H, Lista S, Teipel SJ, Garaci F, Nisticò R, Blennow K, Zetterberg H, Bertram L, Duyckaerts C, Bakardjian H, Drzezga A, Colliot O, Epelbaum S, Broich K, Lehéricy S, Brice A, Khachaturian ZS, Aisen PS, Dubois B.

**Perspective on future role of biological markers in clinical therapy trials of Alzheimer's Disease: a long-range point of view beyond 2020.**

Biochem Pharmacol. 2013 Nov 22  
[Epub ahead of print]

Lista S, Garaci FG, Ewers M, Teipel S, Zetterberg H, Blennow K, Hampel H.

**CSF A 1-42 combined with neuroimaging biomarkers in the early detection, diagnosis and prediction of Alzheimer's disease.**

Alzheimers Dement. 2013 Jul 11.  
[Epub ahead of print]

Lista S, Garaci FG, Toschi N, Hampel H.  
**Imaging epigenetics in Alzheimer's Disease.**

Curr Pharm Des. 2013;19(36):6393-6415.

Teipel SJ, Grothe M, Lista S, Toschi N, Garaci FG, Hampel H.

**Relevance of magnetic resonance imaging for early detection and diagnosis of alzheimer disease.**

Med Clin North Am. 2013 5;97(3):399-424.

Accoto D, Francomano MT, Rainer A, Trombetta M, Rossini PM, Guglielmelli E.  
**An implantable neural interface with electromagnetic stimulation capabilities.**

Med Hypotheses. 2013 Aug;  
81(2):322-327.

Babiloni C, Lizio R, Del Percio C, Marzano N, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Cosentino FI, Tedeschi G, Montella P, Marino S, De Salvo S, Rodriguez G, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Richardson JC, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state EEG**

**rhythms are sensitive to the progression of Alzheimer's disease at early sage.**

J Alzheimers Dis. 2013 Jan 1;  
34(4):1015-1035.

Bucossi S, Polimanti R, Ventriglia M, Mariani S, Siotto M, Ursini F, Trotta L, Scarscia F, Callea A, Vernieri F, Squitti R.

**Intronic rs2147363 variant in ATP7B transcription factor-binding site associated with Alzheimer's disease.**

J Alzheimers Dis. 2013;37(2):453-459.

Caliandro P, Silvestri G, Padua L, Bianchi ML, Simbolotti C, Russo G, Masciullo M, Rossini PM.

**fNIRS evaluation during a phonemic verbal task reveals prefrontal hypometabolism in patients affected by myotonic dystrophy type 1.**

Clin Neurophysiol. 2013 Nov;  
124(11):2269-2276.

Deguil J, Ravasi L, Auffret A, Babiloni C, Bartres Faz D, Bragulat V, Cassé-Perrot C, Colavito V, Herrero Ezquerro MT, Lambert Y, Lanteaume L, Pemberton D, Pifferi F, Richardson J, Schenker E, tarragon E, Bordet R.

**Evaluation of symptomatic drug effects in alzheimer's disease: strategies for prediction of efficacy in humans.**

Drug Discovery Today: Technologies. 2013 9;10(3):e329-342.

Ferreri F, Ponzo D, Vollero L, Guerra A, Di Pino G, Petrichella S, Benvenuto A, Tombini M, Rossini L, Denaro L, Micera S, Iannello G, Guglielmelli E, Denaro V, Rossini PM.

**Does an intraneural interface short-term implant for robotic hand control modulate sensorimotor cortical integration? An EEG-TMS co-registration study on a human amputee.**

Restor Neurol Neurosci. 2013 Oct 31.  
[Epub ahead of print]

Ferreri F, Rossini PM.

**TMS and TMS-EEG techniques in the study of the excitability, connectivity, and plasticity of the human motor cortex.**

Rev Neurosci. 2013;24(4):431-442.

Frisoni GB, Bocchetta M, Chételat G, Rabbinovici GD, de Leon MJ, Kaye J, Reiman EM, Scheltens P, Barkhof F, Black SE, Brooks DJ, Carrillo MC, Fox NC, Herholz K, Nordberg A, Jack CR Jr, Jagust WJ, Johnson KA, Rowe CC, Sperling RA, Thies W, Wahlund LO, Weiner MW, Pasqualetti P, Decarli C; For ISTAART's NeuroImaging Professional Interest Area.

**Imaging markers for Alzheimer disease: which vs how.**

Neurology. 2013 Jul 30;81(5):487-500.

Giambattistelli F, Tomasevic L, Pellegrino G, Porcaro C, Melgari JM, Rossini PM\*, Tecchio F.

**The spontaneous fluctuation of the excitability of a single node modulates the internodes connectivity: a TMS-EEG study.**

Hum Brain Mapp. 2013 May 14. [Epub ahead of print]

Gorgoni M, D'Atri A, Lauri G, Rossini PM, Ferlazzo F, De Gennaro L.

**Is sleep essential for neural plasticity in humans, and how does it affect motor and cognitive recovery?**

Neural Plast. 2013;2013. Epub 2013 Jun 11.

Guerra A, Curcio G, Pasqualetti P, Bressi F, Petrichella S, Scrascia F, Ponzio D, Ferilli M, Vernieri F, Rossini PM, Ferreri F.

**Unilateral cortical hyperexcitability in congenital hydrocephalus: a TMS study.**

Neurocase. 2013 May 17. [Epub ahead of print]

Jacobi H, Reetz K, du Montcel ST, Bauer P, Mariotti C, Nanetti L, Rakowicz M, Su-

lek A, Durr A, Charles P, Filla A, Antenora A, Schöls L, Schicks J, Infante J, Kang JS, Timmann D, Fabio RD, Masciullo M, Baliko L, Bela M, Boesch S, Bürk K, Peltz A, Schulz JB, Dufaure-Garé I, Klockgether T. **Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data.**

Lancet Neurol. 2013 Jul;12(7):650-658.

Masciullo M, Iannaccone E, Bianchi ML, Santoro M, Conte G, Modoni A, Monforte M, Tasca G, Laschena F, Ricci E, Silvestri G.

**Myotonic dystrophy type 1 and de novo FSHD mutation double trouble: A clinical and muscle MRI study.**

Neuromuscul Disord. 2013 May;23(5):427-431.

Masciullo M, Silvestri G, Modoni A, Tessa A, Bianchi M, Santorelli F.

**Do not jump to easy conclusions! lessons from pitfall in the molecular diagnosis of ARSACS.**

Clin Genet. 2013 [Epub ahead of print].

Melgari JM, Zappasodi F, Porcaro C, Tomasevic L, Cassetta E, Rossini PM, Tecchio F.

**Movement-induced uncoupling of primary sensory and motor areas in focal task-specific hand dystonia.**

Neuroscience. 2013 Oct 10; 250:434-445.

Piacentini S, Polimanti R, Simonelli I, Donno S, Pasqualetti P, Manfellotto D, Fuciarelli M.

**Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: a meta-analysis.**

Mol Biol Rep. 2013 Apr;40(4):3299-3313. Epub 2013 Jan 10.

Porcaro C, Coppola G, Pierelli F, Seri S,

Di Lorenzo G, Tomasevic L, Salustri C, Tecchio F.

**Multiple frequency functional connectivity in the hand somatosensory network: an EEG study.**

Clin Neurophysiol. 2013 Jun;124(6):1216-1224.

Rahman A, Languille S, Lamberty Y, Babiloni C, Perret M, Bordet R, Blin OJ, Jacob T, Auffret A, Schenker E, Richardson J, Pifferi F, Aujard F.

**Sleep deprivation impairs spatial retrieval but not spatial learning in the non-human primate grey mouse lemur.**

PLoS One. 2013 May 22;8(5):e64493.

Sabatelli M, Moncada A, Conte A, Lattante S, Marangi G, Luigetti M, Lucchini M, Mirabella M, Romano A, Del Grande A, Bisogni G, Niccolo' Doronzio P, Rossini PM, Zollino M.

**Mutations in the 3' untranslated region of FUS causing FUS overexpression are associated with amyotrophic lateral sclerosis.**

Hum Mol Genet. 2013 Dec 1;22(23):4748-4755.

Santoro M, Masciullo M, Bonvissuto D, Bianchi ML, Michetti F, Silvestri G.

**Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2.**

Mol Cell Biochem. 2013 Aug;380(1-2):259-265. Epub 2013 May 11.

Santoro M, Piacentini R, Masciullo M, Bianchi ML, Modoni A, Podda MV, Ricci E, Silvestri G, Grassi C.

**Alternative splicing alterations of Ca(2+) handling genes are associated with Ca(2+) signal dysregulation in DM1 and DM2 myotubes.**

Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 Jul 29. [Epub ahead of print]

Scrascia F, Curcio G, Ursini F, Trotta L, Quintiliani L, Migliore S, Altamura C, Pitocco F, Altavilla R, Melgari JM, Quattrocchi CC, Vernieri F.

**Relationship among diffusion tensor imaging, EEG Activity, and cognitive status in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients.**

J Alzheimers Dis. 2013 Oct 10.

[Epub ahead of print]

Squitti R, Polimanti R.

**Copper phenotype in Alzheimer's disease: dissecting the pathway.**

Am J Neurodegener Dis. 2013 Jun 21;2(2):46-56.

Squitti R, Simonelli I, Ventriglia M, Siotto M, Pasqualetti P, Rembach A, Doecke J, Bush AI.

**Meta-Analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease.**

J Alzheimers Dis. 2013 Sep 26.

[Epub ahead of print]

Squitti R, Siotto M, Bucossi S, Polimanti R.

**In silico investigation of the ATP7B gene: insights from functional prediction of non-synonymous substitution to protein structure.**

Biometals. 2013 Nov 20.

[Epub ahead of print]

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Devigus B, Zito G, Ercolani M, Carducci F.

**Regional personalized electrodes to select transcranial current stimulation target.**

Front Hum Neurosci. 2013 Apr 22;7:131.

Tombini M, Squitti R, Cacciapaglia F, Ventriglia M, Assenza G, Benvenga A, Pellegrino G, Campana C, Assenza F, Siotto M, Pacifici L, Afeltra A, Rossini PM.

**Inflammation and iron metabolism in adult patients with epilepsy: does a**

### link exist?

Epilepsy Res. 2013 Sep 28.  
[Epub ahead of print]

Zito G, Polimanti R, Panetta V, Ventriglia M, Salustri C, Siotto MC, Moffa F, Altamura C, Vernieri F, Lupoi D, Cassetta E, Rossini PM, Squitti R.

### **Antioxidant status and APOE genotype as susceptibility factors for neurodegeneration in Alzheimer's disease and vascular dementia.**

Rejuvenation Res. 2013 Feb;16(1):51-56.

Tempesta D, Curcio G, De Gennaro L, Ferrara M.

### **Long-term impact of earthquakes on sleep quality.**

PLoS One. 2013;8(2): e55936.  
Epub 2013 Feb 13.

### LINEA 2

### **Studio dei meccanismi di recupero funzionale nelle patologie croniche, disabilitanti dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.**

Agewall S, Cattaneo M, Collet JP, Andreotti F, Lip GY, Verheugt FW, Huber K, Grove EL, Morais J, Husted S, Wassmann S, Rosano G, Atar D, Pathak A, Kjeldsen K, Storey RF; On behalf of ESC Working Group on Cardiovascular Pharmacology and Drug Therapy and ESC Working Group on Thrombosis.

### **Expert position paper on the use of proton pump inhibitors in patients with cardiovascular disease and antithrombotic therapy.**

Eur Heart J. 2013 Jun;34(23):1708-1713.

Alghatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG.

### **Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore longitudinal study of aging.**

Hypertension. 2013 Nov;62(5):934-941.

Anker MS, von Haehling S, Springer J, Banach M, Anker SD.

### **Highlights of the mechanistic and therapeutic cachexia and sarcopenia research 2010 to 2012 and their relevance for cardiology.**

Int J Cardiol. 2013 Jan 10;162(2):73-76.

Baumgarten A, Bang C, Tschirner A, Engelmann A, Adams V, von Haehling S, Doehner W, Pregla R, Anker M, Blecharz K, Meyer R, Hetzer R, Anker SD, Thum T, Springer J.

### **TWIST1 regulates the activity of ubiquitin proteasome system via the miR-199/124 cluster in human end-stage dilated cardiomyopathy.**

Int J Cardiol. 2013 Sep 30;  
168(2):1447-1452.

Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, Thum T. **Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction.** *Int J Cardiol.* 2013 Jan 21. [Epub ahead of print]

Bourge RC, Fleg JL, Fonarow GC, Cleland JG, McMurray JJ, van Veldhuisen DJ, Gheorghiade M, Patel K, Aban IB, Allman RM, White-Williams C, White M, Filippatos GS, Anker SD, Ahmed A. **Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in older patients with chronic systolic heart failure.** *Am J Med.* 2013 Aug;126(8):701-708.

Cacciotti L, Passaseo I, Camastra GS, Favocchia C, Musarò S, Giannantoni P, Marazzi G, Campolongo G, Beni S, Lupporelli F, Ansalone G. **Cardiogenic shock due to a large VSD after myocardial infarction: time for a new strategy?** *Herz.* 2013 May 1. [Epub ahead of print]

Caminiti G, Volterrani M, Murugesan J, Baratta P, D'Antoni V, Sposato B, Foti C, Rosano G. **Tricuspid annular plane systolic excursion is related to performance at six minute walking test in patients with heart failure undergoing exercise training.** *Int J Cardiol.* 2013 Aug 28. [Epub ahead of print]

Castagna C, Iellamo F, Impellizzeri FM, Manzi V. **Validity and reliability of the 45-15 test for aerobic fitness in young soccer players.** *Int J Sports Physiol Perform.* 2013 Jan 4. [Epub ahead of print]

Deedwania P, Patel K, Fonarow GC, Desai RV, Zhang Y, Feller MA, Ovalle F, Love TE, Aban IB, Mujib M, Ahmed MI, Anker SD, Ahmed A.

**Prediabetes is not an independent risk factor for incident heart failure, other cardiovascular events or mortality in older adults: findings from a population-based cohort study.** *Int J Cardiol.* 2013 May 31. [Epub ahead of print]

Dobre D, Borer JS, Fox K, Swedberg K, Adams KF, Cleland JG, Cohen-Solal A, Gheorghiade M, Gueyffier F, O'Connor CM, Fiuzat M, Patak A, Piña IL, Rosano G, Sabbah HN, Tavazzi L, Zannad F. **Heart rate: a prognostic factor and therapeutic target in chronic heart failure. The distinct roles of drugs with heart rate-lowering properties.** *Eur J Heart Fail.* 2013 Aug 7. [Epub ahead of print]

Ebner N, Springer J, Kalantar-Zadeh K, Lainscak M, Doehner W, Anker SD, von Haehling S. **Mechanism and novel therapeutic approaches to wasting in chronic disease.** *Maturitas.* 2013 Jul;75(3):199-206.

Elkina Y, Palus S, Tschirner A, Hartmann K, von Haehling S, Doehner W, Mayer U, Coats AJS, Beadle J, Anker SD, Springer J. **Tandospirone reduces wasting and improves cardiac function in experimental cancer cachexia.** *Int J Cardiol.* 2013 Dec 10;170(2):160-166. Epub 2013 Oct 12.

Farkas J, von Haehling S, Kalantar-Zadeh K, Morley JE, Anker SD, Lainscak M. **Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly.** *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2013 Mar 29. [Epub ahead of print]

Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirotta R, Guadagni F. **Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and**



**ischemic heart disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Nov;108(6):387.  
Epub 2013 Sep 26.

Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M.

**Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2013 Sep;137:99-106.

Ferrari R, Rosano GM.

**Not just numbers, but years of science: putting the ACE inhibitor-ARB meta-analyses into context.**

Int J Cardiol. Int J Cardiol. 2013 Jun 20;166(2):286-288.

Ferraro E, Giammarioli AM, Caldarola S, Lista P, Feraco A, Tinari A, Salvatore AM, Malorni W, Berghella L, Rosano G.

**The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes.**

FEBS J. 2013 Oct;280(20):5094-5108.

Filippatos G, Farmakis D, Colet JC, Dickstein K, Lüscher TF, Willenheimer R, Parisisis J, Gaudesius G, Mori C, von Eisenhart Rothe B, Greenlaw N, Ford I, Ponikowski P, Anker SD.

**Intravenous ferric carboxymaltose in iron-deficient chronic heart failure patients with and without anaemia: a subanalysis of the FAIR-HF trial.**

Eur J Heart Fail. 2013 Nov; 15(11):1267-1276.

Fragasso G, Rosano G, Baek SH, Sisakian H, Di Napoli P, Alberti L, Calori G, Kang SM, Sahakyan L, Sanosyan A, Vitale C, Marazzi G, Margonato A, Belardinelli R.

**Effect of partial fatty acid oxidation inhibition with trimetazidine on mortality and morbidity in heart failure: Results from an international multicentre retrospective cohort study.**

Int J Cardiol. 2012 Oct 13.

[Epub ahead of print]

Gheorghiade M, Fonarow GC, van Veldhuisen DJ, Cleland JG, Butler J, Epstein AE, Patel K, Aban IB, Aronow WS, Anker SD, Ahmed A.

**Lack of evidence of increased mortality among patients with atrial fibrillation taking digoxin: findings from post hoc propensity-matched analysis of the AF-FIRM trial.**

Eur Heart J. 2013 May; 34(20):1489-1497.

Gheorghiade M, Patel K, Filippatos G, Anker SD, van Veldhuisen DJ, Cleland JG, Metra M, Aban IB, Greene SJ, Adams KF, McMurray JJ, Ahmed A.

**Effect of oral digoxin in high-risk heart failure patients: a pre-specified subgroup analysis of the DIG trial.**

Eur J Heart Fail. 2013 May; 15(5):551-559.

Gheorghiade M, Shah AN, Vaduganathan M, Butler J, Bonow RO, Rosano GM, Taylor S, Kupfer S, Misselwitz F, Sharma A, Fonarow GC.

**Recognizing hospitalized heart failure as an entity and developing new therapies to improve outcomes: academics', clinicians', industry's, regulators', and payers'.**

Perspectives. Heart Fail Clin. 2013 Jul;9(3):285-290.

Gliozzi M, Walker R, Muscoli S, Vitale C, Gratteri S, Carresi C, Musolino V, Russo V, Janda E, Ragusa S, Aloe A, Palma E, Muscoli C, Romeo F, Mollace V.

**Bergamot polyphenolic fraction enhances rosuvastatin-induced effect on LDL-cholesterol, LOX-1 expression and protein kinase B phosphorylation in patients with hyperlipidemia.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 10;170(2): 140-145.

Gorini S, Gatta L, Pontecorvo L, Vitiello L, la Sala A.

**Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides.**

Am J Blood Res. 2013;3(1):14-28.

Griffo R, Ambrosetti M, Tramarin R, Fattoroli F, Temporelli PL, Vestri AR, De Feo S, Tavazzi L; ICAROS investigators.

**Effective secondary prevention through cardiac rehabilitation after coronary revascularization and predictors of poor adherence to lifestyle modification and medication. Results of the ICAROS Survey.**

Int J Cardiol. 2013 Aug 20; 167(4):1390-1395.

Gutzwiller FS, Pfeil AM, Comin-Colet J, Ponikowski P, Filippatos G, Mori C, Braunhofer PG, Szucs TD, Schwenkglens M, Anker SD.

**Determinants of quality of life of patients with heart failure and iron deficiency treated with ferric carboxymaltose: FAIR-HF sub-analysis.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9; 168(4):3878-3883.

Habedank D, Meyer FJ, Hetzer R, Anker SD, Ewert R.

**Relation of respiratory muscle strength, cachexia and survival in severe chronic heart failure.**

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013 Dec;4(4):277-285.

Iellamo F, Caminiti G, Sposato B, Vitale C, Massaro M, Rosano G, Volterrani M.

**Effect of High-Intensity interval training versus moderate continuous training on 24-h blood pressure profile and insulin resistance in patients with chronic heart failure.**

Intern Emerg Med. 2013 Jul 16. [Epub ahead of print]

Iellamo F, Volterrani M.

**Childhood obesity, autonomic cardio-**

**vascular regulation and regular physical activity.**

Heart. 2013 Mar;99(6):359-360.

Jehn M, Prescher S, Koehler K, von Haehling S, Winkler S, Deckwart O, Honold M, Sechtem U, Baumann G, Halle M, Anker SD\*, Koehler F.

**Tele-accelerometry as a novel technique for assessing functional status in patients with heart failure: Feasibility, reliability and patient safety.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12; 168(5):4723-4728.

Kalici ska E, Wojtas K, Majda J, Doehner W, Haehling SV, Banasiak W, Ponikowska B, Borodulin-Nadzieja L, Anker SD, Ponikowski P, Jankowska EA.

**Anabolic deficiencies in men with systolic heart failure: do co-morbidities and therapies really contribute significantly?**

Aging Male. 2013 Sep;16(3):123-131.

Kasner M, Aleksandrov AS, Westermann D, Lassner D, Gross M, von Haehling S, Anker SD, Schultheiss HP, Tschöpe C.

**Functional iron deficiency and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12; 168(5):4652-4657.

Knops M, Werner CG, Scherbakov N, Fiebach J, Dreier JP, Meisel A, Heuschmann PU, Jungehülsing GJ, von Haehling S, Dirnagl U, Anker SD, Doehner W.

**Investigation of changes in body composition, metabolic profile and skeletal muscle functional capacity in ischemic stroke patients: the rationale and design of the Body Size in Stroke Study (BoSSS).**

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013 Sep;4(3):199-207.

Lorenzen JM, Dietrich B, Fiedler J, Jazbutyte V, Fleissner F, Karpinski N,

F, Wanner C, Asan E, Caprio M, Ertl G, Bauersachs J, Thum T.

**Pathologic endothelial response and impaired function of circulating angiogenic cells in patients with Fabry disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Jan;108(1):311.

McGraw AP, Bagley J, Chen WS, Galayda C, Nickerson H, Armani A, Caprio M, Carmeliet P, Jaffe IZ.

**Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism.**

J Am Heart Assoc. 2013 Feb 22;2(1).

McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau J, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR; PARADIGM-HF Committees and Investigators.

**Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF).**

Eur J Heart Fail. 2013 Sep; 15(9):1062-1073.

Mollace V, Gliozzi M, Carresi C, Musolino V, Oppedisano F.

**Re-assessing the mechanism of action of n-3 PUFAs.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 20;170 (2 Suppl 1):S8-11.

Morley JE, Vellas B, Abellan van Kan G, Anker SD, Bauer JM, Bernabei R, Cesari M, Chumlea WC, Doehner W, Evans J, Fried LP, Guralnik JM, Katz PR, Malmstrom TK, McCarter RJ, Gutierrez Robledo LM, Rockwood K, von Haehling S, Vandewoude MF, Walston J.

**Frailty consensus: A call to action.**

Journal of the American Medical Directors Association. 2013 6; 14(6):392-397.

Muscoli C, Dagostino C, Ilari S, Lauro F, Gliozzi M, Bardhi E, Palma E, Mollace V, Salvemini D.

**Posttranslational nitration of tyrosine residues modulates glutamate transmission and contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated thermal hyperalgesia.**

Mediators Inflamm. 2013;2013. Epub 2013 Jun 20.

Nasso G, Bonifazi R, Romano V, Brigiani MS, Fiore F, Bartolomucci F, Lamarra M, Fattouch K, Rosano G, Gaudio M, Spirito R, Gaudio C, Speziale G.

**Increased plasma homocysteine predicts arrhythmia recurrence after minimally invasive epicardial ablation for nonvalvular atrial fibrillation.**

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Oct;146(4):848-853.

Nilsson PM, Boutouyrie P, Cunha P, Kotis V, Narkiewicz K, Parati G, Rietzschel E, Scuteri A, Laurent S.

**Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention.**

J Hypertens. 2013 Aug;31(8):1517-1526.

Nistico S, Ventrice D, Dagostino C, Lauro F, Ilari S, Gliozzi M, Colica C, Musolino V, Carresi C, Strongoli MC, Vecchio I, Rizzo M, Mollace V, Muscoli C.

**Effect of MN (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin by photodynamically generated free radicals on SODs keratinocytes.**

J Biol Regul Homeost Agents. 2013 Jul-Sep;27(3):781-790.

Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, Pani L, Pecorelli S, Sancarlo D, Scuteri A, Trifirò G, Vitale C, Zuccaro SM, Bernabei R, Fini

M; the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA).

**High prevalence of poor quality drug prescribing in older individuals: a nationwide report from the Italian Medicines Agency (AIFA).**

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]

Onder G, Liperoti R, Foebel A, Fialova D, Topinkova E, van der Roest HG, Gindin J, Cruz-Jentoft AJ, Fini M, Gambassi G, Bernabei R; SHELTER project.

**Polypharmacy and mortality among nursing home residents with advanced cognitive impairment: results from the shelter study.**

J Am Med Dir Assoc. 2013 Jun;14(6):450.e7-450.e12. Epub 2013 May 4.

Palus S, von Haehling S, Doehner W, Datta R, Zhang J, Dong JZ, Culler MD, Anker SD, Springer J.

**Effect of application route of the ghrelin analog BIM-28131 (RM-131) on body weight and body composition in a rat heart failure model.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):2369-2374.

Palus S, von Haehling S, Flach VC, Tschirner A, Doehner W, Anker SD, Springer J.

**Simvastatin reduces wasting and improves cardiac function as well as outcome in experimental cancer cachexia.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9; 168(4):3412-3418.

Patel K, Sui X, Zhang Y, Fonarow GC, Aban IB, Brown CJ, Bittner V, Kitzman DW, Allman RM, Banach M, Aronow WS, Anker SD, Blair SN, Ahmed A.

**Prevention of heart failure in older adults may require higher levels of physical activity than needed for other cardiovascular events.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3; 168(3):1905-1909.

Pelliccia F, Marazzi G, Greco C, Franzoni

F, Speziale G, Gaudio C.

**Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 20;170 (2 Suppl 1):S3-7. Epub 2013 Jul 19.

Pelliccia F, Pasceri V, Rosano G, Pristipino C, Roncella A, Speciale G, Pannarale G, Schiariti M, Greco C, Gaudio C.

**Endothelial progenitor cells predict long-term prognosis in patients with stable angina treated with percutaneous coronary intervention.**

Circ J. 2013 Jun 25;77(7):1728-1735.

Pikilidou MI, Yavropoulou MP, Scuteri A.

**Can atihypertensivem interfere with the vicious cycle between hypertension and vascular calcification?**

Cardiovasc Drugs Ther. 2014 Feb; 28(1):61-71.

Pullicino PM, Thompson JL, Sacco RL, Sanford AR, Qian M, Teerlink JR, Haddad H, Diek M, Freudenberg RS, Labovitz AJ, Di Tullio MR, Lok DJ, Ponikowski P, Anker SD, Graham S, Mann DL, Mohr JP, Homma S; WARCEF Investigators.

**Stroke in heart failure in sinus rhythm: the Warfarin versus Aspirin in reduced cardiac ejection fraction trial.**

Cerebrovasc Dis. 2013 Jul 30;36(1):74-78. [Epub ahead of print]

Rogler G, Rosano G.

**The heart and the gut.**

Eur Heart J. 2013 Jul 17. [Epub ahead of print]

Rosano G, Vitale C.

**Cardiovascular benefits of HRT may differ by patient age.**

Evid Based Med. 2013 Oct 10. [Epub ahead of print]

Salvemini D, Kim SF, Mollace V.

**Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical**

### **implications.**

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Apr 1;304(7):R473-487.

Savarese G, Costanzo P, Cleland JG, Vassallo E, Ruggiero D, Rosano G, Perrone-Filardi P.

### **A meta-analysis reporting effects of Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor blockers in patients without heart failure.**

J Am Coll Cardiol. 2013 Jan 15;61(2):131-142.

Savarese G, Ferri C, Trimarco B, Rosano G, Dellegrottaglie S, Losco T, Casaretti L, D'Amore C, Gambardella F, Prastaro M, Rengo G, Leosco D, Perrone-Filardi P.

### **Changes in serum uric acid levels and cardiovascular events: A meta-analysis.**

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2013 Aug;23(8):707-714.

Savarese G, Rosano G, D'Amore C, Musella F, Della Ratta GL, Pellegrino AM, Formisano T, Vitagliano A, Cirillo A, Cice G, Fimiani L, Del Guercio L, Trimarco B, Perrone-Filardi P.

### **Effects of ranolazine in symptomatic patients with stable coronary artery disease. A systematic review and meta-analysis.**

Int J Cardiol. 2013 Nov 15; 169(4):262-270.

Scherbakov N, Anker SD, Dirnagl U, Doehner W.

### **Stroke induced sarcopenia: muscle wasting and disability after stroke.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 10;170(2):89-94.

Scuteri A, Tesauro M, Guglini L, Lauro D, Fini M, Di Daniele N.

### **Aortic stiffness and hypotension episodes are associated with impaired cognitive function in older subjects with subjective complaints of memory loss.**

Int J Cardiol. 2013 Nov 20; 169(5):371-377.

Shewan LG, Rosano G, Henein M, Coats AJ.

### **A statement on ethical standards in publishing scientific articles in the International Journal of Cardiology family of journals.**

Int J Cardiol. 2012 Nov 29; 161(3):124-125.

Szabó T, Scherbakov N, Sandek A, Kung T, von Haehling S, Lainscak M, Jankowska EA, Rudovich N, Anker SD, Frystyk J, Flyvbjerg A, Pfeiffer AF, Doehner W.

### **Plasma adiponectin in heart failure with and without cachexia: catabolic signal linking catabolism, symptomatic status, and prognosis.**

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2014 Jan;24(1):50-56.

Spoletini I, Caprio M, Vitale C, Rosano GM.

### **Androgens and cardiovascular disease: gender-related differences.**

Menopause International. 2013 Jun; 19(2):82-86.

Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Pötsch M, von Websky K, Hocher B, Latouche C, Jaisser F, Orawietz L, Coats AJ, Beadle J, Argiles JM, Thum T, Földes G, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD.

### **Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure.**

Eur Heart J. 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]

Giovannetti A, Maselli A, Colasanti T, Rosato E, Salsano F, Pisarri S, Mezzaroma I, Malorni W, Ortona E, Pierdominici M.

### **Autoantibodies to estrogen receptor in Systemic Sclerosis (SSc) as pathogenic determinants and markers of progression.**

PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74332.

Pierdominici M, Barbati C, Vomero M, Locatelli SL, Carlo-Stella C, Ortona E, Malorni W.

**Autophagy as a pathogenic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders.**

FASEB J. 2014 Feb;28(2):524-535.

Springer J, Tschirner A, Hartman K, von Haehling S, Anker SD, Doehner W.

**The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9; 168(4):3527-3531.

Szabó T, Postrach E, Mähler A, Kung T, Turhan G, von Haehling S, Anker SD, Boschmann M, Doehner W.

**Increased catabolic activity in adipose tissue of patients with chronic heart failure.**

Eur J Heart Fail. 2013 Oct; 15(10):1131-1137.

Tkaczyszyn M, Nega K, Majda J, Lopuszka M, Szklarska A, Ponikowska B, von Haehling S, Doehner W, Banasiak W, Anker SD, Ponikowski P, Jankowska EA.

**Andropausal syndrome in men with systolic heart failure.**

Pol Arch Med Wewn. 2013; 123(4):156-169.

Trippel TD, Anker SD, von Haehling S.

**The role of micronutrients and macronutrients in patients hospitalized for heart failure.**

Heart Fail Clin. 2013 Jul;9(3):345-357.

Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S, Springer J, Anker SD, Lainscak M.

**Pharmacokinetics of drugs in cachectic patients: a systematic review.**

PLoS ONE. 2013 11/08;8(11):e79603.

Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Greenlaw N, Gaudesius G, Mori C, Po-

nikowski P, Anker SD.

**The effect of intravenous ferric carboxymaltose on red cell distribution width: a subanalysis of the FAIR-HF study.**

Eur J Heart Fail. 2013 Jul;15(7):756-762.

Villanova L, Vernucci E, Pucci B, Pellegrini L, Nebbioso M, Mauri C, Marfe G, Spataro A, Fini M, Banfi G, Russo MA, Tafani M.

**Influence of age and physical exercise on Sirtuin activity in humans.**

J Biol Regul Homeost Agents. 2013 Apr-Jun;27(2):497-507.

Vodo S, Bechi N, Petroni A, Muscoli C, Aloisi AM.

**Testosterone-induced effects on lipids and inflammation.**

Mediators Inflamm. 2013;2013:183041.

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; on behalf of the SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) Investigators.

**Anticoagulation in "real world" patients with atrial fibrillation in Italy: results from the ISPAF (Indagine Sicoa Paziente Con Fibrillazione Atriale) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12; 168(5):4729-4733.

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) Investigators.

**On-target antihypertensive treatment in Italy: the ISPIT (Indagine Sicoa Paziente Iperteso a Target) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9; 168(4):4403-4405.

von Haehling S, Anker SD, Doehner W, Morley JE, Vellas B.

**Frailty and heart disease.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3;

168(3):1745-1747.

von Haehling S, Lainscak M, Kung T, Cramer L, Fülster S, Pelzer U, Hildebrandt B, Sandek A, Schefold JC, Rauchhaus M, Doehner W, Anker SD.

**Non-invasive assessment of cardiac hemodynamics in patients with advanced cancer and with chronic heart failure: A pilot feasibility study.**

Arch Med Sci. 2013;9(2):261-267.

von Haehling S, Doehner W, Jankowska EA, Ponikowski P, Stellos K, Puntmann VO, Nagel E, Anker SD, Gawaz M, Bigalke B.

**Value of serum pregnancy-associated plasma protein A for predicting cardiovascular events among patients presenting with cardiac chest pain.**

CMAJ. 2013 Apr 16;185(7):E295-303.

von Haehling S, Steinbeck L, Doehner W, Springer J, Anker SD.

**Muscle wasting in heart failure: an overview.**

Int J Biochem Cell Biol. 2013 Oct;45(10):2257-2265.

Schaefer A, Tallone EM, Tutarel O, Mertins R, Wilkink LM, Anker SD, Bauersachs J, Roentgen P.

**Aerobic training in adults after atrial switch procedure for transposition of the great arteries improves exercise capacity without impairing systemic right ventricular function.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 5;170(1):24-29.

Zannad F, Garcia AA, Anker SD, Armstrong PW, Calvo G, Cleland JG, Cohn JN, Dickstein K, Domanski MJ, Ekman I, Filippatos GS, Gheorghide M, Hernandez AF, Jaarsma T, Koglin J, Konstam M, Kupfer S, Maggioni AP, Mebazaa A, Metra M, Nowack C, Pieske B, Piña IL, Pocock SJ, Ponikowski P, Rosano G, Ruilope LM, Rutschitzka F, Severin T, Solomon S, Stein K, Stockbridge NL, Stough WG, Swedberg

K, Tavazzi L, Voors AA, Wasserman SM, Woehrle H, Zalewski A, McMurray JJ.

**Clinical outcome endpoints in heart failure trials: a European Society of Cardiology Heart Failure Association consensus document.**

Eur J Heart Fail. 2013 Oct; 15(10):1082-1894.

Cacciatore F, Della-Morte D, Basile C, Mazzella F, Mastrobuoni C, Salsano E, Gargiulo G, Galizia G, Rengo F, Bonaduce D, Abete P.

**Long-term mortality in frail elderly subjects with osteoarthritis.**

Rheumatology (Oxford). 2013 Oct 23. [Epub ahead of print]

Dave KR, Della-Morte D, Saul I, Prado R, Perez-Pinzon MA.

**Ventricular fibrillation-induced cardiac arrest in the rat as a model of global cerebral ischemia.**

Transl Stroke Res. 2013 Oct; 4(5):571-578.

Della-Morte D, Cacciatore F, Salsano E, Pirozzi G, Gargiulo G, Palmirota R, Guadagni F, Rundek T, Del Genio MT, D'Antonio I, Abete P.

**Age-related reduction of cerebral ischemic preconditioning: myth or reality?**

Clinical Interventions in Aging. 2013; 8:1055-1061.

Della-Morte D, Guadagni F, Palmirota R, Ferroni P, Rundek T.

**D allele of ACE gene insertion/deletion polymorphism: a marker for risk of ischemic stroke.**

Pharmacogenomics. 2013 Jan;14(1):16.

Della-Morte D, Guadagni F, Palmirota R, Ferroni P, Rundek T.

**Effect of GRK4 genetic variants on blood pressure response to atenolol and cardiovascular outcomes.**

Pharmacogenomics. 2013 Jan;

14(1):13-14.

Della-Morte D, Guadagni F, Palmirota R, Ferroni P, Rundek T.

**MDR1 and LPL genetic variants are associated with unfavorable outcome in stroke patients under atorvastatin treatment.**

Pharmacogenomics. 2013 Jan; 14(1):14-15.

Della-Morte D, Guadagni F, Palmirota R, Ferroni P, Rundek T.

**Polymorphisms on IL1B and VWF genes are associated with response to fibrinolysis in Hispanics with ischemic stroke.**

Pharmacogenomics. 2013 Jan; 14(1):15-16.

Della-Morte D, Ricordi C, Guadagni F, Rundek T.

**Measurement of subclinical carotid atherosclerosis may help in predicting risk for stroke in patients with diabetes.**

Metab Brain Dis. 2013 Sep; 28(3):337-339.

Della-Morte D, Ricordi C, Rundek T.

**The fountain of youth: role of sirtuins in aging and regenerative medicine.**

Regen Med. 2013 Nov;8(6):681-683.

D'Ambrosio D, Gargiulo G, Della-Morte D, Gallucci F, Uomo G, Rundek T, Abete P.

**Gamma-glutamyltransferase predicts functional impairment in elderly adults after ischemic stroke.**

J Am Geriatr Soc. 2013 Jun; 61(6):1040-1041.

Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirota R, Guadagni F.

**Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and**

**ischemic heart disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Nov;108(6):387.

Ferroni P, Della-Morte D, Pileggi A, Riondino S, Rundek T, Ricordi C, Guadagni F.  
**Pleiotropic effects of PPAR agonist on hemostatic activation in type 2 diabetes mellitus.**

Curr Vasc Pharmacol. 2013 May 1;11(3):338-351.

Ferroni P, Riondino S, Guadagni F, Roselli M.

**Impact of chemotherapy on venous thromboembolism: comment to: regional lymph node metastases are a strong risk factor for venous thromboembolism: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study.**

Haematologica. 2013 Dec;98(12):e153-154.

Formica V, Cereda V, di Bari MG, Grenga I, Tesauro M, Palmirota R, Ferroni P, Guadagni F, Roselli M.

**Peripheral CD45RO, PD-1, and TLR4 expression in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab, fluorouracil, and irinotecan (FOLFIRI-B).**

Med Oncol. 2013 Dec;30(4):743.

Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Mazzella F, Galizia G, Della-Morte D, Langellotto A, Pirozzi G, Ferro G, Ferrara N, Rengo F, Abete P.

**Moderate alcohol consumption predicts long-term mortality in elderly subjects with chronic heart failure.**

J Nutr Health Aging. 2013; 17(5):480-485.

Nussbeck SY, Benson EE, Betsou F, Guadagni F, Lehmann S, Umbach N.

**Is there a protocol for using the SPREC? Biopreservation and Biobanking.** 2013 10/01; 2013/10;11(5):260-266.

Palmirota R, Barbanti P, Ludovici G, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Spila



A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F.  
**Establishment of a biorepository for migraine research: the experience of Interinstitutional Multidisciplinary Bio-Bank (BioBIM).**

Neurol Sci. 2013 Jan 26.  
[Epub ahead of print]

Palmirotta R, De Marchis ML, Ludovici G, Ialongo C, Leone B, Lopez N, Valente MG, Spila A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F.

**A reliable and reproducible technique for DNA fingerprinting in biorepositories: a pilot study from BioBIM.**

Int J Biol Markers. 2013 Jul 19:0.  
[Epub ahead of print]

Palmirotta R, DE Marchis ML, Ludovici G, Leone B, Covello R, Conti S, Costarelli L, Della-Morte D, Ferroni P, Roselli M, Guadagni F.

**Mutational analysis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): procedural approach for diagnostic purposes.**

Cancer Genomics Proteomics. 2013 May-Jun;10(3):115-123.

Palmirotta R, Leone B, De Marchis ML, Ludovici G, Savonarola A, Ferroni P, Rundek T, Roselli M, Della-Morte D, Guadagni F.

**An importance of identification of double variant methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C in cis configuration for pharmacogenetic studies.**

Blood Coagul Fibrinolysis. 2013 Oct;24(7):784-786.

Palmirotta R, Ludovici G, Egeo G, Ialongo C, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Della-Morte D, Barbanti P, Guadagni F.

**Prion protein gene M129V polymorphism and variability in age at migraine onset.**

Headache. 2013 Mar;53(3):540-545.

Roselli M, Cereda V, di Bari MG, Formi-

ca V, Spila A, Jochems C, Farsaci B, Donahue R, Gulley JL, Schlom J, Guadagni F.

**Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells.**

Oncoimmunology. 2013 Oct 1;2(10).

Roselli M, Ferroni P, Riondino S, Mariotti S, Laudisi A, Vergati M, Cavaliere F, Palmirotta R, Guadagni F.

**Impact of chemotherapy on activated protein C-dependent thrombin generation - association with VTE occurrence.**

Int J Cancer. 2013 Sep 1;  
133(5):1253-1258.

Roselli M, Ferroni P, Rolfo C, Peeters M, Palmirotta R, Formica V, Ludovici G, Laudisi A, De Marchis ML, La Farina F, Russo A, Guadagni F.

**TNF- gene promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism in gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy.**

Ann Oncol. 2013 Jul 12.  
[Epub ahead of print]

Roselli M, Guadagni F, Ferroni P.

**Aging: an important risk factor in chemotherapy-associated vascular diseases.**

Expert Rev Anticancer Ther. 2013 ug;13(8):899-901.

Testa G, Cacciatore F, Della-Morte D, Mazzella F, Mastrobuoni C, Galizia G, Gargiulo G, Rengo F, Bonaduce D, Abete P.

**Atenolol use is associated with long-term mortality in community-dwelling older adults with hypertension.**

Geriatr Gerontol Int. 2013 Apr 15.  
[Epub ahead of print]

Testa G, Della-Morte D, Cacciatore F, Gargiulo G, D'Ambrosio D, Galizia G, Langellotto A, Abete P.

**Precipitating factors in younger and ol-**

**der adults with decompensated chronic heart failure: are they different?**

J Am Geriatr Soc. 2013 Oct; 61(10):1827-1828.

Vergati M, Della-Morte D, Ferroni P, Cereda V, Tosetto L, La Farina F, Guadagni F, Roselli M.

**Increased risk of chemotherapy-associated venous thromboembolism in elderly patients with cancer.**

Rejuvenation Res. 2013 Jun; 16(3):224-231.

Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR.

**Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2.**

Biochim Biophys Acta. 2013 Aug;1830(8):4137-4146.

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Cioccolo S, Scrivo R, Morreale M, Pontecorvo S, Ferrari F, Di Nardo G, Nencioni L, Carlucio S, Valesini G, Francia A, Cucchiara S, Palamara AT, Pietropaolo V.

**Human Polyomavirus JC monitoring and noncoding control region analysis in dynamic cohorts of individuals affected by immune-mediated diseases under treatment with biologics: an observational study.**

Virology. 2013 Sep 30;10(1):298.

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Palamara AT, Nencioni L, Pietropaolo V.

**New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy.**

Clin Dev Immunol. 2013;2013. Epub 2013 Apr 17.

Bozzini T, Botta G, Delfino M, Onofri S, Saladino R, Amatore D, Sgarbanti R, Nencioni L, Palamara AT.

**Tyrosinase and layer-by-layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic catechols with antiinfluenza acti-**

**vity.**

Bioorg Med Chem. 2013 Oct 30. [Epub ahead of print]

Checconi P, Sgarbanti R, Celestino I, Limongi D, Amatore D, Iuvare A, Alimonti A, Garaci E, Palamara AT, Nencioni L.

**The environmental pollutant cadmium promotes influenza virus replication in MDCK cells by altering their redox state.**

Int J Mol Sci. 2013 Feb 19; 14(2):4148-4162.

Chirullo B, Sgarbanti R, Limongi D, Shytaj IL, Alvarez D, Das B, Boe A, Dafonseca S, Chomont N, Liotta L, Iii Petricoin E, Norrelli S, Pelosi E, Garaci E, Savarino A, Palamara AT.

**A candidate anti-HIV reservoir compound, auranofin, exerts a selective 'anti-memory' effect by exploiting the baseline oxidative status of lymphocytes.**

Cell Death Dis. 2013 Dec 5;4:e944.

Fraternale A, Crinelli R, Casabianca A, Paoletti MF, Orlandi C, Carloni E, Smietana M, Palamara AT, Magnani M.

**Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF-kB and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages.**

PLoS ONE. 2013 03/11;8(3):e57866.

Lettieri Barbato D, Aquilano K, Baldelli S, Cannata SM, Bernardini S, Rotilio G, Ciriolo MR.

**Proline oxidase-adipose triglyceride lipase pathway restrains adipose cell death and tissue inflammation.**

Cell Death Differ. 2013 Oct 4. [Epub ahead of print]

Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR.

**FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy**

**during nutrient restriction and metformin treatment.**

Cell Death Dis. 2013 Oct 17;4:e861.

Lettieri-Barbato D, Tomei F, Sancini A, Morabito G, Serafini M.

**Effect of plant foods and beverages on plasma non-enzymatic antioxidant capacity in human subjects: a meta-analysis.**

Br J Nutr. 2013 May;109(9):1544-1556.

Magrone T, Perez de Heredia F, Jirillo E, Morabito G, Marcos A, Serafini M.

**Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases.**

Can J Physiol Pharmacol. 2013 Jun;91(6):387-396.

Miglio C, Peluso I, Raguzzini A, Villaño DV, Cesqui E, Catasta G, Toti E, Serafini M.

**Fruit juice drinks prevent endogenous antioxidant response to high-fat meal ingestion.**

Br J Nutr. 2013 Aug 12:1-7.  
[Epub ahead of print]

Ruggieri A, Anticoli S, Nencioni L, Sgarbanti R, Garaci E, Palamara AT.

**Interplay between hepatitis C virus and redox cell signaling.**

Int J Mol Sci. 2013 Feb 26; 14(3):4705-4721.

Shytaj IL, Chirullo B, Wagner W, Ferrari MG, Sgarbanti R, Corte AD, Labranche C, Lopalco L, Palamara AT, Montefiori D, Lewis MG, Garaci E, Savarino A.

**Investigational treatment suspension and enhanced cell-mediated immunity at rebound followed by drug-free remission of simian AIDS.**

Retrovirology. 2013 Jul 16;10:71.

Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M.

**Dynamic changes in lipid droplet-asso-**

**ciated proteins in the "Browning" of white adipose tissues.**

Biochim Biophys Acta. 2013 May; 1831(5):924-933.

Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, Guerrieri M, Cinti S.

**White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma.**

Biochim Biophys Acta. 2013 May; 1831(5):950-959.

Carpi A, Cini G, Russo M, Antonelli A, Gaudio C, Galetta F, Franzoni F, Rossi G.

**Subclinical hyperthyroidism and cardiovascular manifestations: a reevaluation of the association.**

Internal and Emergency Medicine. 2013 04/01;8(1):75-77.

Carpi A, Rossi G, Nicolini A, Iervasi G, Russo M, Mechanick J.

**Does large needle aspiration biopsy add pain to the thyroid nodule evaluation?**

PLoS One. 2013;8(3):e58016. Epub 2013 Mar 11.

Chimenti C, Frustaci A.

**Contribution and risks of left ventricular endomyocardial biopsy in patients with cardiomyopathies: a retrospective study over a 28-year period.**

Circulation. 2013 Oct 1; 128(14):1531-1541.

De Girolamo L, Stanco D, Salvatori L, Coroniti G, Arrigoni E, Silecchia G, Russo MA, Niada S, Petrangeli E, Brini AT.

**Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors.**

Int J Immunopathol Pharmacol. 2013 Jan-Mar;26(1 Suppl):11-21.

Limana F, Esposito G, Fasanaro P, Foglio

E, Arcelli D, Voellenkle C, Di Carlo A, Avitabile D, Martelli F, Russo MA, Pompilio G, Germani A, Capogrossi MC.

**Transcriptional profiling of HMGB1-induced myocardial repair identifies a key role for Notch signalling.**

*Mol Ther.* 2013 Oct;21(10):1841-1851.

Nebbioso M, Rusciano D, Pucci B, Zicari A, Grenga R, Pescocolido N.

**Treatment of glaucomatous patients by means of food supplement to reduce the ocular discomfort: a double blind randomized trial.**

*Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2013;17(8):1117-1122.

Pucci B, Villanova L, Sansone L, Pellegrini L, Tafani M, Carpi A, Fini M, Russo MA.

**Sirtuins: the molecular basis of beneficial effects of physical activity.**

*Intern Emerg Med.* 2013 Apr;8 Suppl 1:23-25.

Sansone L, Reali V, Pellegrini L, Villanova L, Aventaggiato M, Marfe G, Rosa R, Nebbioso M, Tafani M, Fini M, Russo MA, Pucci B.

**SIRT1 silencing confers neuroprotection through IGF-1 pathway activation.**

*J Cell Physiol.* 2013 Aug;228(8):1754-1761.

Tafani M, De Santis E, Coppola L, Perrone GA, Carnevale I, Russo A, Pucci B, Carpi A, Bizzarri M, Russo MA.

**Bridging hypoxia, inflammation and estrogen receptors in thyroid cancer progression.**

*Biomedicine & Pharmacotherapy* 2013 [Epub ahead of print]

Tafani M, Perrone GA, Pucci B, Russo A, Bizzarri M, Mechanick JI, Carpi A, Russo MA.

**Reprogramming cancer cells in endocrine-related tumors: open issues.**

*Current Medicinal Chemistry*, 2014, 21 (Epub ahead of print)

Tafani M, Pucci B, Russo A, Schito L, Pellegrini L, Perrone GA, Villanova L, Salvatore L, Ravenna L, Petrangeli E, Russo MA.

**Modulators of HIF1 and NFkB in cancer treatment: is it a rational approach for controlling malignant progression?**

*Front Pharmacol.* 2013;4:13.

Villanova L, Vernucci E, Pucci B, Pellegrini L, Nebbioso M, Mauri C, Marfe G, Spataro A, Fini M, Banfi G, Russo MA, Tafani M.

**Influence of age and physical exercise on sirtuin activity in humans.**

*J Biol Regul Homeost Agents.* 2013 Apr-Jun;27(2):497-507.

### LINEA 3

#### **Sistemi innovativi di prevenzione/controllo e promozione di salute.**

Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, Cesario A, Lococo FM, Russo P, Mainini AF, Bonifati LG, Nosotti M, Santambrogio L, Margaritora S, Granone PM, Dutly AE.

#### **EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation.**

Int J Med Sci. 2013;10(3):320-330.

Boccia S, La Vecchia C.

#### **Dissecting causal components in gastric carcinogenesis.**

Eur J Cancer Prev. 2013 Mar 12. [Epub ahead of print]

Bonassi S, Taioli E, Vermeulen R.

#### **Omics in population studies: a molecular epidemiology perspective.**

Environ Mol Mutagen. 2013 Aug; 54(7):455-460.

Cadby G, Mukherjee S, Musk AW, Reid A, Garlepp M, Dick I, Robinson C, Hui J, Fiorito G, Guarrera S, Beilby J, Melton PE, Moses EK, Ugolini D, Mirabelli D, Bonassi S, Magnani C, Dianzani I, Matullo G, Robinson B, Creaney J, Palmer LJ.

#### **A genome-wide association study for malignant mesothelioma risk.**

Lung Cancer. 2013 Oct;82(1):1-8.

Cafarotti S, Cesario A, Margaritora S, Granone P.

#### **Typical bronchial carcinoid tumors: focus on surgical management.**

Ann Thorac Surg. 2013 Jan;95(1):385.

Cafarotti S, Cesario A, Porziella V, Leuzzi G, Vita ML, Meacci E, Congedo MT, Granone P.

#### **Post-esophagectomy anastomotic leaks The role of the anastomotic location.**

Ann Ital Chir. 2013;84:137-141.

Calzetta L, Page CP, Spina D, Cazzola M, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG.

#### **Effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor RPL554 on human isolated bronchial smooth muscle tone.**

J Pharmacol Exp Ther. 2013 Sep; 346(3):414-423.

Calzetta L, Passeri D, Kanabar V, Rogliani P, Page C, Cazzola M, Matera MG, Orlandi A.

#### **Brain natriuretic peptide protects against hyperreactivity of human asthmatic airway smooth muscle via an epithelial cell dependent mechanism.**

Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Mar;50(3):493-501.

Calzetta L, Spina D, Page C, Rogliani P, Facciolo F, Cazzola M, Matera MG.

#### **The effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor rpl554 on human isolated bronchial smooth muscle tone.**

J Pharmacol Exp Ther. 2013 Sep;346(3):414-423.

Capurso G, Boccia S, Salvia R, Del Chiaro M, Frulloni L, Arcidiacono PG, Zerbi A, Manta R, Fabbri C, Ventrucci M, Tarantino I, Piciucchi M, Carnuccio A, Boggi U, Leoncini E, Costamagna G, Delle Fave G, Pezzilli R, Bassi C, Larghi A.

#### **Risk factors for intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) of the pancreas: a multicentre case-control study.**

Am J Gastroenterol. 2013 Jun;108(6):1003-1009.

Cazzola M, Calzetta L, Lauro D, Bettoncelli G, Cricelli C, Di Daniele N, Rogliani P.

#### **Asthma and COPD in an Italian adult population: role of BMI considering the smoking habit.**

Respir Med. 2013 Sep; 107(9):1417-1422.

Cazzola M, Page CP, Matera MG.  
**Aclidinium bromide for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease.**

Expert Opin Pharmacother. 2013 Jun;14(9):1205-1214.

Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Matera MG.

**2-agonist therapy in lung disease.**

Am J Respir Crit Care Med. 2013 Apr;187(7):690-696.

Cazzola M, Rogliani P, Matera MG.

**Aclidinium bromide/formoterol fumarate fixed-dose combination for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease.**

Expert Opin Pharmacother. 2013 Apr;14(6):775-781.

Cazzola M, Rogliani P, Ruggeri P, Segreti A, Proietto A, Picciolo S, Matera MG.

**Chronic treatment with indacaterol and airway response to salbutamol in stable COPD.**

Respir Med. 2013 Jun;107(6):848-853.

Coelho P, Costa S, Costa C, Silva S, Walter A, Ranville J, Pastorinho MR, Harrington C, Taylor A, Dall'armi V, Zoffoli R, Candeias C, da Silva EF, Bonassi S, Laffon B, Teixeira JP.

**Biomonitoring of several toxic metal(loid)s indifferent biological matrices from environmentally and occupationally exposed populations from Panasqueira mine area, Portugal.**

Environ Geochem Health. 2013 Aug 30. [Epub ahead of print]

Coelho P, García-Lestón J, Costa S, Costa C, Silva S, Dall'armi V, Zoffoli R, Bonassi S, de Lima JP, Gaspar JF, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP.

**Genotoxic effect of exposure to metal(loid)s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portu-**

**gal.**

Portugal. Environ Int. 2013 Sep 12;60C:163-170.

Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhawan A, Benzie I, Coskun E, Moretti M, Speit G, Bonassi S; for the ComNet project.

**The comet assay as a tool for human biomonitoring studies:**

The ComNet Project. Mutat Res. 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]

Crisafulli E, Iattoni A, Venturelli E, Siscaro G, Beneventi C, Cesario A, Clini EM. P

**redicting walking-induced oxygen desaturations in COPD patients: a statistical model.**

Respir Care. 2013 Sep;58(9):1495-1503.

Iannace C, Cadoni G, De Feo E, Liberati L, Simo RK, Paludetti G, Ricciardi W, Boccia S.

**A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of anti-heat shock protein 70 antibodies for the detection of autoimmune hearing loss.**

Otol Neurotol. 2013 Feb;34(2):214-219.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Rossnerova A, Sram R, Romm H, Bolognesi C, Ramakumar A, Soussaline F, Schunck C, Elhajjoui A, Anwar W, Bonassi S.

**HUMN project initiative and review of validation, quality control and prospects for further development of automated micronucleus assays using image cytometry systems.**

Int J Hyg Environ Health. 2013 Aug;216(5):541-552.

Filippo L, Cesario A, Leuzzi G, Apolone G.

**Second primary non-small-cell lung cancer: implications of the new adenocarcinoma classification in the challenging decision of the best surgical strategy.**

Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Sep 11.

[Epub ahead of print]

Franchi C, Mari D, Tettamanti M, Pasina L, Djade CD, Mannucci PM, Onder G, Bernabei R, Gussoni G, Bonassi S, Nobili A; On behalf of ELICADHE Investigators. **E-learning to improve the drug prescribing in the hospitalized elderly patients: the ELICADHE feasibility pilot study.**

Aging Clin Exp Res. 2013 Dec 17.

[Epub ahead of print]

Franciosi LG, Diamant Z, Banner KH, Zuiker R, Morelli N, Kamerling IMC, de Kam ML, Burggraaf J, Cohen AF, Cazzola M, Calzetta L, Singh D, Spina D, Walker MJA, Page CP.

**Efficacy and safety of RPL554, a dual PDE3 and PDE4 inhibitor, in healthy volunteers and in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: findings from four clinical trials.**

The Lancet Respiratory Medicine 2013 [Epub ahead of print]

Larghi A, Panic N, Capurso G, Leoncini E, Arzani D, Salvia R, Del Chiaro M, Frulloni L, Arcidiacono PG, Zerbi A, Manta R, Fabbri C, Ventrucci M, Tarantino I, Piciucchi M, Carnuccio A, Boggi U, Costamagna G, Delle Fave G, Pezzilli R, Bassi C, Bulajic M, Ricciardi W, Boccia S.

**Prevalence and risk factors of extrapancreatic malignancies in a large cohort of patients with intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas.**

Ann Oncol. 2013 Jul;24(7):1907-1911.

Leoncini E, Ricciardi W, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Paludetti G, Brennan P, Luce D, Stucker I, Matsuo K, Talamini R, La Vecchia C, Olshan AF, Winn DM, Herroero R, Franceschi S, Castellsague X, Muscat J, Morgenstern H, Zhang ZF, Levi F, Dal Maso L, Kelsey K, McClean M, Vaughan TL, Lazarus P, Purdue MP, Hayes RB, Chen C, Schwartz SM, Shangina O, Koifman S,

Ahrens W, Matos E, Lagiou P, Lissowska J, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Menezes A, Agudo A, Daudt AW, Richiardi L, Kjaerheim K, Mates D, Betka J, Yu GP, Schantz S, Simonato L, Brenner H, Conway DI, Macfarlane TV, Thomson P, Fabianova E, Znaor A, Rudnai P, Healy C, Boffetta P, Chuang SC, Lee YC, Hashibe M, Boccia S. **Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium.**

Eur J Epidemiol. 2013 Nov 24. [Epub ahead of print]

Leuzzi G, Cesario A, Cafarotti S, Lococo F, Dall'armi V, Novellis P, Romano R, Siciliani A, Meacci E, Granone P, Margaritora S.

**Surgical treatment in patient with non-small-cell lung cancer with fissure involvement: anatomical versus nonanatomical resection.**

J Thorac Oncol. 2013 Nov 19. [Epub ahead of print]

Leuzzi G, Cesario A, Chiappetta M, Margaritora S, Porziella V, Meacci E, Vita ML, Congedo MT, Granone P.

**N2 nodal involvement in multiple primary lung cancer: really an exclusion criterion?**

Chest. 2013 Aug;144(2):714-715.

Leuzzi G, Cesario A, Lococo F, Inchingolo R, Petrone G, Inzani F, Congedo MT, Corbo GM, Valente S, Granone P.

**A 43-year-old man with persistent fever and sudden shortness of breath.**

Chest. 2013 Sep;144(3):1066-1071.

Leuzzi G, Cesario A, Margaritora S, Parisi AM, Porziella V, Meacci E, Vita ML, Congedo MT, Chiappetta M, Granone P.

**A case of oesophageal cancer with low back pain: the accidental finding of skeletal muscle metastasis.**

Ann Ital Chir. 2013;84:193-195.

Lococo F, Cesario A, Attili F, Chiappetta

M, Leuzzi G, Costamagna G, Granone P, Larghi A.

**Transoesophageal endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pleural effusion for the staging of non-small cell lung cancer.**

Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 Aug;17(2):237-241.

Lococo F, Cesario A, Margaritora S, Dall'armi V, Mattei F, Romano R, Porziella V, Granone P.

**Long-term results in patients with pathological complete response after induction radiochemotherapy followed by surgery for locally advanced non-small-cell lung cancer.**

Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Mar;43(3):e71-81.

Lococo F, Cesario A, Meacci E, Margaritora S, Granone P.

**Surgical treatment of myasthenia gravis: evident benefits and insidious pitfalls of mini-invasive techniques.**

Ann Thorac Surg. 2013 Oct;96(4):1525.

Lococo F, Cesario A, Nachira D, Margaritora S, Granone P.

**Predictors of survival in postinduction therapy surgical T4N0-2 non-small cell lung cancer.**

Ann Thorac Surg. 2013 Dec;96(6):2284.

Lococo F, Cesario A, Porziella V, Vita ML, Granone P.

**Bronchial carcinoid tumors causing cushing's syndrome: an insidious disease.**

Ann Thorac Surg. 2013 Jun;95(6):2212.

Lococo F, Cesario A, Mattei F, Petrone G, Vita LM, Petracca-Ciavarella L, Margaritora S, Granone P.

**Elastofibroma dorsi: clinicopathological analysis of 71 cases.**

Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Apr;61(3):215-222.

Lococo F, Cesario A, Okami J, Cardillo G,

Cavuto S, Tokunaga T, Apolone G, Margaritora S, Granone P.

**Role of combined (18)F-FDG-PET/CT for predicting the WHO malignancy grade of thymic epithelial tumors: a multicenter analysis.**

Lung Cancer. 2013 Aug 13. [Epub ahead of print]

Lugo A, La Vecchia C, Boccia S, Murisic B, Gallus S.

**Patterns of smoking prevalence among the elderly in Europe.**

Int J Environ Res Public Health. 2013 Sep 17;10(9):4418-4431.

Margaritora S, Cesario A, Cusumano G, Dall'Armi V, Porziella V, Meacci E, Lococo F, D'Angelillo R, Congedo MT, Granone P.

**Pneumonectomy with and without induction chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer: short and long-term results from a single centre.**

Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Jan;17(1):29-40.

Matera MG, Calzetta L, Cazzola M.

**-Adrenoceptor modulation in chronic obstructive pulmonary disease: present and future perspectives.**

Drugs. 2013 Oct;73(15):1653-1663.

Matullo G, Guarrera S, Betti M, Fiorito G, Ferrante D, Voglino F, Cadby G, Di Gaetano C, Rosa F, Russo A, Hirvonen A, Casalone E, Tunesi S, Padoan M, Giordano M, Aspesi A, Casadio C, Ardisson F, Ruffini E, Betta PG, Libener R, Guaschino R, Piccolini E, Neri M, Musk AW, de Klerk NH, Hui J, Beilby J, James AL, Creaney J, Robinson BW, Mukherjee S, Palmer LJ, Mirabelli D, Ugolini D, Bonassi S, Magnani C, Dianzani U.

**Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study.**

PLoS One. 2013 Apr 23;8(4):e61253.



Nicolotti N, Cattel C, Gualano MR, Soriano A, Manna R, Boccia S.

**A retrospective analysis of 3 156 admissions with fever of unknown origin in a large Italian hospital.**

Epidemiology, Biostatistics and Public Health. 2013;10(4):e8776

Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, Pani L, Pecorelli S, Sancarlo D, Scuteri A, Trifirò G, Vitale C, Zuccaro SM, Bernabei R, Fini M; the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA).

**High prevalence of poor quality drug prescribing in older individuals: a nationwide report from the Italian Medicines Agency (AIFA).**

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]

Posteraro B, Persiani R, Dall'Armi V, Biondi A, Arzani D, Sicoli F, Bonassi S, D'Ugo D, Ricciardi W, Boccia S.

**Prognostic factors and outcomes in Italian patients undergoing curative gastric cancer surgery.**

European Journal of Surgical Oncology (EJSO)(0) [Epub ahead of print]

Panic N, Leoncini E, de Belvis G, Ricciardi W, Boccia S.

**Evaluation of the endorsement of the preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis (PRISMA) statement on the quality of published systematic review and meta-analyses.**

PLoS One. 2013 Dec 26;8(12):e83138.

Pasqua F, Geraneo K, Nardi I, Lococo F, Cesario A.

**Pulmonary rehabilitation in lung cancer.**

Monaldi Arch Chest Dis. 2013 Jun;79(2):73-80.

Posteraro B, Persiani R, Dall'Armi V, Biondi A, Arzani D, Sicoli F, Bonassi S, D'Ugo D, Ricciardi W, Boccia S.

**Prognostic factors and outcomes in Ita-**

**lian patients undergoing curative gastric cancer surgery.**

Eur J Surg Oncol. Epub 2013 Nov 12.

Ramella S, Alberti AM, Cammilluzzi E, Fiore M, Ippolito E, Greco C, De Quarto AL, Ramponi S, Apolone G, Trodella L, Cesario A, D'Angelillo RM.

**Erlotinib and concurrent chemoradiation in pretreated NSCLC patients: radiobiological basis and clinical results.**

Biomed Res Int. 2013;2013:403869. Epub 2013 Aug 4.

Ranzi A, Fustinoni S, Erspamer L, Campo L, Gatti MG, Bechtold P, Bonassi S, Trenti T, Goldoni CA, Bertazzi PA, Lauriola P.

**Biomonitoring of the general population living near a modern solid waste incinerator: a pilot study in Modena, Italy.**

Environ Int. 2013 Oct 5;61C:88-97.

Rogliani P, Calzetta L, Rendina EA, Masullo D, Dauri M, Rinaldi B, Capuano A, Matera MG.

**The influence of propofol, remifentanyl and lidocaine on the tone of human bronchial smooth muscle.**

Pulm Pharmacol Ther. 2013 Jun;26(3):325-331.

Romano R, Cesario A, Lococo F, Petrone G, Margaritora S, Granone P.

**Successful multidisciplinary management of a primary mediastinal Ewing's sarcoma.**

Minerva Chir. 2013 Feb;68(1):121-124.

Russo P, Frustaci A, Fini M, Cesario A.

**Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease.**

Curr Med Chem. 2013 Apr 1;20(13):1686-1693.

Sances G, Galli F, Ghiotto N, Allena M, Guaschino E, Frustaci A, Nappi G, Tassorelli C.

**Factors associated with a negative out-**

**come of medication-overuse headache: A 3-year follow-up (the 'CARE' protocol).**

Cephalalgia 2013 May; 33(7):431-443.

Segreti A, Fiori E, Calzetta L, Sabatini M, Segreti V, Rogliani P, Cazzola M.

**The effect of indacaterol during an acute exacerbation of COPD.**

Pulm Pharmacol Ther. 2013 Apr 8. [Epub ahead of print]

Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, Rossi E, Folsom AR, Almawi WY, Scarabin PY, den Heijer M, Cushman M, Penco S, Vaya A, Angchaisuksiri P, Okumus G, Gemmati D, Cima S, Akar N, Oguzulgen KI, Ducros V, Lichy C, Fernandez-Miranda C, Szczeklik A, Nieto JA, Torres JD, Le Cam-Duchez V, Ivanov P, Cantu-Brito C, Shmeleva VM, Stegnar M, Ogunyemi D, Eid SS, Nicolotti N, De Feo E, Ricciardi W, Boccia S.

**Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of factor V Leiden, prothrombin 20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls.**

Eur J Epidemiol. 2013 Aug; 28(8):621-647.

Simone B, Mazzucco W, Gualano MR, Agodi A, Coviello D, Dagna Bricarelli F, Dallapiccola B, Di Maria E, Federici A, Genuardi M, Varesco L, Ricciardi W, Boccia S; for the GENISAP Network.

**The policy of public health genomics in Italy.**

Health Policy. 2013 May; 110(2-3):214-219.

Sterzi S, Cesario A, Cusumano G, Dall'armi V, Lapenna LM, Cardaci V, Novellis P, Lococo F, Corbo GM, Cafarotti S, Margaritora S, Granone P.

**Post-operative rehabilitation for surgically resected non-small cell lung can-**

**cer patients: Serial pulmonary functional analysis.**

J Rehabil Med. 2013 Sep;45(9):911-915.

Tucker JD, Vadapalli M, Joiner MC, Ceppi M, Fenech M, Bonassi S.

**Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by the cytokinesis-block micronucleus assay.**

Radiat Res. 2013 Sep;180(3):284-291.

Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S.

**H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies.**

Mutat Res. 2013 Jul-Sep;753(1):24-40.

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; on behalf of the SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) Investigators.

**Anticoagulation in "real world" patients with atrial fibrillation in Italy: Results from the ISPAF (Indagine Sicoa Paziente Con Fibrillazione Atriale) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12; 168(5):4729-4733

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) Investigators.

**On-target antihypertensive treatment in Italy: the ISPIT (Indagine Sicoa Paziente Iperteso a Target) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 [Epub ahead of print]

Wise RA, Anzueto A, Cotton D, Dahl R, Devins T, Disse B, Dusser D, Joseph E, attenbeck S, Koenen-Bergmann M, Pledger G, Calverley P; TIOSPIR Investigators.

**Tiotropium respimat inhaler and the risk of death in COPD.**  
N Engl J Med. 2013 Oct 7;

369(16):1491-1501.

Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Amy Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, SturGIS EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Schantz S, Rudnai P, Purdue MP, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Michaluart P Jr, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, de Carvalho MB, Cadoni G, Boccia S, Brennan P, Boffetta P, Olshan AF.

**Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the international Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.**

Am J Epidemiol. 2013 Sep 1; 178(5):679-690.

#### LINEA 4

**Le disabilità dello sviluppo e neuroriabilitazione pediatrica.**

Ancillao A, Galli M, Vimercati SL, Albertini G.

**An optoelectronic based approach for handwriting capture.**

Comput Methods Programs Biomed. 2013 Aug;111(2):357-365.

Artilheiro MC, Corrêa JC, Cimolin V, Lima MO, Galli M, de Godoy W, Lucareli PR.

**Three-dimensional analysis of performance of an upper limb functional task among adults with dyskinetic cerebral palsy.**

Gait Posture. 2013 Dec 10.

Camerota F, Galli M, Cimolin V, Celletti C, Ancillao A, Blow D, Albertini G.

**Neuromuscular taping for the upper limb in cerebral palsy: a case study in a patient with hemiplegia.**

Dev Neurorehabil. 2013 Oct 2. [Epub ahead of print]

Carducci F, Onorati P, Condoluci C, Di Gennaro G, Quarato PP, Pierallini A, Sarà M, Miano S, Cornia R, Albertini G.

**Whole-brain voxel-based morphometry study of children and adolescents with Down syndrome.**

Funct Neurol. 2013 Jan-Mar;28(1):19-28.

Celletti C, Galli M, Cimolin V, Castori M, Tenore N, Albertini G, Camerota F.

**Use of the gait profile score for the evaluation of patients with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type.**

Res Dev Disabil. 2013 Oct 1;34(11):4280-4285.

Cimolin V, Avellis M, Piccinini L, Corbetta C, Cazzaniga A, Turconi AC, Galli M.

**Comparison of two pelvic positioning**

**belt configurations in a paediatric wheelchair.**

Assistive Technology. 2013 03/05  
[Epub ahead of print]

Cimolin V, Galli M, Rigoldi C, Grugni G, Vismara L, de Souza SA, Mainardi L, Albertini G, Capodaglio P.

**The fractal dimension approach in posture: a comparison between Down and Prader-Willi syndrome patients.**

Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2013 Jan 29. [Epub ahead of print]

Cimolin V, Galli M, Vismara L, Vimercati SL, Precilios H, Cattani L, Fabris De Souza S, Petroni ML, Capodaglio P.

**Gait analysis in anorexia and bulimia nervosa.**

J Appl Biomater Funct Mater. 2013 Sep 13;11(2):e122-128.

Galli M, Cimolin V, Albertini G, Piccinini L, Turconi AC, Romkes J, Brunner R.

**Kinematic analysis of upper limb during walking in diplegic children with cerebral palsy.**

European Journal of Paediatric Neurology 2013 [Epub ahead of print]

Galli M, Cimolin V, Pau M, Costici P, Albertini G.

**Relationship between flat foot condition and gait pattern alterations in children with Down syndrome.**

J Intellect Disabil Res. 2013 Jan 4. [Epub ahead of print]

Galli M, Cimolin V, Rigoldi C, Pau M, Costici P, Albertini G.

**The effects of low arched feet on foot rotation during gait in children with down syndrome.**

Journal of Intellectual Disability Research. 2013:n/a,n/a. [Epub ahead of print]

Kaczmarek W, Barua M, Mazur-Kolecka B, Frackowiak J, Dowjat W, Mehta P, Bolton D, Hwang Y, Rabe A,

Albertini G, Wegiel J.

**Intracellular distribution of differentially phosphorylated dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A).**

J Neurosci Res. 2013

[Epub ahead of print]

Molteni E, Rigoldi C, Morante M, Rozbaczylo C, Haro M, Albertini G, Galli M, Bianchi AM.

**Quantification of long-term effects of botulinum injection in a case of cerebral palsy affecting the upper limb movement.**

Dev Neurorehabil. 2013 Jul 19.

[Epub ahead of print]

Pau M, Galli M, Celletti C, Morico G, Leban B, Albertini G, Camerota F.

**Plantar pressure patterns in women affected by Ehlers-Danlos syndrome while standing and walking.**

Res Dev Disabil. 2013 Sep 7;34(11):3720-3726.

Pau M, Galli M, Crivellini M, Albertini G.

**Relationship between obesity and plantar pressure distribution in youths with Down Syndrome.**

Am J Phys Med Rehabil. 2013 Apr 29.

[Epub ahead of print]

Rigoldi C, Cimolin V, Camerota F, Celletti C, Albertini G, Mainardi L, Galli M.

**Measuring regularity of human postural sway using approximate entropy and sample entropy in patients with Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type.**

Res Dev Disabil. 2013 Feb;

34(2):840-846.

Sale P, De Pandis MF, Stocchi F, Domenica LP, Sova I, Cimolin V, Ancillao A, Albertini G, Galli M, Franceschini M.

**Robot-assisted walking training for individuals with Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial.**

BMC Neurol. 2013 May 24;13(1):50.

[Epub ahead of print]

Vimercati SL, Galli M, Rigoldi C, Ancillao A, Albertini G.

**Feedback reliance during an arm-tapping task with obstacle avoidance in adults with Down syndrome.**

Exp Brain Res. 2013 May;  
226(4):631-638.

## PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SENZA IMPACT FACTOR

De Pisi F, Palma E, Bondi R.

**Variatione dei patterns stabilometrici e della BBS-It nei pazienti con malattia di parkinson sottoposti a training per l'equilibrio ed a training idrochinesiterapico.**

Poseidonia Medicina. 2013;14(40):28-31.

Gison A.

**Riabilitazione nelle protesi d'anca: Stato dell'arte.**

Poseidonia Medicina. 2013;14(40):25-27.

Sale P, Franceschini M.

**Nuove frontiere robotiche e la riabilitazione per il cammino. MENTI ATTIVE.**

La Ricerca in Riabilitazione nelle Marche. 2013;2(1):57-59.

Mazzoleni S, Carrozza MC, Sale P, Franceschini M, Posteraro F, Tiboni M.

**Effects of upper limb robot-assisted therapy on motor recovery of subacute strokepatients: A kinematic approach.**

IEEE Int Conf Rehabil Robot. 2013 Jun;2013:1-5.

Cardinale A, Biocca S.

**Gene-Based Antibody Strategies for Prion Diseases.**

Int J Cell Biol. 2013. Epub 2013 Aug 21.

Alessio Cardinale, Roberto Chiesa, and Michael Sierks, Guest editors **Special Issue Protein Misfolding and Neurodegenerative Diseases,**

Int J Cell Biol. 2013. Epub 2013 Aug 21.

Caminiti G, Volterrani M, Cerrito A, Spasato B, Rosano G.

**Lack of benefits of endurance training in patients with chronic heart failure: role of asymptomatic peripheral artery disease.**

International Journal of Physical Medicine & Rehabilitation. 2013;1(7).

Fini M, Volterrani M.

**Role of regulatory authorities in healthcare delivery for the elderly.**

Giornale italiano di cardiologia (2006). 2013 03;14(3):31-34.

Mammi C, Calanchini M, Antelmi A, Ferraco A, Gnessi L, Falcone S, Quintarelli F, Rosano GM, Fabbri A, Caprio M.

**Bisphosphonates and adipogenesis: Evidence for alendronate inhibition of adipocyte differentiation in 3T3-L1 preadipocytes through a vitamin D receptor mediated effect.**

Natural Science. 2013;5(8):955-962.

Richards M, Di Somma S, Mueller C, Nowak R, Peacock WF, Ponikowski P, Mockel M, Hogan C, Wu AHB, Clopton P, Filippatos GS, Anand I, Ng L, Daniels LB, Neath S, Shah K, Christenson R, Hartmann O, Anker SD, Maisel A.

**Atrial fibrillation impairs the diagnostic performance of cardiac natriuretic peptides in dyspneic patients. Results from the BACH study (biomarkers in ACute heart failure).**

JACC: Heart Failure. 2013 June 1;1(3):192-199.

Rosano GM, Spoletini I, Vitale C, Volterrani M.

**Evaluating the metabolic approach to treatment of diabetic coronary patients.**

IJC Metabolic & Endocrine. 2013 10/07. [Epub ahead of print]

Rizza S, Montagna C, di Giacomo G, Cirotti C, Filomeni G, Filomeni G.

**S-nitrosation and ubiquitin-proteasome system interplay in neuromuscular disorders.**

International journal of cell biology 2013 [Epub ahead of print]

Hu J, Tan EY, Campo L, Leek R, Seman Z, Turley H, Delia D, Cesario A, Gatter K, Pezzella F.

**TRAP1 is involved in cell cycle regulated by retinoblastoma susceptibility gene (RB1) in early hypoxia and has variable expression patterns in human tumors.**

Journal of Cancer Research. 2013;2(3):195.

Nicolotti N, Cattel C, Gualano MR, Soriano A, Manna R, Boccia S.

**A retrospective analysis of 3 156 admissions with fever of unknown origin in a large italian hospital.**

Epidemiology, Biostatistics and Public Health. 2013;10(4):e8776

Posteraro B, Persiani R, Dall'Armi V, Biondi A, Arzani D, Sicoli F, Bonassi S, D'Ugo D, Ricciardi W, Boccia S.

**Prognostic factors and outcomes in italian patients undergoing curative gastric cancer surgery.**

European Journal of Surgical Oncology (EJSO). [Epub ahead of print]

Pirozzi G, Ferro G, Langellotto A, Della-Morte D, Galizia G, Gargiulo G, Cacciatore F, Ungar A, Abete P.

**Syncope in the elderly: an update.**

Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics. 2013 09/01;4(3):69-74.

Mazzoleni S, Sale P, Tiboni M, Franceschini M, Posteraro F, Carrozza MC.

**Upper Limb Robot-Assisted Therapy in Chronic and Subacute Stroke Patients: A Kinematic Analysis.**

In: Pons JL, Torricelli D, Pajaro M, editors. Springer Berlin Heidelberg; 2013; p. 129-33. DOI: 10.1007/978-3-642-34546-3-21

F. Stocchi

**Conventional treatment-related motor complications: their prevention and treatment.**

In. Parkinson Disease and Other Movement Disorders. Wolters & Baumann (eds) VU University Press Amsterdam. pag. 255-270

Lettieri Barbato D, Aquilano K, Tatulli G and Ciriolo M.R.

**Role of reactive oxygen species in adipocytes differentiation.**

In: "Adipogenesis: Signaling Pathways, Molecular Regulation and Impact on Human Disease" (Yunfeng Lin ed.) Nova Science Publishers, Inc (2013).



## PARTECIPAZIONI A CONGRESSI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

Fini M. Intervento:

**"L'accesso ai farmaci biologici e la questione dei biosimilari"**, dodicesima Conferenza Nazionale sulla farmaceutica "L'accesso ai farmaci biologici: come coniugare esigenze cliniche e razionalizzazione delle risorse", Catania, Gennaio 2013

Fini M. Intervento:

**"Gestione del paziente complesso. Quale sostenibilità per il Servizio Sanitario Nazionale"**, Workshop "Multidimensionalità nella cura: gestione e studio dei pazienti a ciclo continuativo residenziale", Iglesias, Marzo 2013

Fini M. Intervento:

**"Metodologia dell'approccio nel paziente con multimorbilità"**; Moderatore Tavola Rotonda "Come Integrare le varie specialità"; convegno Grandangolo 2013 "Multimorbilità e cancer serivo in oncologia ed ematologia. Due problematiche emergenti", Roma, Marzo 2013

Fini M. Tavola Rotonda:

**"La valutazione costo-beneficio dei farmaci nell'anziano"**, Congresso "Anziano e Farmaci - II Edizione", Padova, Maggio 2013

Fini M. Intervento:

**"Gestione del Malato Complesso"**, Incontri Clinico Radiologici 2013 "L'Imaging dei numeri... i numeri dell'imaging", Olbia-Tempio, Maggio 2013

Fini M. Intervento:

**"Farmaci e sostenibilità economica"**, XI Congresso Nazionale SICOA, Cagliari, Maggio 2013

Fini M. Intervento:

**"La problematica dell'aderenza alla terapia nel paziente anziano in politrattamento"**, "6° Forum Nazionale Pharma: Ricerca Innovazione in Farmacologia", Cagliari, Maggio 2013

Fini M. Moderazione:

**"Urgenze neurologiche"**, "Incontri clinico-radiologici di neuroscienze "Michela Bonamini" IV Edizione", Ponza, Giugno 2013

Fini M. Moderazione Tavola rotonda:

**"Esiste un rischio d'abuso di farmaci oppiacei in Italia?"**, Workshop IMPACT proactive 2013 - "closing the gap", Firenze, Giugno 2013

Fini M. Lezione:

**"Dolore cronico nell'anziano"**, Master di Terapia del Dolore e Master di Cure Palliative, Parma, Settembre 2013

Fini M. Tavola rotonda:

**"I processi di HTA in uso nelle agenzie nazionale e regionali. Un confronto con i rappresentanti istituzionali"**, Seconda edizione Summer School per leader civici sull'HTA, Roma, Settembre 2013

Fini M. Moderazione sessione:

**"I trattamenti farmacologici nel paziente geriatrico e nel dolore complesso"**, Congresso Nazionale FederDolore - Sicd 2013 "Insieme per migliorare la Cura delle Persone con Dolore", Roma, Ottobre 2013

Fini M. Intervento:

**"Polifarmacia nella terapia dell'anziano"**, Convegno Nazionale in Ematologia HaematoForum, Milano, Ottobre 2013

Fini M., Moderazione sessione:

**"Longevità come progettare casa e prodotti"**, Convegno Italia Longeva "L'anziano e la Tecno-assistenza, il Servizio Sanitario Nazionale e l'Industria", Roma, Ottobre, 2013

Fini M., Moderazione presentazione del Quaderno della Salute:

**"Criteri di appropriatezza clinica, tecnologica e strutturale nella assistenza del paziente complesso"**, intervento: "La medicina della complessità", Roma, Ottobre 2013

Fini M. Discussant Tavola rotonda:

**"The final question: so what"**, intervento: "Adherence to therapy and sustainability: a new paradigm for the future", 36° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia "Il ruolo della Ricerca farmacologica per la crescita e la Salute in Italia", Torino, Ottobre 2013

Fini M. Intervento Tavola rotonda:

**"Documento di Consensus"**: quale stile di vita nelle polipatologie croniche", 68° Congresso Nazionale FIMMG-Metis "La tecnologia nello studio del medico di famiglia: coniugare approccio olistico e high tech", Roma, Novembre 2013

Fini M. Introduzione

**"Nutrizione e declino cognitivo"** in "Anziano Fragile" - VII Congresso Regionale della Federazione Italiana di Medicina Geriatrica ( FIMeG ) sezione Lazio della UOC Geriatria del Nuovo Regina Margherita IX Edizione, Roma, Novembre 2013

Fini M. Moderatore:

**"Uso di farmaci nutraceutici per la riabilitazione"**, VII Congresso Nazionale SIRAS "Ricerca, innovazione e nuove tecnologie in riabilitazione", Roma, Novembre 2013

Fini M. Intervento:

**"Anziani e crisi economica: quale impatto?"**, 58° Congresso Nazionale SIGG, Torino, Novembre 2013

Fini M. Intervento:

**"La politerapia nel paziente anziano. Dagli aspetti medici a quelli socioeconomici"**, sessione "Problemi clinici in neuro geriatria", XXIII Convegno Nazionale della Società Italiana di Neurogeriatria Nuove Frontiere, Roma, Dicembre 2013

Fini M. Moderazione convegno:

**"L'evento acuto nel paziente cronico. Quale gestione?"**, Cassino, Dicembre 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Le Criticità di Attivazione di un Registro Nazionale"**, XIII Congresso Nazionale SIRN (Società Italiana di Riabilitazione Neurologica), Bari, Aprile

2013

Sale P. Intervento:

**"Riabilitazione del cammino robot assistita in pazienti con Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP) Valutazioni cliniche e strumentali"**, XIII Congresso Nazionale SIRN (Società Italiana di Riabilitazione Neurologica), Bari, Aprile 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Hand robotic rehabilitation"** Joint Meeting COST/IRNRG Versilia Hospital, Maggio 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Gait analysis and robotic rehabilitation in Parkinson Disease"**, Congresso della Società Internazionale di Riabilitazione (ISPRM), Pechino, Giugno 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Advances in Stroke Rehabilitation"**, Congresso della Società Internazionale di Riabilitazione (ISPRM), Pechino, Giugno 2013

Franceschini M. Lecture:

**"I meccanismi neurobiologici del recupero: esercizio terapeutico e plasticità"**, Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER), Roma, Ottobre 2013

Sale P. Intervento:

**"La robotica come possibile intervento riabilitativo nella MDP"**, Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER), Roma, Ottobre 2013

Sale P. Intervento:

**"Riabilitazione robotica dell'arto superiore nell'ictus"**, Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER), Roma, Ottobre 2013

Lombardi V. Intervento:

**"Identificazione di fattori predittivi nel ritorno all'attività lavorativa in soggetti con esiti di cerebrolesioni"**, Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER), Roma, Ottobre 2013

Galafate D. Intervento:

**"Utilizzo della riabilitazione robotica nel recupero funzionale della mano in soggetti con esiti di ictus"**, Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Fisica e Riabilitativa (SIMFER), Roma, Ottobre 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Clinical syndromes: description of the main impairments"**, Scuola permanente di Riabilitazione del Forum Mediterraneo di Riabilitazione, Siracusa Ottobre 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Robot-assisted therapy in S.C.I."**, Scuola permanente di Riabilitazione del Forum Mediterraneo di Riabilitazione, Siracusa Ottobre 2013

Franceschini M. Intervento:

**"Clinical application of ASIA criteria"**, Scuola permanente di Riabilitazione del Forum Mediterraneo di Riabilitazione, Siracusa Ottobre 2013

Sale P. Intervento:

**"Il recupero della destrezza nel soggetto emiparetico"**, Corso di Aggiornamento Società Italiana di Riabilitazione Neurologia (SIRN), Ancona, Dicembre 2013

Barbanti P. Intervento:

**"La scelta della terapia preventiva nell'emigrania."**, Bologna, Dipartimento Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna "Alma Mater Studiorum", Cefalea 2013, Bologna, febbraio 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Cefalee Croniche: le tipologie cliniche"**, XI Corso Formazione ASC - Associazione per una Scuola delle Cefalee di Formazione su Cefalee e Dolori Cranio-facciali, Frascati, Aprile 2013.

Barbanti P. Intervento:

**"Emicrania e cefalea di tipo tensivo: Percorsi gestionali tra vecchi dubbi e nuove certezze"**, LIII Congresso Nazionale Scienze Neurologiche Ospedaliere (SNO), Firenze, maggio 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Emicrania e ipertensione"**, Napoli Cuore 2013, Napoli, Giugno 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Le cefalee in pronto Soccorso"**, Incontri Clinico-Radiologici di Neuroscienze "Michela Bonomini", Ponza, Giugno 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Emicrania e cefalea di tipo tensivo: percorsi gestionali tra vecchi dubbi e nuove certezze"**, XLIV Congresso Nazionale Società Italiana di Neurologia (SIN), Milano, Novembre 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Le cefalee in medicina interna"**, XI Corso - Associazione per una Scuola delle Cefalee di Formazione su Cefalee e Dolori Cranio-facciali, Frascati, Novembre 2013.

Barbanti P. Intervento:

**"Cefalee nell'anziano: dal rapporto con l'ipertensione arteriosa alla gestione terapeutica"**, XXIII Congresso Nazionale Società Italiana di Neurogeriatria (SINeG), Roma, Dicembre 2013

Barbanti P. Intervento:

**"Unilateral cranial autonomic symptoms in migraine: a retrospective case series on 757 patients"**, International Headache Congress, Giugno, Boston

Barbanti P. Intervento:

**"Headache in Olympic Athletes"**, International Headache Congress, Giugno, Boston

Radicati F.G. Intervento:

**"Intervento psicologico di gruppo con i pazienti parkinsoniani e i loro caregivers"**, Congresso Nazionale Congiunto LIMPE/DISMOV-SIN, Roma, Ottobre 2013

Fossati C. Intervento:

**"Studio di comorbidità in pazienti geriatrici affetti da malattia di Parkinson"**, Congresso Nazionale Congiunto LIMPE/DISMOV-SIN, Roma, Ottobre 2013

Torti M. Intervento:

**"Confronto tra il profilo farmacocinetico della formulazione effervescente melevodopa/carbidopa e della formulazione standard di levodopa/carbidopa nella malattia di Parkinson"**, Congresso Nazionale Congiunto LIMPE/DISMOV-SIN, Roma, Ottobre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Mechanical foot stimulation in the treatment of Parkinson's disease"**, XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders. Genova, Dicembre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Video educational regarding: Parkinson's Disease: How to give an accurate diagnosis from other similar neurological diseases?"**, Pre-congress Annual meeting of Neurological Society of Thailand 2013 – Thai MS society Educational Program, Bangkok, Marzo 2013

Stocchi F. Intervento:

**"How to deal with Parkinson's disease"**, Pre-congress Annual meeting of Neurological Society of Thailand 2013 – Thai MS society Educational Program, Bangkok, Marzo 2013

Stocchi F. Intervento:

**"MAO-B and COMT- inhibitors: their place in 2013 and beyond?"**, Open Issues In Parkinson's Disease: Question and Answers. Cuglieri (Or), Maggio 2013

Stocchi F. Chairman:

**"Levodopa-induced motor complications: New insights into risk and management"**, 17th International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Sydney, Giugno 2013

Stocchi F. Intervento:

**"MAO B Inhibitors for Alzheimer and Parkinson Disease"**, The 1st International Conference on New Therapies for Parkinson and Alzheimer Disease (IPAD). Pisa, Settembre 2013

Stocchi F. Intervento: Course III:

**"Attempts to obtain neuroprotection in Parkinson's disease: status of current therapies"**, 3rd

World Parkinson Congress, Montréal, Ottobre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Slowing clinical progression in PD – can it proved in clinical trials?"**, 3rd World Parkinson Congress, Montréal, Ottobre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Educational Session – State of the art: treatment in Parkinson's disease"**, XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Genova, Dicembre 2013

Stocchi F. Oral Poster Session:

**"Mechanical foot stimulation in the treatment of Parkinson's disease"**, XX World Congress on Parkinson's Disease and Related Disorders, Genova, Dicembre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Esiste una terapia neuroprotettiva?"**, Il Parkinson oltre la terapia, Andria (BA), marzo 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Disturbi gastroenterologici, urologici e cardiovascolari"**, Corso Avanzato "Bruno Bergamasco" LIMPE 2013 Non-dopaminergic Parkinson's disease, Torino, maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Update sulla terapia: Ipocinesie"**, VIDEOCORSO DISMOV-SIN La semiologia dei disturbi del movimento, Pescocostanzo (Aq), maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Inquadramento diagnostico differenziale dei Parkinsonismi – video corso"**, L'inquadramento diagnostico e terapeutico della malattia di Parkinson, Oliena (NU), maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Cambiamento della risposta terapeutica: clinica e fisiopatologia"**, L'inquadramento diagnostico e terapeutico della malattia di Parkinson, Oliena (NU), maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Gestione terapeutica del paziente nella se-**

**conda fase di malattia"**, L'inquadramento diagnostico e terapeutico della malattia di Parkinson, Oliena (NU), maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Presentazione casi clinici"**, L'inquadramento diagnostico e terapeutico della malattia di Parkinson, Oliena (NU), maggio 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Sintomi prodromici nella malattia di Parkinson e terapia della fase iniziale; cosa dicono le nuove linee guida"**, PARKINSON 2013, Bari, novembre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Come migliorare la terapia del Parkinson: Sono stanco di essere stanco!"**, Il Congresso Nazionale Congiunto LIMPE/DISMOV-SIN, Roma, Ottobre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Trial clinici e pratica clinica: conferme e punti di incontro"**, XLIV Congresso della Società Italiana di Neurologia SIN, Milano, novembre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Gestione clinica del WO: ottimizzare la terapia in base alle esigenze del paziente"**, XLIV Congresso della Società Italiana di Neurologia SIN, Milano, novembre 2013

Stocchi F. Intervento:

**"Prospettive per il futuro"**, Convegno del Ventennale Associazione Azione Parkinson Onlus: Parkinson, ieri oggi e domani, Roma, Dicembre 2013

De Chiara G, Racaniello M, Mollinari C, Marcocci ME, Aversa G, Cardinale A, Giovannetti A, Garaci E, Merlo D. Poster:

**"Herpes simplex virus-type1 (HSV-1) impairs DNA repair in cortical neurons, causing accumulation of DNA damage and contributing to neurodegeneration"**, the 11th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's diseases, Firenze, Marzo 2013

Mollinari C, Pieri M, Racaniello M, de Stefano MC, Cardinale A, Zona C, Garaci E, Merlo D. Poster:

**"Recombinant adeno-associated virus-mediated miR34a overexpression increases progenitor cell proliferation and modifies dendrite morphology of newborn neurons in vitro and in vivo"**. American Society for Cell Biology (ASCB), 14-18 Dicembre 2013, New Orleans, USA

Palma E. Intervento:

**"Trasmissione GABA-ergica ed epilessia"**, Nuove strategie terapeutiche nella gestione del paziente con epilessia, Perugia, novembre 2013

Palma E. Intervento:

**"Neuromodulazione della trasmissione GABA-ergica nell'epilessia"**, Neuromodulazione 2013: la Neuromodulazione nelle epilessie, Policlinico Universitario A. Roma 24 maggio 2013 Università Cattolica Gemelli

Palma E. Intervento:

**"What came first, Epilepsy or GABA?"**, Università di Ferrara, Dicembre 2013

Palma E. Intervento:

**"Può il tessuto chirurgico prelevato dal paziente essere utile per sviluppare nuovi farmaci?"**, Lega Italiana contro l'Epilessia (LICE), Roma, giugno 2013

Palma E, Roseti C, Fucile S, Lauro C, Martinello K, Ruffolo G, Aronica E, Limatola C. Poster: **"Modulation of GABAA receptors by fractalkine in human epilepsy"**, Society for Neuroscience, San Diego (USA), novembre 2013

Aquilano K, Baldelli S, Lettieri Barbato D, Ciriolo MR. Poster:

**"PGC-1alpha co-activates the TFAM-mediated expression of mitochondrial DNA encoded genes"**, Cell Symposia on Mitochondria – Mitochondria: from Signaling to Disease, Lisbona (Portogallo), Maggio 2013

Lettieri Barbato D, Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR. Poster:

**"Mitochondrial ROS trigger metabolic adaptive response in nutrient starved adipocytes"**, 54th International Conference on the Bioscience of Lipids – Linking Transcription to Physiology in Lipidomics, Bari, Settembre 2013

Volterrani M. Lettura:

**"La gestione del paziente con Fibrillazione Atriale: il ruolo dei Nuovi Anticoagulanti Orali"**, Convegno Regionale SICOA "Malattie cardiovascolari e condizioni associate" – Rezzano (BS), Gennaio 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Scompenso cardiaco e nefropatia cronica"**, Corso di aggiornamento SICOA "La gestione del paziente a rischio cardiovascolare: strategie a confronto" – Firenze, Febbraio 2013

Volterrani M. Intervento alla IV° Sessione: **"Esercizio fisico e scompenso cardiaco cronico: un nuovo approccio terapeutico"** Convegno "Novità emergenti in cardiologia", Lecce, Marzo 2013

Volterrani M. Moderatore della sezione: **"Insufficienza cardiaca"**, Corso Superiore di aggiornamento in cardiologia, Milano, Aprile 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Rehabilitation management of patients with atherosclerosis"**, Sessione: Atherosclerosis: treatment argot and target organ damage evaluation in the setting of cardiology practice, Congresso Europevent, Roma, Aprile 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Ivabradina: frequenza cardiaca bass, vità più lunga"**, Corso di formazione "I nuovi percorsi terapeutici della cardiopatia ischemica: tutto quello che il medico deve sapere", Lecce, maggio 2013

Volterrani M. Moderatore:

**"strategie terapeutiche per migliorare l'aderenza e ridurre la mortalità cardiovascolare nel paziente ad alto rischio"**, XI Congresso Nazionale SICOA,

Santa Margherita di Pula (CA) Maggio 2013

Volterrani M. Relazione:

**"FOCUS SICOA sulla gestione del paziente con Fibrillazione Atriale. Lo studio ISPAF 1 e 2"**, XI Congresso Nazionale SICOA, Santa Margherita di Pula (CA) Maggio 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Head of the Local Organizing Committee and Speaker - Management of Stroke: the guidelines and how to implement them"**, Annual Scientific Meeting of the ISCP - International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy, Roma, Giugno 2013

Volterrani M. Coordinatore dell'evento per conto della stessa SICGe e Moderatore del work shop: **"Lo scompenso cardiaco cronico"**, Eventi Macroregionali SICGe – Società Cardiologia Geriatrica – Roma, Settembre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Quando e perché il cardiologo usa l'ivabradina"**, Congresso "Le relazioni pericolose", Napoli, Settembre 2013

Volterrani M. Moderatore della III Sessione: **"La cardiopatia ischemica nel mondo reale"**, Congresso "Le relazioni pericolose", Napoli, settembre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Il protocollo Augment HF: rationale dello studio"**, Seminario Nazionale SICOA – Sorrento, Ottobre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Prescrizione degli Omega 3 e rapporti con le istituzioni"**, Progetto A.A.A.- Alliance Against Atherosclerosis, Bologna, ottobre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Indagine ISYDE.13"**, Congresso Cardioprevent, "Le comorbilità nel cardiopatico", Napoli, Ottobre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Riabilitazione cardiologica del paziente scom-**

**pensato: la realtà italiana**", Advances in Cardiac Electrophysiology, Roma, Novembre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Teleassistenza cardiologica di una rete integrate di RSA: dati preliminari e formazione degli operatori"**, Workshop della ASL RM D "Malattie croniche e telemedicina: strumenti e modelli innovativi per la prevenzione in Europa" Fiumicino (RM), Novembre 2013

Volterrani M. Moderatore della sessione: **"Global cardiovascular risk: workshops on Hypertension"**, Joint ISCP and St Georges 's University of London Workshop on "Management of Hypertension, atrial fibrillation and stroke", Londra, Dicembre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"ISPICA - An Italian snapshot of patients with ischemic heart disease"** Workshop ISCP e IK+EM "Institute for Clinical and Experimental Medicine: New Trends in Cardiovascular Medicine", Praga, Dicembre 2013

Volterrani M. Relazione:

**"Lo studio ISPICA"**, 74° Congresso Nazionale SIC, Roma 16 Dicembre 2013

Volterrani M. Docenza:

**"Casi clinici sullo scompenso cardiaco"**, CAtedra - "Progetto CARMA, Experiential Training on CARdiology with Multiprofessional Approach", Padova, Settembre 2013

Marazzi G. Docenza:

**"Casi clinici sullo scompenso cardiaco"**, "Progetto CARMA, Experiential Training on CARdiology with Multiprofessional Approach", Padova settembre 2013, ottobre 2013; novembre 2013

Marazzi G. Relazione:

**"Ipercolesterolemia: alternative terapeutiche"**, Congresso "Cardiologia nel Lazio", Roma, Marzo 2013

Marazzi G. Relazione:

**"Nutraceutici: quando utilizzarli"**, Percorsi terapeutici 360° "Meet the expert in cardiologia",

Roma, Aprile 2013

Marazzi G. Relazione:

**"Rischio cardiovascolare in prevenzione secondaria"**, Corso Formativo: "Approccio globale al paziente cardio-cerebrovascolare: l'importanza della prevenzione primaria e secondaria", Roma, Aprile 2013

Marazzi G. Relazione:

**"Ipercolesterolemia: quando e come trattare"**, Congresso "Controversie in patologie cardiovascolari", Napoli, Maggio 2013

Guadagni F. Relazione:

**"Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition: an opportunity for novel interventions against lung cancer"**, BIT's 2nd Lung Cancer Summit-2013, Roma, Dicembre 2013

Ferroni P. Relazione:

**"High-Sensitive D-dimer Determination Predicts Chemotherapy-Associated Venous Thromboembolism in Lung Cancer Patients"**, BIT's 2nd Lung Cancer Summit-2013, Roma, Dicembre 2013

Palmirota R. Relazione:

**"Tumori Ereditari"**, Convegno Interbreast 2013 - Regione Lazio - Azienda Ospedaliera San Giovanni Addolorata, Roma, Marzo 2013

Della Morte D. Relazione:

**"Carotid Intima-Media Thickness and Carotid Plaque are Distinct Atherosclerotic Phenotypes"**, European Stroke Conference 2013, Londra, Maggio 2013

Della Morte D. Relazione:

**"High-Density Lipoprotein Cholesterol Subfractions and Carotid IMT: The Northern Manhattan Stroke Study (NOMAS)"**, European Stroke Conference 2013, Londra, Maggio 2013.

Riondino S.

**"Test di funzione piastrinica"**, IV Corso Nazionale di aggiornamento PIASTRINE 2013, Milano, Novembre 2013

Kuo F, Della-Morte D, Gardener H, Cabral D, Elkind M.S.V, Sacco R.L, Rundek T. Poster: **"Association between Carotid Stiffness and Carotid Plaque: The Northern Manhattan Study"**. International Stroke Conference, AHA, Honolulu, Hawaii, USA, Febbraio 2013

Tiozzo E, Gardener H, Hudson BI, Dong C, Weiss D, Della-Morte D, Elkind MS, Disla N, Wright CB, Sacco RL, Rundek T. Poster: **"Association between High-Density Lipoprotein Cholesterol Subfractions and Carotid Intima-Media Thickness: The Northern Manhattan Stroke Study (NOMAS)"**, Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Conference 2013, Lake Buena Vista, FL, USA, Maggio 2013

Roselli M, Ferroni P, Riondino S, Mariotti S, Laudisi A, Vergati M, Cereda V, Cavaliere F, Palmirota R, Guadagni F. Poster: **"Impact of Chemotherapy on Activated Protein C-Dependent Thrombin Generation – Association with venous thromboembolism occurrence"**, European Cancer Congress – Reinforcing Multidisciplinarity, Amsterdam, Settembre – Ottobre 2013

Formica V, Cereda V, Di Bari MG, Grenga I, Tesaurro M, Palmirota R, Ferroni P, Guadagni F, Roselli M. Poster: **"Peripheral CD45RO, PD1 and TLR4 expression in metastatic (m) colorectal cancer (CRC) patients (pts) treated with bevacizumab/5FU/CPT11 (B-FOLFIRI)"**, European Cancer Congress – Reinforcing Multidisciplinarity, Amsterdam, Settembre – Ottobre 2013

Nardecchia A, Morelli C, Formica V, Cereda V, Tracey C, Palmirota R, Ferroni P, Guadagni F, Roselli M. Poster: **"Neutrophil-lymphocyte ratio in pancreatic cancer patients treated with gemcitabine"**, XV Congresso Nazionale AIOM, Milano, Ottobre 2013.

Vergati M, Della Morte D, Ferroni P, Cereda V, Tosetto L, Riondino S, La Farina F, Guadagni F, Roselli M. Poster: **"Increased Risk of Chemotherapy-Associated**

**Venous Thromboembolism in Elderly Patients with Cancer"**, Atti del 114° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina Interna, Roma, Ottobre 2013

Rosano G. Relazione: **"Developing Therapies for Heart Failure with Preserved Ejection Fraction Patients: patient populations and end points"**, FDA Meeting on Regulatory issues in Heart Failure, Febbraio 2013

Rosano G. Relazione: **"What a busy clinician needs to know about hypertension: Emerging pharmacological and non-pharmacological therapies"**, Congresso ESC, Heart Failure Association, Lisbona, Maggio 2013

Rosano G. Relazione: **"Treatment development for anabolics in chronic heart failure: relevant endpoints and safety considerations"**, Congresso ESC, Heart Failure Association, Lisbona, Maggio 2013

Rosano G. Relazione: **"La problematica del conflitto d'interesse per il main investigator degli studi clinici"**, Forum Società Italiana di Farmacologia – Chia Laguna – Giugno 2013

Rosano G. Relazione: **"Come conciliare innovazione e sostenibilità"**, XI Congresso Nazionale SICOA – Santa Margherita di Pula, Maggio 2013

Rosano G. Relazione: **"Cardiovascular therapy - expert opinion"**, World Congress of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy, Roma, Giugno 2013

Rosano G. Relazione: **"Novel therapies in management of CAD"**, Annual Congress Myanmar Cardiac Society, Ottobre 2013

Rosano G. Relazione: **"EMA Regulatory Perspective: The role of stu-**



**dy design and PI expertise on the need for adjudication?"**, FDA - Cardiovascular Research Consortium – Endpoint adjudication, Washington, Novembre 2013

Rosano G. Relazione:

**"Regulatory endpoints"**, AIFA/EMA/HFA Meeting on regulatory issues in Heart Failure, Roma, Novembre 2013

Rosano G. Relazione:

**"Evidence for beta-blocker in post MI patients without LVD, still valid?"**, CVCT 2013, Parigi, Dicembre 2013

Rosano G. Relazione:

**"Developing therapies for cachexia & sarcopenia"**, VII Cachexia Conference, Kobe/Osaka, Giappone, Dicembre 2013

Sgarbanti R. Relazione:

**"Influenza virus and intracellular redox state: characterization of redox-sensitive molecular targets for innovative antiviral strategies"**, Target Meeting 2nd world molecular & cell biology online conference, Febbraio 2013

Chirullo B., Sgarbanti R., Shytai IL, Norelli S., Boe A., Limongi D., Della Corte A., Biffoni M., Lewis M.G., Palamara A.T., Garaci E., Savarino A: **"Pro-oxidant drug auranofin is able to reduce the lifespan of the central and transitional memory CD4+ T cells, thus targeting the viral reservoir in SIV- mac251 infected macaques"**, Workshop on "HIV cure and eradication: a feasible option?", Milano, Gennaio 2013

Sgarbanti R, Amatore D, Nencioni L, Fraternali A, Magnani M, Garaci E, Palamara AT:

**"Is it possible to fight influenza by targeting intracellular redox state?"**, VIII Options for the control of influenza ,Cape Town, Sud Africa, Settembre 2013

Sgarbanti R, Amatore D, Celestino I, Nencioni L, Garaci E, Palamara AT:

**"Efficacia degli antiossidanti nel combattere l'influenza: una questione aperta"**, 41° congresso della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, Ottobre 2013

Limongi D, Sgarbanti R, Coluccio P, Garaci E, Palamara AT,

**"Indagine sieroproteomica in pazienti affetti da sepsi e valutazione dell'efficacia dell'antiossidante ACS-15 in un modello murino di shock settico"**, 41° Congresso della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, Ottobre 2013

Amatore D, Sgarbanti R, Aquilano K, Baldelli S, Limongi D, Civitelli L, Ciriolo MR, Garaci E, Nencioni L, Palamara AT:

**"La produzione di ROS mediata dalla NOX4 regola la replicazione del virus dell'influenza A"**, 41° congresso della Società Italiana di Microbiologia Riccione, Ottobre 2013

## AREE DI RICERCA IRCCS SAN RAFFAELE PISANA

Le attività di ricerca prevedono una organizzazione in Aree di Ricerca supportata dall'**Unità di Epidemiologia Clinica e Molecolare** che mette a anche disposizione dei ricercatori un servizio di Biostatistica. Responsabile: Stefano Bonassi.

### AREA DI RICERCA

**Riabilitazione Neuromotoria**  
**Parkinson e Disturbi del Movimento**  
**Cefalee e dolore neuropatico**  
**Riabilitazione Cardiovascolare**  
**Centro di Ricerca Clinica e Sperimentale**  
**Approcci di sistema e malattie non trasmissibili**  
**Disabilità dello Sviluppo**  
**Biotecnologie Avanzate**  
**Organizzazione e gestione dei servizi**  
**Diagnostica per Immagini**  
**Robotica riabilitativa**

### RESPONSABILE

Marco Franceschini  
Fabrizio Stocchi  
Piero Barbanti  
Maurizio Volterrani  
Giuseppe Rosano  
Alfredo Cesario  
Giorgio Albertini  
Fiorella Guadagni  
Natale Santucci  
Alberto Pierallini  
Patrizio Sale

## CENTRO RICERCHE IRCCS SAN RAFFAELE PISANA RICERCA DI BASE - TRASLAZIONALE

LABORATORIO	RESPONSABILE	STAFF
Immunologia Molecolare e Cellulare	Andrea La Sala	Lucia Gatta, Stefania Gorini, Laura Pontecorvo
Endocrinologia Cardiovascolare	Massimiliano Caprio	Antonella Antelmi, Andrea Armani, Matilde Palanchini, Alessandra Feraco, Caterina Mammi, Vincenzo Marzolla
Sviluppo e Metabolismo del Muscolo Scheletrico	Elisabetta Ferraro	Francesca Molinari
Neurobiologia molecolare e cellulare	Daniela Merlo	Alessio Cardinale, Marco Papale, Serena Saladini
Patologia molecolare e cellulare	Matteo Antonio Russo	Elena De Santis, Antonia Germani, Bruna Pucci, Valentina Reali, Alessandra Runci, Luigi Sansone, Marco Tafani
Elettrofisiologia	Eleonora Palma	Cristina Roseti
Biochimica dell'Invecchiamento	Maria Rosa Ciriolo	Katia Aquilano, Giuseppe Filomeni, Giuseppina Di Giacomo, Costanza Montagna
Farmacogenetica	Raffaele Palmirotta	Giorgia Ludovici, Barbara Leone
Nutrizione Umana	Giuseppina Morabito	Mauro Serafini, Daniele Lettieri Barbato, Serena Terrazzi, Chiara Lo Schiavo
Neurofisiologia	Claudio Del Percio	Francesco Infarinato, Roberta Lizio
Patologie cronico-degenerative	Anna Teresa Palamara	Rossella Sgarbanti

## AREA DI RICERCA

### Neuromotoria

### RESPONSABILE

M. Franceschini

### STAFF

D. Le Pera, E. Palma, V.S. Tolli, P. Sale, V. Lombardi, D. Galafate

I progetti elaborati dall'Area di ricerca si dividono in due ampie aree:

- lo studio dei dati epidemiologici di alcune patologie neurologiche che determinano importanti limitazioni funzionali.
- l'analisi di quanto di innovativo emerge dalla ricerca base e di laboratorio in ambito tecnologico.

Nel primo caso le informazioni ricavate possono consentire di influenzare e correggere al meglio il percorso riabilitativo.

Nel secondo caso invece è possibile acquisire strumenti o idee per proporre approcci riabilitativi innovativi, specie laddove l'ambito riabilitativo ha ancora dei grossi limiti (ad esempio recupero di una attività funzionale all'arto superiore nelle persone con esiti di ictus, mantenimento/miglioramento del cammino nelle persone con malattia di Parkinson).

L'obiettivo finale è quello di migliorare la presa in carico in ambito riabilitativo della persona con disabilità e la qualità della vita dei pazienti.

Gli interessi dell'Area sono focalizzati sulle seguenti tematiche:

- riabilitazione robotica arto superiore - per ottenere un recupero funzionale dell'arto superiore nelle persone con esiti di stroke;
- riabilitazione robotica del cammino - per il monitoraggio e lo studio del recupero della sicurezza e capacità di cammino nella persona con malattia di Parkinson e con esiti di stroke;
- studi elettrofisiologici sul recupero funzionale dell'arto superiore in persone con esiti di stroke dopo trattamento innovativo riabilitativo;
- studi sul monitoraggio dei percorsi dei pazienti colpiti da stroke e da lesione midollare - per evidenziare criticità assistenziali del SSN e valutare eventuali fattori prognostici relativi al recupero funzionale e di buona qualità di Vita;
- studio sui possibili miglioramenti funzionali nelle persone con emiparesi da esiti di stroke e nelle persone con malattia di Parkinson con Task Observation Therapy.

## AREA DI RICERCA

### Parkinson e Disturbi del Movimento

#### RESPONSABILE

F. Stocchi

#### STAFF

M. Casali, C. Fossati, P. Grassini, F.G. Radicati, P. Stirpe, M. Torti, L. Vacca

L'impatto sociale della malattia di Parkinson, che si stima colpire l'1% della popolazione sopra i 65 anni, e con una sempre maggiore rilevanza nelle fasce di età più basse (30-60), porta ad una continua ricerca sia nell'accrescere le conoscenze fisiopatologiche della malattia, sia nel perfezionare l'approccio terapeutico, farmacologico e riabilitativo, nell'ottica di un miglioramento della qualità della vita di questi pazienti.

Nel corso di questo anno, il gruppo di ricerca ha continuato a portare avanti progetti finalizzati nell'area clinico-farmacologica, psicologica e riabilitativa sia nella malattia di Parkinson che nei parkinsonismi atipici.

1. Si è proseguita l'osservazione della casistica di pazienti affetti da Paralisi Soprannucleare Progressiva (PSP), dedicando particolare attenzione all'analisi dei sintomi "non motori" grazie alla Non Motor Symptoms Scale, al Non Motor Symptoms Questionnaire e alla PSP Scale. Sono stati inclusi nella valutazione tutti i pazienti con diagnosi di probabile di PSP, senza limitazione dell'età di esordio, con fascia età 40-80 anni, ricoverati presso il reparto di Riabilitazione Neuromotoria dell'IRCCS San Raffaele Pisana. Al 31 Dicembre 2013 sono stati inseriti 60 soggetti affetti da PSP.
2. Si è concluso uno studio di comorbidità in pazienti geriatrici affetti da malattia di Parkinson. Nei pazienti in età geriatrica (> 65 anni) tale patologia, ad andamento cronico e progressivo, frequentemente si associa alla presenza di comorbidità, anch'esse a carattere cronico, che concorrono a configurare un quadro di "fragilità" clinica. Tale condizione, non solo comporta un aumento del rischio di disabilità funzionale, istituzionalizzazione e morte, con notevoli conseguenze socio-economiche, ma potrebbe condizionare, attraverso meccanismi fisiopatologici diretti ed indiretti, il decorso stesso della patologia e la risposta alla terapia farmacologica. Un valido strumento, in grado di quantificare il peso della comorbidità sul paziente, è rappresentato dalla Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) e, con particolare riferimento alla popolazione oggetto di studio, dalla revisione della scala per l'età geriatrica CIRS-G. Essa fornisce un punteggio totale che scaturisce dalla valutazione del grado di compromissione di 14 organi/sistemi. Obiettivo dello studio è stato quello di valutare la presenza di comorbidità in pazienti ambulatoriali ultrasessantacinquenni affetti da malattia di Parkinson attraverso la somministrazione della scala CIRS-G (Punteggio totale-Indice di Severità della Comorbidità-Indice di Comorbidità Complessa) ed analizzarne le eventuali associazioni con: qualità della vita del paziente, eventuale deficit cognitivo, disabilità funzionale ed outcome sfavorevoli quali istituzionalizzazione e morte. Attraverso l'analisi dei dati raccolti nel follow-up si può comprendere se ed in quale misura la presenza di comorbidità e quindi di poli-farmacoterapia possa determinare una ridotta risposta alla terapia specifica per il Parkinson e di conseguenza una più veloce progressione di malattia o una maggior incidenza di complicanze motorie. Sono stati arruolati nello studio 100 pazienti provenienti dagli ambulatori del San Raffaele affetti da malattia di Parkinson, 52 maschi e 48 femmine. I risultati dello studio hanno mostrato la presenza, oltre

alla malattia di Parkinson, di almeno 1 patologia cronica concomitante di grado moderato/severo nel 90.5% del campione. L'indice di comorbidità complessa ha evidenziato una media di patologie croniche (oltre alla malattia di Parkinson) di grado moderato/severo per paziente di  $2.60 \pm 1.50$ . Il grado di compromissione medio dei vari sistemi/organi è risultato, tuttavia, essere, in media, lieve (SV index medio  $0.63 \pm 0.27$ ). Le patologie più frequentemente presenti nei pazienti sono risultate essere: ipertensione arteriosa (55% del campione), patologie oculistiche/otorinolaringoiatriche (59%), patologie dell'apparato gastroenterico inferiore (68%), patologie dell'apparato genito-urinario (64%), patologie dell'apparato muscolo-scheletrico (68%), patologie psichiatriche (in questa sezione la scala include anche il deficit cognitivo) (89%). Una analisi mirata ad evidenziare l'assunzione cronica di farmaci nel campione ha mostrato come, in media, ogni paziente assumeva  $2.06 \pm 0.98$  farmaci per la cura della malattia di Parkinson e  $2.50 \pm 2.17$  farmaci per la cura delle malattie croniche concomitanti. Inoltre, nel 43% del campione andava aggiunto un farmaco antidepressivo/ansiolitico e nel 6% dei pazienti un antipsicotico. I test della valutazione multidimensionale geriatrica hanno mostrato un quadro cognitivo medio del campione al limite con il decadimento cognitivo lieve (Mini Mental State Examination – MMSE - medio= $24.95 \pm 4.54$ ). I pazienti presentavano in media una buona autonomia nelle attività basilari della vita quotidiana, con alcune disabilità nelle attività complesse, dato confermato anche dai punteggi medi alla scala Euro QoL 5-D (EQ-5D). I punteggi della EQ-5D VAS (Visual Analogue Scale), che rilevano lo stato di salute percepita dal paziente stesso su una scala da 0 a 100, hanno evidenziato, comunque, in media una buona qualità di vita, malgrado la malattia di Parkinson e le altre comorbidità. Dai dati raccolti al baseline emerge l'importanza della valutazione globale del paziente geriatrico con malattia di Parkinson. Nella gestione medica di questa tipologia di pazienti è fondamentale integrare l'aspetto neurologico con quello internistico, che peraltro, nella maggior parte dei casi, più di quello neurologico condiziona la prognosi e la qualità di vita del paziente. Nella prescrizione dei farmaci per la gestione della malattia di Parkinson è inoltre molto importante considerare le interazioni con i farmaci per le altre comorbidità ed eventualmente regolarne i dosaggi. Non appena saranno disponibili i dati completi del follow-up, si riuscirà inoltre a comprendere quanto la presenza di comorbidità somatiche possa influire sull'andamento della patologia neurologica e quanto questa condizioni la risposta alla terapia farmacologica.

3. È terminato lo studio per la valutazione della Stimolazione transcranica con Correnti Dirette (transcranial Direct Current Stimulation; tDCS) nei pazienti con malattia di Parkinson. La tDCS è una metodica di stimolazione cerebrale non invasiva capace di indurre cambiamenti funzionali nella corteccia cerebrale. La tDCS consiste essenzialmente nell'applicazione sullo scalpo di elettrodi eroganti una corrente continua di bassa intensità in grado di attraversare lo scalpo e influenzare le funzioni neuronali. Scopo dello studio è stato quello di valutare l'eventuale efficacia della tDCS sulla velocità del movimento, sulla deambulazione e sulle discinesie (outcome primario) di pazienti parkinsoniani con gravità moderata di malattia. Come outcome secondari sono state valutate le eventuali modifiche della qualità della vita e della eventuale depressione. Durante il primo anno di attività del progetto è stato valutato su un gruppo di 5 pazienti ricoverati in day hospital e/o regime di degenza dell'IRCCS San Raffaele Pisana il sistema tDCS in modalità sham (placebo-senza erogazione di corrente) per validare la gestione del corretto auto-trattamento a domicilio. I primi risultati hanno dimostrato come i pazienti con discinesie, con minimo

aiuto, riuscivano a indossare la cuffia e a effettuare il ciclo di trattamento con un minimo di training i primi giorni. Validata la procedura si è passati a includere i primi soggetti nello studio. Sono stati arruolati complessivamente 10 pazienti (età media 65 anni, con 10 anni di malattia). Tutti i pazienti hanno effettuato un ciclo completo di trattamento a domicilio di tDCS secondo il seguente protocollo:

- Prima visita neurologica e fisiatrica per la somministrazione di scale e test clinici (Unified Parkinson's Disease Rating Scale – UPDRS ; TUG 10m e 6 min walking test e GAIT Analysis) all'inizio dello studio: Somministrazione delle prime 60 stimolazioni (2 volte al giorno per 30 giorni) in singolo cieco e in modalità sham per analizzare l'effetto placebo del trattamento sui soggetti.
- Seconda visita neurologica e fisiatrica: somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 min walk test, GAIT Analysis) alla fine del primo trattamento.
- Periodo di wash-out di 30 giorni.
- Terza visita neurologica e fisiatrica: somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 min walking teste GAIT Analysis) all'inizio del secondo trattamento. Somministrazione del secondo trattamento composto di 60 stimolazioni di tipo catodico sulla corteccia motoria premotoria bilaterale mettendo l'anodo di riferimento sulla spalla sinistra (2 volte al giorno per 30 giorni) in singolo cieco e ad intensità di 1500 uA per analizzare l'effetto placebo del trattamento sui soggetti.
- Quarta visita neurologica e fisiatrica somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 min walking teste GAIT Analysis) alla fine del secondo trattamento.

L'indicazione oraria alle stimolazioni per il primo e secondo trattamento è stata 30 minuti prima della seconda dose di farmaco mattutina e 30 minuti prima della seconda dose di farmaco pomeridiana con il paziente in stato OFF. I risultati clinici hanno mostrato come il trattamento domiciliare sia stato ben accetto dai pazienti e ben tollerato. La metà dei pazienti ha riferito difficoltà nel posizionamento e nel perfetto funzionamento degli elettrodi per mancata aderenza al cuoio capelluto e conseguente mancata attivazione della stimolazione e interruzione della stessa. Si è resa necessaria quindi una ulteriore seduta di training per la spiegazione del corretto posizionamento e utilizzo degli elettrodi. Tutti i pazienti hanno riportato una sensazione di formicolio nel sito di stimolazione senza però riferire dolore. Tutti i pazienti hanno terminato correttamente entrambi i cicli di studio. I risultati finali non hanno mostrato variazioni nella media dei punteggi della UPDRS III dopo il ciclo di stimolazione attiva (da 29,4 a 28,1) e dopo il ciclo sham (da 30,2 a 29,5). Si sono modificati in misura significativa solo i parametri della scala riguardanti la bradicinesia come il finger tapping, hand movement e rapid alternate movement, dato questo che concorda con la letteratura. L'efficacia della tDCS si è rilevata più evidente dopo la prima seduta di trattamento con miglioramento in acuto della parte motoria della UPDRS. I valori della Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS) non si sono modificati significativamente nel corso dello studio, ma è stata riportata una riduzione nella durata delle discinesie (ore giornaliere con movimenti involontari) come evidenziato dall'item 32 della parte IV della UPDRS. Non è stata osservata nessuna modifica della gravità della discinesie così come della presenza di distonia mattutina. Non si sono verificate modificazioni significative nei punteggi della Hoehn and Yahr Scale - H&Y -(Stimolazione: da 2,77 a 2,33 e Sham da 2,8 a 2,54), della Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ39) e della (Beck Depression

Inventory) BDI in accordo a quanto riportato nelle parti I e II della UPDRS. L'analisi della Gait ha mostrato come sia il trattamento che la stimolazione sham modifichino i parametri spazio temporali dei soggetti trattati con un aumento della velocità del cammino, una normalizzazione verso i parametri fisiologici umani della fase di swing e distance e un miglioramento della larghezza dell'appoggio di entrambi i piedi. Il meccanismo con cui la tDCS può migliorare le performance motorie nei pazienti parkinsoniani è per lo più sconosciuto ma potrebbe coinvolgere il rilascio di dopamina nel nucleo caudato e nel putamen. L'attivazione diffusa della corteccia ottenuta mediante tDCS e il conseguente rilascio di dopamina potrebbe spiegare il miglioramento delle performance motorie evidenziato in acuto nei pazienti. In alcuni studi clinici l'aumento dei livelli di dopamina è stato però osservato anche dopo stimolazione sham, sia nei pazienti trattati con stimolazione elettrica che con stimolazione magnetica evidenziando l'importante effetto placebo che caratterizza questi tipi di trattamento. E' in quest'ottica che il miglioramento ottenuto in acuto evidenziato nei pazienti potrebbe essere dovuto ad un maggiore effetto placebo durante la prima seduta di trattamento.

4. Si è iniziato uno studio sulla analisi della differenza di percezione e consapevolezza dei movimenti involontari tra i parkinsoniani e i loro caregiver. L'obiettivo di questo studio è analizzare la percezione e la consapevolezza dei movimenti involontari tra i parkinsoniani e i loro caregivers utilizzando un nuovo questionario Parkinson's Disease /Caregivers Symptoms Check List (PD-C SCL). Le aree analizzate sono: difficoltà nel linguaggio, problemi psichiatrici (eccitamento, ossessività, movimenti involontari - tronco, arti, capo -, blocchi o rallentamento motorio grave, tremore - capo, arti, freezing, cadute, calo di memoria o attenzione, apatia, gioco d'azzardo). La popolazione dei casi è rappresentata dai soggetti con diagnosi confermata di malattia di Parkinson afferenti agli ambulatori del servizio di neuroriabilitazione dell'IRCCS San Raffaele Pisana e i loro caregiver. A tutti i soggetti che hanno fornito il consenso a partecipare allo studio è somministrato un questionario da personale addestrato. Durante la visita che ha una durata di circa 45 minuti vengono somministrati: il questionario sulle discinesie - PD-C SCL -Parkinson's disease /Caregivers Symptoms check list, Montreal Cognitive Assessment (MoCA), UPDRS, H&Y. Ai caregiver è somministrato esclusivamente il PD-C SCL. Il questionario PD-C SCL è stato messo a punto dalla neuropsicologa del gruppo. Le aree prese in considerazione sono state le seguenti: difficoltà nel linguaggio, sintomi psichiatrici (apatia, agitazione/aggressività, gioco d'azzardo e altri sintomi ossessivo-compulsivi), discinesie del tronco, arti, collo e volto, freezing, stato di off, cadute, deficit di memoria e attenzione, tremore del volto, arti superiori ed inferiori. Il questionario è stato somministrato a 60 soggetti, 30 pazienti, (età media= 67.4, media anni di malattia= 9.1) e 30 caregiver. I dati preliminari hanno mostrato una notevole differenza nella percezione dei sintomi da parte dei pazienti e dei loro caregiver. Tra i sintomi che incidono negativamente sulla loro qualità della vita, i pazienti hanno messo al primo posto il freezing seguito da stati di off, da disturbi del linguaggio e da i movimenti involontari agli arti. I caregiver invece hanno messo al primo posto i movimenti involontari agli arti, e successivamente gli stati di off, il freezing e i movimenti involontari del tronco.
5. Nell'ambito dello studio delle nuove procedure riabilitative, è stata avviata la valutazione di efficacia del dispositivo medico "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da paralisi sopranucleare progressiva. Nella maggior parte dei pazienti affetti da malattia di Parkinson e/o Paralisi Sopra-



nucleare Progressiva si osserva un lento e inesorabile decadimento delle funzioni motorie dell'arto inferiore, pertanto la riabilitazione dell'arto inferiore e del cammino in generale, associata ad una terapia farmacologica è un obiettivo fondamentale, ma spesso insoddisfatto, del trattamento. Il recupero di funzione nelle malattie neurologiche è ormai ampiamente dimostrato, grazie a fenomeni plasticità neuronale che modificano la connettività e l'attività non solo delle aree interessate dalla patologia in oggetto, ma anche di aree poste a distanza da essa, come ad esempio, le aree motorie. L'utilizzo di dispositivi elettromeccanici, in aggiunta alle convenzionali terapie farmacologiche, nell'ultimo anno sono risultate di estremo ausilio nel trattamento dei pazienti con malattia di Parkinson. GONDOLA® è un innovativo dispositivo personale portatile di riabilitazione che può consentire alle persone con Parkinson di recuperare parte delle capacità motorie e dell'autonomia in molte attività personali quotidiane, con conseguente miglioramento della qualità di vita. GONDOLA® è stato progettato per erogare individualmente la Foot Mechanical Stimulation (FMS), una terapia riabilitativa complementare rispetto alle cure farmacologiche. L'innovazione tecnologica di GONDOLA® si basa su stimolazioni del sistema nervoso periferico. Più precisamente, stimola specifiche aree dei piedi con impulsi meccanici controllati. I pazienti che rispondono positivamente alla terapia FMS, erogata da GONDOLA®, possono acquisire maggiore sicurezza e maggiore velocità nella deambulazione e nel controllo del movimento e possono quindi riappropriarsi di parte della propria indipendenza e della capacità di relazione e di partecipazione alla vita sociale e lavorativa. Gli specifici obiettivi di questo progetto sono volti a:

- verificare l'effettiva efficacia nel ridurre il deficit motorio soprattutto negli arti inferiori del dispositivo Gondola;
  - analizzare l'eventuale miglioramento attraverso analisi cinematiche e cinetiche;
  - analizzare l'eventuale miglioramento in termini di riduzione dell'instabilità posturale e rischio di cadute;
  - analizzare l'impatto sulla qualità della vita dei pazienti.
6. È proseguito lo studio caso-controllo sui fattori di rischio familiare e diagnosi precoce della malattia di Parkinson. Nella maggior parte dei casi le cause della Malattia di Parkinson restano sconosciute e modelli di tipo monogenico non sembrano molto verosimili. Probabilmente ci si trova di fronte a complesse interazioni di molti fattori di tipo genetico e non-genetico. La Malattia di Parkinson tende a ricorrere nella stessa famiglia più frequentemente di quanto possa avvenire per effetto del caso. Questo fenomeno viene ormai confermato in modo molto consistente dagli studi epidemiologici. Circa il 15-25% dei pazienti riferisce infatti la presenza di familiarità positiva. La ricorrenza familiare di una malattia non è sinonimo di ereditarietà; esistono infatti molti altri fattori, come esposizioni ambientali, occupazionali, che tendono a ricorrere nelle famiglie, e potrebbero avere un ruolo nel determinare la aggregazione familiare di malattia. La potenziale multifattorialità dell'eziologia della Malattia di Parkinson, combinata alla presenza di un quadro di debole suscettibilità genetica sostiene un modello di interazione gene-ambiente come modello eziologico preferenziale. In associazione con l'identificazione dei fattori di suscettibilità genetica, la letteratura ha riportato alterazioni nella distribuzione in casi e controlli di alcuni fattori fenotipici, fra cui l'instabilità genetica ed il danno al DNA. A completamento delle variabili considerate nella definizione del modello eziopatologico del Parkinson, una serie di variabili ambientali sono state investigate in studi di tipo clinico ed epidemiologico. Fra queste, vari aspetti dello stile di vita, la

dieta, l'occupazione, la residenza. Anche parametri di funzionalità fisiologica sono stati in varie occasioni considerati come predittori dello sviluppo di malattia. Obiettivo di questo studio osservazionale di tipo caso controllo è il calcolo dell'Odds Ratio per i singoli fattori di rischio, di tipo genetico (Single nucleotide polymorphisms - SNPs), ambientale (occupazione, life-style, etc.), clinici (stipsi, etc.). Ulteriori endpoints riguardano: i) la valutazione dell'interazione gene-ambiente fra le SNPs valutate nei gruppi in studio con i fattori di rischio della malattia; ii) validazione dei principali meccanismi connessi con le fasi precoci della malattia; iii) creazione di un biorepository per lo studio dei fattori di rischio della malattia di Parkinson. La popolazione dei casi è rappresentata dai soggetti con diagnosi confermata di Malattia di Parkinson afferenti agli ambulatori del servizio di neuroriabilitazione dell'IRCCS San Raffaele Pisana. I controlli, appaiati per sesso ed età ( $\pm 5$  anni) sono selezionati fra gli afferenti al centro riabilitativo San Raffaele Pisana per prestazioni non legate a patologie di tipo neurodegenerative. A tutti i soggetti che finora hanno dato il consenso a partecipare allo studio è stato somministrato un questionario da personale addestrato. L'intervista, proposta dopo gli accertamenti clinici di routine, ha una durata di circa 15 minuti. Finora non si è ancora proceduto ad effettuare prelievi di materiale biologico, in ogni caso a tutti i soggetti che firmano il modulo di consenso informato vengono prelevate cellule esfoliate della mucosa buccale con procedura non invasiva tramite l'uso di uno spazzolino del tutto simile a quello per i denti. Nessun effetto avverso è atteso in relazione a tale procedura. I campioni sono depositati nel Biorepository dell'Unità di Epidemiologia Clinica e Molecolare, sito presso il Laboratorio dell'IRCCS San Raffaele Pisana, con l'impegno da parte dei ricercatori a non esplorare i campioni biologici per altre patologie che non siano la Malattia di Parkinson, e di non applicare a quei campioni procedure che abbiano valenza diagnostica individuale e non di pura ricerca. La dimensione dello studio è stata valutata con un software dedicato. I parametri inseriti sono stati scelti sulla base della prevalenza della familiarità con pazienti affetti dalla malattia di Parkinson nella popolazione generale ( $p_1$ ). Pertanto, dato  $p_1 = .20$ ; Ratio Case to Controls 1:1;  $\alpha = 0.05$ ;  $1 - \beta = .80$ , per trovare significativo un OR di 1.30 corrispondente ad un rischio di malattia aumentato del 30%, per il fatto di avere un parente di primo grado affetto da Parkinson, sarà necessario reclutare 1000 pazienti affetti dalla malattia di Parkinson ed altrettanti controlli (circa 2000 soggetti complessivamente). A tutto il 2013 il questionario predisposto è stato somministrato a 746 soggetti ed ha rilevato la presenza per la maggior parte di pazienti classificati come CASI (67.2%) vs CONTROLLI (32.8%). La rilevazione dei soggetti intervistati mostra che il campione sia rispetto alla variabile sesso e sia rispetto al tipo paziente per età media è ugualmente rappresentato; il livello di istruzione è medio alto (i diplomati sono il 37.4% e i laureati 23.3%) con età media di 67 anni deviazione standard 9.62. I soggetti sono per lo più concentrati nella penultima classe (43.03%) nella quale ricadono tendenzialmente persone con età in cui si inizia ad andare in pensione; altro aspetto da notare è la quasi uguaglianza delle due classi 55-64 (non ancora età del tutto pensionabile) e 75+ anni (sicuramente età pensionabile); infatti i soggetti sono per il 57.1% pensionati. L'analisi eseguita distinguendo i gruppi per sesso mostra che nel sottogruppo femminile le differenze percentuali di CASO vs CONTROLLO rispetto al sottogruppo maschile sono minori: infatti CASO femminili è il 54.8% vs CONTROLLO 45.2% mentre CASO maschile è il 78.8% vs CONTROLLO 21.1%. In base alla significatività del Chi -quadrato di Pearson è possibile affermare che il sesso e la tipologia paziente sono effettivamente correlati (al livello del 5%). Essen-

do il progetto volto allo studio dell'incidenza dell'ambiente lavorativo all'origine della malattia di Parkinson, si nota che la variabile ultima attività lavorativa rispetto al tipo paziente il 25.2% dei CASO ha ricoperto un ruolo di impiegato e a seguire con il 10.8% ha svolto attività in ambito scolastico. Essendo indispensabile arrivare ad una casistica di almeno 1000 pazienti, lo studio proseguirà ancora fino al raggiungimento del target.

7. È proseguito lo studio dei fattori predittivi nello sviluppo della malattia di Parkinson: analisi della variabilità dell'intervallo cardiaco r-r in familiari di pazienti affetti. La Malattia di Parkinson (PD) è un disordine neurodegenerativo caratterizzato dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera compatta (SNc) associata a inclusioni proteiche intracellulari o corpi di Lewy. Si è notato che i corpi di Lewy sono più generalmente diffusi in tutto il sistema nervoso centrale e coinvolgono le vie olfattive, gli emisferi cerebrali, il tronco encefalico, il midollo spinale, il sistema nervoso autonomo periferico. Inoltre studi neuropatologici suggeriscono che la degenerazione del sistema nervoso autonomo periferico che coinvolge il cuore sia antecedente alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNc. Disfunzioni del sistema autonomo e, in maniera specifica, denervazione dopaminergica cardiaca sono state descritte virtualmente in tutti i pazienti con Malattia di Parkinson. È stato stabilito che una ridotta variabilità nella frequenza cardiaca all'ECG è un fattore di rischio o addirittura una precoce manifestazione della Malattia di Parkinson e potrebbe rappresentare un semplice economico strumento di screening che potrebbe essere applicato alla popolazione generale per determinare un eventuale rischio di sviluppare la Malattia di Parkinson. Lo studio si propone di verificare:

- se i familiari di primo grado dei pazienti con PD (che hanno un più alto rischio di sviluppare la malattia) hanno una ridotta variabilità dell'intervallo R-R rispetto al gruppo di controllo.
- se la variabilità della frequenza cardiaca è ridotta nei familiari di un sottogruppo di pazienti con PD affetti anche da anosmia e REM Behavior sleep disorders.

Si è inoltre in grado di individuare coorti di:

- a) familiari di primo grado aventi una ridotta variabilità della frequenza cardiaca;
- b) familiari di primo grado aventi una normale variabilità della frequenza cardiaca;
- c) gruppi di controllo correlati per sesso ed età.

Queste tre coorti saranno utilizzate per successivi studi a lungo termine per determinare se vi è un maggiore rischio di sviluppare le classiche manifestazioni motorie del PD in coloro che presentino una variabilità nulla o ridotta nell'intervallo R-R.

In questo studio, si effettua un elettrocardiogramma di routine con misurazione della variabilità dell'intervallo R-R su un gruppo di 2000 familiari di primo grado di pazienti con PD e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso.

Questo tipo di ricerca può rivoluzionare il modo di diagnosticare e trattare i pazienti con PD, nonché portare ad una prevenzione secondaria qualora diventino disponibili farmaci in grado di modificare il decorso di malattia. Nel corso dei primi 18 mesi di studio sono state finalizzate le modalità di esecuzione dello studio, si è definito il protocollo clinico, condiviso con le Unità operative coinvolte nel progetto, ed è stato ottenuto il parere positivo dal Comitato Etico. Sono stati arruolati 130 partecipanti previa firma del consenso informato, e si sono raccolti dati ed ECG fra casi e controlli. Tutti i partecipanti, oltre all'esecuzione dell'elettrocardiogramma di routine, sono stati sottoposti al "Smell Olfaction Test", test di screening per l'eventuale riscontro di iposmia, e successivamente alla compilazione di una scheda raccolta

dati per l'eventuale riscontro di altri segni o sintomi "premonitori" di malattia di Parkinson (iposmia, disturbi del sonno, stipsi, ecc). Nello specifico, sono stati esaminati 101 familiari di primo grado (72 di sesso femminile e 29 di sesso maschile) così suddivisi:

- 65 figli di pazienti
- 23 fratelli/sorelle di pazienti
- 3 genitori di pazienti
- 10 con doppia relazione (sia figli che fratelli/sorelle)

Essendo la maggior parte dei familiari esaminati "figli", l'età media riscontrata è di 56 anni. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a "Smell Olfaction Test", che in 8 soggetti è risultato ai limiti inferiori della norma (punteggio 6/8), Non sono stati riscontrati segni clinici di patologia neurologica di tipo parkinsoniano. I controlli "sani" esaminati a tutt'oggi sono stati 34 (23 di sesso femminile e 11 di sesso maschile), con l'età media di 65 anni. Nessuno dei soggetti sani esaminati ha avuto punteggio 6 al "Smell Olfaction Test", ma tutti si sono inseriti nella normalità. L'analisi dei tracciati ECG registrati può essere effettuata soltanto alla fine della raccolta dei dati, quindi non è possibile avere risultati ad interim.

8. Inoltre, si è proseguito il lavoro di conduzione di numerosi trial clinici (internazionali, multicentrici) inerenti la sperimentazioni di nuovi farmaci. I progetti in corso hanno già prodotto interessanti risultati che sono stati in parte pubblicati su riviste scientifiche ed in parte presentati a congressi nazionali ed internazionali.

## AREA DI RICERCA

### Cefalee e Dolore Neuropatico

#### RESPONSABILE

P. Barbanti

#### STAFF

C. Aurilia, G. Egeo, L. Fofi, D. Le Pera, A. Pesenti.

Il dolore è una delle prime cause di disabilità della popolazione mondiale. Una legge (n° 38 del 15/3/10) impone in Italia di riconoscere e trattare debitamente il dolore in ogni sua espressione ed in ogni ambito sanitario.

Il focus dell'area di ricerca è la rieducazione funzionale del dolore quando esso perda il proprio ruolo finalistico debordando stabilmente oltre la fisiologica funzione di protezione. Particolare attenzione è rivolta al dolore cefalico cronico, patologia che affligge il 4% degli individui della nostra Nazione, colpendo in particolare le fasce di età di massima produttività lavorativa e sociale ed i cui soli costi diretti ammontano a circa 2.900 euro per paziente per anno.

La ricerca traslazionale dell'area di ricerca mira a integrare le conoscenze genetiche e biologico-molecolari con i paradigmi clinici e strumentali, allo scopo di recuperare alla validità sociale e lavorativa questa non trascurabile porzione di popolazione. Essa si articola sui seguenti fronti:

#### 1) **Epidemiologico:**

Tramite l'istituzione del registro nazionale delle cefalee croniche persegue finalità:

- clinico-assistenziali (identificazione dei soggetti affetti, accertamento di farmacoresistenza, garanzia di cura);
- economico-sanitarie (regolamentazione dell'accesso dei pazienti alle moderne procedure di cura-riabilitazione esercitando nel contempo un governo clinico sui diversi centri dislocati sul territorio nazionale);
- medico-legali (invalidità civile);
- scientifiche (creazione del primo data-base nazionale al mondo, studio di correlazione fenotipo-biotipo mediante biobanca e approccio di system-medicine).

#### 2) **Neurofisiologico:**

- impiego dei potenziali evocati sensoriali laser per delineare e monitorare le alterazioni di sistemi nocicettivi in corso di dolore cronico primario o secondario (patologie neurologiche vascolari, traumatiche, infiammatorie, degenerative) e per valutare il network endogeno di controllo del dolore (DNIC: diffuse noxious inhibitory control) allo scopo di orientare meglio i programmi di recupero funzionale;
- utilizzo dei sistemi di stimolazione elettrica non invasiva del nervo vago e del nervo sovra orbitario nel dolore cefalico cronico.

#### 3) **Genetico:**

- identificazione di marcatori molecolari e genetici correlati alla evoluzione verso la cronicità del dolore neuropatico e neurovascolare, cercando una correlazione fenotipo-biotipo che permetta di personalizzare il programma riabilitativo e di predire la possibilità di recupero

#### 4) **Farmacologica:**

- attuazione di protocolli terapeutici con farmaci in sperimentazione clinica.

Il professore Piero Barbanti è Presidente della Associazione Italiana per la Lotta contro le Cefalee (AIC); Consigliere della Associazione Neurologica Italiana per la Ricerca

sulle Cefalee (ANIRCEF); Tesoriere della Società Italiana di Neurogeriatria (SINeG); Responsabile Scientifico per l'area medica e membro del Comitato Scientifico della trasmissione televisiva di RAI3 "Geo & Geo"; membro del Comitato d'Onore del Premio "Marcello Sgarlata".

Inoltre, il professore Piero Barbanti:

- Ha ricevuto la nomina a Componente del Comitato Scientifico dell'Associazione per una Scuola delle Cefalee (ASC);
- È componente del Gruppo di lavoro delle Linee Guida Nazionali di riferimento per la prevenzione e la terapia delle Cefalee dell'Adulto della Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali (AGENAS);
- Coordinatore Clinico per l'Italia del Registro Nazionale delle Cefalee Croniche.

## AREA DI RICERCA

### Area Cardiovascolare

**Centro di ricerca clinica e sperimentale** (Direttore: G. Rosano)

### RESPONSABILE

M. Volterrani

### STAFF

A. Antelmi, D. Arestia, A. Arisi, A. Armani, P. Baratta, ML Barbuto, D. Battaglia, G. Campolongo, M. Caprio, F. Caretta, V. D'Antoni, A. Di Luccio, L. Gatta, S. Gorini, F. Iellamo, I. Jaffe, A. La Sala, C. Mammi, V. Marzolla, M. Mastrantoni, R. Melchionna, G. Nasso, M. Piergallini, L. Pontecorvo, R. Poscia, N. Punzo, G. Rosano, I. Spoletini, C. Vitale, L. Vitiello, CD. Vizza.

Il Dipartimento focalizza la ricerca sui meccanismi di recupero funzionale delle malattie cardiovascolari e cerebrovascolari.

Il Centro di Ricerca Clinica e Sperimentale coordina l'attività di ricerca del Dipartimento. In particolare, il Centro è interessato a valutare gli effetti dell'esercizio fisico da solo o in associazione a terapie patogenetiche sul recupero funzionale e metabolico. Negli ultimi anni sono state intraprese attività di ricerca in ambito clinico e sperimentale che rivestono un ruolo fondamentale nell'identificare il determinismo del danno d'organo e nell'investigare meccanismi di recupero funzionale dopo riabilitazione, quali: le nuove strategie nella ottimizzazione del metabolismo cardiaco, l'interazione tra tessuto adiposo e danno vascolare, la neo-angiogenesi, l'apoptosi miocardica e vascolare e l'infiammazione cardiovascolare e sui meccanismi molecolari alla base della riparazione del danno funzionale.

Attualmente le linee di ricerca si basano sulla valutazione dell'effetto della terapia fisica da sola o in associazione a terapie specifiche in patologie determinanti disabilità:

- Meccanismi di recupero funzionale della patologia cronica e disabilitante: analisi dei determinanti di outcome. Meccanismi fisiopatologici del training fisico nel recupero di organi ed apparati sede di malattia cronica, con particolare attenzione all'aspetto molecolare e cellulare nell'evoluzione della patologia potenzialmente disabilitante attraverso l'utilizzo di modelli cellulari ed animali, normali e transgenici, di modelli controllati di danno subletale e di modelli di patologia umana e cronica che necessitano di recupero funzionale della disabilità. Effetti delle comorbidità cardio-respiratorie ed endocrinometaboliche nel raggiungimento dell'outcome riabilitativo. Ruolo del training fisico e della sua associazione con presidi farmacologici sulle alterazioni metaboliche e funzionali nelle patologie croniche ed invalidanti. Studio delle differenze di genere nel rischio cardiovascolare e impatto del fattore età nel ricevere trattamento adeguato per le malattie cardiovascolari.
- Utilizzo di sistemi telemedicali in ambito riabilitativo territoriale. Implementazione e validazione di sistemi di tele-assistenza in gruppi di pazienti affetti da patologie croniche ed altamente invalidanti attuati in regime extra-ospedaliero. Gestione di programmi di training fisico con monitoraggio dei parametri vitali al domicilio del paziente.

## AREA DI RICERCA

### Approcci di sistema e malattie non trasmissibili

#### RESPONSABILE

A. Cesario

#### STAFF

F. Pasqua, L. Ferri, V. Cardaci, A. Zarzana, M. Orlando, S. Di Toro, I. Nardi, D. Chiurchio, K. Geraneo, F. Baldari, M.G. Mastrullo, S. Bonassi, P. Russo, M. Neri, S. Boccia, M. Cazzola, L. Calzetta, P. Filippini, S. Dall'Armi, A. Frustaci, V. Valdiglesias, G. Salinaro, A. Del Bufalo, R. Moroni, M. Milic.

L'area di ricerca "Approcci di Sistema e Malattie non Trasmissibili (Systems Approaches and Non-Communicable Diseases)" è rivolta allo studio delle malattie non trasmissibili da persona a persona, quali malattie cardiovascolari, respiratorie, diabete, cancro, disturbi neuropsichiatrici. Queste patologie rappresentano un importante problema di salute pubblica, sono causa di morbilità e mortalità a livello mondiale ed una loro efficace gestione richiede l'adozione di un approccio che vada al di là dei fenotipi classici, per orientarsi piuttosto verso l'individuazione di nuovi fenotipi complessi.

L'approccio di ricerca utilizzato è di tipo prevalentemente traslazionale in modo da consentire l'integrazione fra valutazioni di ambito prettamente molecolare ed indicatori di outcome clinico.

L'attività di ricerca è stata focalizzata inizialmente in ambito pneumologico per estendersi progressivamente ad altre patologie quali quelle cardiovascolari e neuropsichiatriche. Finora le tematiche trattate sono state: valutazione del ruolo della Riabilitazione Respiratoria su parametri di outcome funzionale e Qualità di Vita (QoL) in pazienti sottoposti a chirurgia di resezione polmonare per neoplasia; valutazione delle correlazioni tra Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), funzione respiratoria e Disfunzione Erettile (DE); valutazione della consistenza di indici di outcome clinico (BODE index) nella misurazione dell'efficacia clinica della Riabilitazione Respiratoria; marcatori molecolari (pattern di infiammazione e stress ossidativi) di outcome e correlazione tra la BPCO e la patologia cardiovascolare; ruolo dei biomarcatori periferici di stress ossidativo nella patogenesi di alcune patologie psichiatriche quali l'autismo.

Durante il 2013 nell'ambito del progetto "Applicazione di un approccio di Systems Medicine alla valutazione di aspetti terapeutici e riabilitativi in pazienti affetti da malattie non trasmissibili: implementazione di una piattaforma integrata di dati clinici, epidemiologici e biologici", è partita la raccolta di dati clinico-epidemiologici e la conservazione del materiale biologico.

Le attività in questo ambito sono supportate dalla standardizzazione clinica e dall'attività di laboratorio volte ad ottimizzare la gestione delle risorse a disposizione con una pianificazione che consenta lo sviluppo di piani adeguati di trasferimento tecnologico di conoscenze di valore in ambito commerciale (secondo criteri standard di protezione e sfruttamento della Proprietà Intellettuale). In questa ottica sono in corso di definizione accordi con primarie industrie per l'attivazione di collaborazioni in ambito di proteomica, genomica avanzata ("Next Generation Sequencing") e Bioinformatica. Sono stati inoltre avviati contatti con la rete Europea di centri attivi nel campo della Systems Medicine, collaborazioni che hanno portato l'IRCCS San Raffaele Pisana a diventare uno dei soci fondatori dell'Istituto Europeo di Systems Biology e Systems Medicine, con sede a Lione (Francia).

Sempre in una prospettiva di Systems Medicine l'Area ha anche avviato il progetto



Sc@rabeo, mirato a raccogliere e gestire un database multidimensionale di dati – al momento – solo clinici, raccolti dai pazienti geriatrici ricoverati nelle RSA del gruppo San Raffaele (oltre 1200 posti letto). Questo progetto le cui attività sono finanziate da progetti finalizzati, si propone di inserire nel database tutti i pazienti accolti presso le RSA del gruppo, creando anche una rete di collaborazione nazionale con altri gruppi di ricerca in ambito geriatrico. Inoltre sono state avviate attività, in ambito geriatrico mirate a identificare i predittori genomici, epigenomici e immunologici della fragilità, una condizione fortemente associata alla disabilità e alla mortalità la cui prevenzione e trattamento è in grado di migliorare consistentemente qualità e durata della vita nell'anziano.

Nel corso del 2013 è proseguita l'attività di ricerca clinica sponsorizzata centrata essenzialmente sulla valutazione della fattibilità, sicurezza ed efficacia di trattamenti farmacologici investigazionali. I reparti di riabilitazione respiratoria sono stati coinvolti in diversi studi prestigiosi, fra cui uno monocentrico dedicato alla sperimentazione dell'eparina in pazienti con BPCO i cui risultati potrebbero dare una svolta importante alla terapia della BPCO. La Ricerca Clinica propriamente detta, la Ricerca Traslazionale e quella sponsorizzata sono effettuate secondo i criteri della Good Clinical Practice (GCP) in accordo alla Direttiva 2001/20/EC. I trials clinici sono registrati e gestiti secondo la normativa vigente, previa approvazione del comitato etico locale. In particolare ci si serve trials osservazionali prospettici, di fase I, II ed eventualmente III.

Gli interessi scientifici del gruppo collocano fra le priorità gli aspetti di potenziale trasferibilità (tecnologica e gestionale) al Sistema Sanitario Nazionale. A questo proposito è partita l'attuazione di un piano di Ricerca che ha consentito l'analisi del potenziale allargamento delle indicazioni relative alla Riabilitazione Respiratoria in pazienti oncologici "acuti" come, ad esempio, quelli con neoplasia polmonare che sono sottoposti a trattamenti radio-chemioterapici esclusivi, attraverso una presa in carico precoce. In questo ambito l'interesse del gruppo è anche testimoniato dalla assegnazione di due progetti finanziati dal Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute per progetti legati alla identificazione, codifica e management clinico-organizzativo della complessità in medicina. In termini di allargamento degli interessi di ricerca specifici sono state attivate collaborazioni in ambito immunologico, genetico-genomico ed epidemiologico (epidemiologia molecolare e clinica). Queste, unitamente a quella già consolidata per la Biologia Molecolare e Cellulare consentono un completamento delle potenzialità traslazionali dell'Area di Ricerca con l'allargamento a campi di grande valore innovativo come la diagnostica nanotecnologica, gli studi di associazione estesi all'intero genoma (Genome Wide Association Studies – GWAS), gli studi epidemiologici per l'analisi dell'interazione gene/ambiente (Gene to Environment Interaction) e la terapia individualizzata ("targeted") di modulazione dell'immunità per le malattie polmonari infiammatorie e neoplastiche. In questo ultimo caso sono stati pubblicati alcuni lavori sulla suscettibilità genetica e sul ruolo della familiarità in patologie respiratorie quali asma, mesotelioma e tumore del polmone.

## AREA DI RICERCA

**Disabilità dello sviluppo**

## RESPONSABILE

G. Albertini

## STAFF

G. Brunner, C. Condoluci, A. Corbellini, E. Chiodi, G. Di Girolamo, M. Galli, E. Giulitti, M. Janicki, G. La Malfa, L. Majolini, P. Onorati, G. Orsini, C. Thellung, N. Tenore, G. Stella.

Il Dipartimento di Scienze delle Disabilità Congenite ed Evolutive Motorie e Sensoriali dell'IRCCS San Raffaele Pisana ha svolto nel 2013 la propria attività di ricerca in continuità con gli anni precedenti incentrandola prevalentemente sullo studio in vivo del movimento, con particolare riferimento allo studio dello stesso sia dal punto di vista biomeccanico, sia come funzione cognitiva. Nello specifico, si pone attenzione alle funzioni neuropsicologiche di base, come le funzioni esecutive e le prassie. Di particolare rilevanza sono stati gli studi sui correlati neurofisiologici e neurobiologici delle Disabilità Intellettive e dei Disturbi Specifici dell'Apprendimento.

E' stato ulteriormente sviluppato il modello di cartella clinica informatizzata centrata sul bambino e sulla persona secondo un approccio multidisciplinare nella prospettiva life span.

## AREA DI RICERCA

### Organizzazione e gestione dei servizi

#### RESPONSABILE

N. Santucci

#### STAFF

E. Pascazio

La gestione della persona con malattia cronica e con disabilità necessita a tutt'oggi di protocolli e linee guida definite e condivise.

La *Clinical Governance*, intesa come razionalizzazione e organizzazione della diagnosi e della terapia per il miglioramento continuo della qualità dei servizi e il raggiungimento e mantenimento di standard assistenziali elevati, deve integrarsi in modo sinergico con la presa in carico globale del paziente successiva a stesura e aggiornamento dei percorsi diagnostico-terapeutici, con la cura globale del malato con protocolli malattia-specifici.

In questa cornice, la gestione del rischio clinico (*Risk Management*), la creazione di un sistema integrato informatizzato che razionalizzi il processo assistenziale e garantisca la compliance ai vincoli legislativi, la valutazione della performance ed infine il governo clinico sono stati individuati quali argomenti centrali attorno ai quali avviare una serie di progetti di ricerca volti all'individuazione e alla valutazione degli aspetti essenziali al miglioramento della qualità dei trattamenti - dall'accezione più prettamente organizzativo-gestionale a quella più specificamente clinico-riabilitativa.

Gli obiettivi che l'Area di ricerca si prefigge sono:

1. la creazione di una cultura aziendale condivisa sulle tematiche della *Clinical Governance* e del *Risk Management* (incident reporting e gestione delle cadute accidentali, infezioni ospedaliere);
2. l'innalzamento della qualità delle prestazioni clinico-assistenziali e di gestione organizzativa (antibiotico-terapia);
3. la proposta di una metodologia valutativa della performance assistenziale attraverso lo sviluppo e l'implementazione di un cruscotto informatizzato per il monitoraggio degli indicatori di attività sanitaria con specifico riferimento ai protocolli clinico-assistenziali.

## AREA DI RICERCA

**Biotecnologie avanzate**

**RESPONSABILE**

F. Guadagni

**STAFF**

J. Alessandrini, D. Della Morte, M.L. De Marchis, P. Ferroni, B. Leone, G. Ludovici, R. Palmirotta, S. Riondino, A. Spila

Le malattie croniche disabilitanti rappresentano uno dei problemi più visibili di salute pubblica, costituendo circa il 50% del carico totale mondiale di malattie. La comprensione degli aspetti genetici, cellulari e molecolari alla base di tali patologie è notevolmente migliorata negli ultimi anni grazie all'introduzione di biotecnologie in grado di valutare a fondo i meccanismi etiopatogenetici e di individuare nuovi biomarcatori da utilizzare quali determinanti di outcome durante il recupero funzionale di tali patologie. In tale contesto, si collocano i progetti di ricerca corrente afferenti all'Area di Biomarker Discovery e Biotecnologie Avanzate (Laboratorio BioDAT), grazie anche alla disponibilità di un numero significativo di campioni biologici conservati nella Banca Biologica Interistituzionale Multidisciplinare (Progetto BioBIM). Obiettivo principale del programma di Ricerca del Laboratorio BioDAT è l'analisi di determinanti di outcome in numerose patologie croniche e disabilitanti. Tali studi sono eseguiti allo scopo di migliorare le conoscenze dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di tali condizioni, di sviluppare nuovi approcci terapeutici ed identificare biomarcatori in grado di predire in maniera personalizzata la mancata risposta ad un determinato trattamento farmacologico, o la possibile insorgenza di effetti indesiderati. La possibilità fornita dalle moderne tecniche di farmacogenomica (attraverso l'integrazione tra le conoscenze genetiche acquisite e le conoscenze sugli effetti dei farmaci) di predire individualmente tali determinanti, potrebbe permettere l'applicazione in tempi rapidi di protocolli terapeutici ottimizzati per ogni singolo paziente ed un uso razionalizzato dei farmaci.

I risultati ottenuti nel corso del 2013 sono promettenti in tal senso, e molti degli obiettivi prefissati si possono considerare raggiunti, anche se, per la natura stessa del programma, il conseguimento di alcuni risultati rappresenta una logica premessa al perseguimento di ulteriori obiettivi.

### **Progetto BioBIM: BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM)**

La Biobanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM) dell'IRCCS San Raffaele Pisana è, secondo la definizione attuale, una "unità di servizio, senza scopo di lucro, finalizzata alla raccolta e alla conservazione di materiale biologico umano utilizzato per diagnosi, per studi sulla biodiversità e per ricerca". Il rapido successo di molti studi, infatti, è unicamente possibile grazie alla disponibilità di campioni biologici di persone affette, portatrici, o predisposte a patologie su base genetica o ambientale, o che manifestano variabilità alla risposta dei farmaci, possibilmente in comparazione a gruppi di controllo appaiati (soggetti apparentemente sani). Pertanto, la disponibilità di campioni biologici ha oggi assunto un ruolo cruciale nel campo della ricerca biomedica, da quella di base a quella traslazionale, dalla comprensione dei meccanismi etio-patogenetici, dei fattori prognostici/predittivi, e dei parametri diagnostici, alla suscettibilità alla terapia.

La BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana, è in grado di conservare differenti tipi di campioni raccolti nel corso di progetti di ricerca biomedica, flussi diagnostici ed indagini epidemiologiche, da sottoporre ai processi analitici tradizionali ed innovativi anche a distanza di molti anni dalla raccolta. Ogni campione biologico è associato ai dati del

donatore: l'anamnesi clinica e familiare, l'eventuale patologia ed altri dati ritenuti di rilievo per studi specifici. Tutti i dati ottenuti sono trattati in modo conforme alle normative in vigore, sia per quanto riguarda la sicurezza e la tutela dei dati personali (D.lgs 196/2003 e successive raccomandazioni del Garante), sia per quanto riguarda i requisiti tecnici relativi alle modalità di conservazione (Linee Guida Internazionali).

La BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana rappresenta un centro di riferimento interistituzionale, in quanto consente la partecipazione alla realizzazione della BioBanca a strutture periferiche che non dispongono delle infrastrutture dedicate. Le caratteristiche strutturali, organizzative e gestionali di una BioBanca Interistituzionale sono le stesse di quelle di una BioBanca con unica sede di raccolta. Lo stoccaggio decentrato all'interno di Strutture Sanitarie satellite e/o l'invio alla BioBanca centrale di campioni biologici da parte di strutture di raccolta periferiche, rappresenta un momento di crescita delle Istituzioni che aderiscono al progetto e della BioBanca stessa, in quanto permette lo sviluppo della sua potenzialità in tempi molto più rapidi. Inoltre, l'afferenza di strutture con competenze sanitarie diversificate rispetto alla Istituzione in cui ha sede la BioBanca, ne determina la multidisciplinarietà della raccolta e la possibilità di creare/sviluppare una rete di afferenze multicentriche e multidisciplinari dagli Istituti (Pubblici/Privati di riferimento e di eccellenza per le diverse patologie) e dalle loro sedi periferiche coinvolte (Partner). In tale ottica e al fine di sviluppare una rete di collaborazioni interistituzionali/multidisciplinari, sono state stipulate apposite convenzioni nelle quali sono formalizzati le modalità e i criteri per:

- raccogliere, identificare e gestire i campioni conferendoli alla BioBIM IRCCS San Raffaele Pisana o conservarli presso la sede di raccolta, qualora la struttura sia idonea alla funzione;
- trasferire i dati inerenti i campioni e tutte le informazioni ad essi associate alla BioBanca IRCCS San Raffaele Pisana nel rispetto della tutela dei dati personali (D.lgs 196/2003 e successive raccomandazioni del Garante);
- assicurare il rispetto delle procedure (in particolare somministrazione del consenso informato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana e dal Comitato Etico dell'Istituzione partner).

Grazie a questa rete interistituzionale, la BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana include, oltre ad una popolazione di controllo costituita da soggetti apparentemente sani, i campioni delle patologie/discipline di maggiore rilievo nel settore della Sanità (patologie cardiovascolari e respiratorie, neurodegenerative, oncologiche, patologie dello sviluppo motorio e cognitivo e patologie rare), al fine di studiare i processi etio-patogenetici nella loro complessità e dinamicità.

## AREA DI RICERCA

### Diagnostica per Immagini

#### RESPONSABILE

A. Pierallini

#### STAFF

V. Bocina, M. De Santis, E. Ferone, A. Romano, G. Simonelli, C. Settecasì, D. Vricella.

Nell'arco del 2013 è stato messo a punto un sistema di proiezione di immagini e filmati in Risonanza Magnetica allo scopo di implementare l'attività di ricerca in risonanza magnetica funzionale con la stimolazione della corteccia visiva. Il sistema messo a punto si è rilevato molto utile anche nel ridurre l'ansia nei pazienti affetti da claustrofobia.

I principali campi di interesse dell'area di ricerca sono legati alla riabilitazione neurologica e cardiologica e sono focalizzati soprattutto sulla diagnosi e sull'individuazione di eventuali fattori prognostici dell'outcome riabilitativo neurologico, cardiovascolare e dell'età evolutiva.

A tal fine, il principale campo di ricerca è quello sullo studio della morfo-volumetria cerebrale e dello spessore corticale nei pazienti affetti sia da Sindrome di Down che da patologie neurodegenerative dell'adulto quali la malattia di Alzheimer, la paralisi sopranucleare progressiva, il morbo di Parkinson e le malattie demielinizzanti quali la sclerosi multipla. Allo studio puramente morfologico si è aggiunto nel corso del tempo, anche lo studio funzionale e trattografico. Tali ricerche vengono effettuate in collaborazione sia con strutture interne del nostro istituto, che esterne quali l'Università degli Studi di Roma la Sapienza con la II Facoltà di Medicina e Chirurgia.

Dal punto di vista cardiologico, la presenza di una TC 64 slices con tecnica "dual source" consente la valutazione dell'albero coronarico in modo non invasivo in pazienti affetti da coronaropatia, sospetta o accertata nonché la valutazione della volumetria cardiaca in pazienti con disfunzione ventricolare e studi di perfusione.

La Risonanza Magnetica fornisce in aggiunta i dati perfusionali, consentendo di individuare con precisione sede ed estensione delle aree infartuate. L'insieme dei dati provenienti dalla TC e dalla RM viene utilizzato nell'attività di ricerca in ambito cardiologico, principalmente indirizzata all'outcome riabilitativo.

L'attività di ricerca si è estesa nel 2013 ad altri settori, quali le paraparesi spastiche ereditarie con protocolli di ricerca in collaborazione con il Polo Pontino dell'Università di Roma "Sapienza", nei quali vengono utilizzate le nuove tecniche di volumetria cerebrale con lo studio dello spessore corticale e la trattografia.

## LINEE DI RICERCA

L'attività della ricerca corrente dell'IRCCS San Raffaele Pisana è organizzata secondo le seguenti linee di ricerca:

**Linea 1.** Studio dei determinanti cellulari, molecolari, genetici, elettrofisiologici e nutrizionali della riabilitazione motoria e sensoriale nelle malattie neurodegenerative e nel dolore.

- Determinanti cellulari, molecolari e genetici della risposta riabilitativa in modelli riproducenti le malattie neurodegenerative e cerebrovascolari e nel dolore cronico.
- Studio clinico dell'efficacia dell'esercizio fisico e/o dei presidi farmacologici e nutrizionali nel recupero funzionale delle malattie neurodegenerative e del dolore cronico.
- Identificazione delle variabili genetiche e molecolari che condizionano la risposta riabilitativa in pazienti affetti da morbo di Parkinson, malattia di Alzheimer, malattie cerebrovascolari e nel con dolore cronico.
- Malattie vascolari croniche che implicano un deficit funzionale.

**Linea 2.** Studio dei meccanismi di recupero funzionale nelle patologie croniche, disabilitanti dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.

- Determinanti cellulari, molecolari e genetici della risposta riabilitativa al training fisico in modelli riproducenti le patologie cronico-degenerative dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.
- Studio clinico dell'efficacia della riabilitazione e/o dei presidi farmacologici e nutrizionali nel recupero funzionale delle malattie cronico-degenerative dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.
- Studio delle malattie cronico-degenerative dell'apparato cardiovascolare e respiratorio come fattore di comorbilità che condiziona la risposta al trattamento riabilitativo in popolazioni fragili.

**Linea 3.** Sviluppo di sistemi innovativi per il monitoraggio ed il controllo della risposta al trattamento riabilitativo

- Definizione di un framework della complessità per un approccio di systems medicine per la realizzazione di integrated care per le persone in riabilitazione al fine di realizzare una piattaforma per patologie croniche ad alta complessità.
- Sviluppo di tecniche avanzate di neuroimaging per il monitoraggio della risposta e la predizione dell'outcome in pazienti con patologie neurologiche e cardiovascolari sottoposti a trattamento riabilitativo.
- Ripristino della funzionalità sensoriale o motoria attraverso lo sviluppo di nuove tecnologie per il miglioramento dei servizi di monitoraggio e dell'ambiente dei pazienti.

**Linea 4.** Studio delle disabilità dello sviluppo e neuroriabilitazione pediatrica

- Studio dei determinanti cellulari, molecolari e genetici delle disabilità pediatriche per un intervento terapeutico mirato.
- Studio qualitativo e quantitativo del cammino e dei movimenti in bambini con disabilità.
- Studio degli aspetti clinici, gestionali e riabilitativi che condizionano lo sviluppo del linguaggio e dell'apprendimento.
- Determinanti della qualità della vita del bambino con disabilità e della sua famiglia.

**Linea 5.** Identificazione di nuovi modelli organizzativi e gestionali per ottimizzare la ri-

sposta riabilitativa nel paziente disabile

- Studi epidemiologici sugli effetti della riabilitazione in specifiche popolazioni di pazienti affetti da patologie a prognosi severa.
- Formazione del paziente, del caregiver, del personale medico e del medico di medicina generale per la gestione del paziente disabile in riabilitazione.
- Valutazione dell'outcome riabilitativo attraverso l'impiego di tecniche radiologiche, morfologiche e funzionali.
- Utilizzazione di sistemi telemedicali e di nuove tecnologie ICT per garantire la continuità assistenziale nel territorio in pazienti con patologie croniche ed altamente invalidanti
- Attuazione del Governo Clinico della riabilitazione attraverso lo sviluppo di metodologie di verifica e di sistemi di monitoraggio dell'outcome e della qualità della vita.



## LINEA 1

Studio dei determinanti cellulari, molecolari, genetici, elettrofisiologici e nutrizionali della riabilitazione motoria e sensoriale nelle malattie neurodegenerative e nel dolore.

## AREA DI RICERCA NEUROMOTORIA

### *Utilizzo di un robot per la riabilitazione del cammino in soggetti affetti da malattia di Parkinson*

La riabilitazione del cammino nei soggetti con malattia di Parkinson è una delle sfide attuali della riabilitazione robotica: nuovi approcci terapeutico-riabilitativi che sfruttano le tecnologie robotiche.

L'obiettivo principale di questo studio randomizzato controllato consiste nel verificare se il training deambulatorio attraverso dispositivi elettromeccanici (come i treadmill e i Robot per la deambulazione) sia efficace nell'aumentare l'endurance in soggetti con malattia di Parkinson.

L'obiettivo secondario dello studio consiste nel confrontare gli effetti indotti da questi trattamenti sia sui parametri dell'andatura e dell'equilibrio, sia sulle misure specifiche per la malattia.

Sono stati inclusi nello studio trenta partecipanti che non presentavano alcun deficit cognitivo, con malattia di Parkinson e disturbi dell'andatura. I pazienti sono stati sottoposti ad un programma riabilitativo tramite robot o treadmill per 45 minuti, 5 volte alla settimana per 4 settimane.

Su 30 soggetti, dieci hanno raggiunto l'endpoint primario di un aumento minimo al Six minutes walking test (6MWT) di 50 metri. La mediana del 6MWT è stata di 15,7 metri. Il punteggio totale della Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) ha mostrato un miglioramento significativo in tutto il gruppo, dopo l'allenamento del cammino, senza differenze tra i gruppi di trattamento.

La scala FOG -Q ha mostrato un significativo miglioramento dopo l'allenamento sia in tutto il campione che nel sottogruppo robot.

La scala Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39) ha mostrato un punteggio migliorato in tutto il campione così come nel gruppo robot.

Nelle persone con malattia di Parkinson un addestramento intensivo del camminare è fattibile con un aumento significativo della resistenza in almeno un terzo dei soggetti, indipendentemente dall'età, durata della malattia, dalla gravità della compromissione motoria e della disabilità del cammino.

### *Stimolazione dei neuroni mirror nei pazienti con malattia di Parkinson per il recupero funzionale dell'arto inferiore e superiore*

Lo studio randomizzato controllato ha come obiettivo l'analisi della efficacia di un trattamento riabilitativo associato alla stimolazione dei neuroni mirror per la deambulazione e per l'arto superiore nell'aumentare le performance motorie in soggetti con malattia di Parkinson.

Nella fase preliminare dello studio per la scelta delle azioni e dei video da utilizzare, sono stati inclusi partecipanti che non presentavano alcun deficit cognitivo, con malattia di Parkinson e disturbi dell'andatura.

I soggetti sono stati sottoposti ad un programma riabilitativo tramite stimolazione dei neuroni mirror e ripetizione del gesto funzionale per circa 45 minuti, 5 volte alla settimana per 4 settimane.

Dall'analisi dei risultati sono stati scelti i video migliori, che hanno dato risultati migliori in termini di: tipo di gesto funzionale, miglioramento delle performance e gradimento da parte dei pazienti. Sono stati testati inoltre i protocolli di valutazione proposti per

verificare la fattibilità della valutazione e del trattamento.

Al termine di questa analisi preliminare sono stati selezionati i primi pazienti che sono entrati nello studio randomizzato.

## AREA DI RICERCA CEFALEA E DOLORE NEUROPATICO

*Caratterizzazione clinica, disabilità, risposta terapeutica ed outcome dell'emicrania in pazienti con segni di attivazione del riflesso trigemino-autonomico*

I sintomi autonomici cranici unilaterali (UAs) quali la lacrimazione, l'iniezione congiuntivale, l'edema palpebrale, la congestione nasale e la rinorrea sono frequenti negli emicranici essendo stati descritti in circa 1 paziente su 2 (45.8%) nella popolazione afferente ad un centro cefalee di terzo livello ed in più di 1 emicranico su 4 (26.9%) in studi di popolazione. Gli UAs sono conseguenza dell'attivazione del sistema parasimpatico cranico. L'aumento contemporaneo di peptide geneticamente correlato alla calcitonina (CGRP) e di peptide intestinale vasoattivo (VIP) nel sangue della vena giugulare esterna ipsilaterale al dolore durante gli attacchi di emicrania suggeriscono infatti l'attivazione di un riflesso trigemino-parasimpatico. L'attivazione parasimpatica potrebbe, dunque, provocare la lacrimazione, l'iniezione congiuntivale, la rinorrea e l'ostruzione nasale che compaiono durante l'attacco. Sebbene nella pratica clinica non è infrequente ritrovare soggetti emicranici che presentano UAs, finora pochi studi sistematici sono stati condotti a tal riguardo. Obiettivo di questo studio è, dunque, valutare la prevalenza di UAs negli emicranici ed identificare le caratteristiche cliniche di tale popolazione.

Sono stati studiati in modo consecutivo tutti i soggetti affetti da emicrania con e senza aura, emicrania cronica con e senza abuso di farmaci, afferenti all'IRCCS San Raffaele Pisana dal 1 Gennaio 2010 al 31 Dicembre 2012. Ai tutti pazienti è stato richiesto di firmare un Consenso Informato allo studio. E' stata somministrata un'intervista semistrutturata per la raccolta dei dati clinici delle caratteristiche diagnostiche dell'emicrania con e senza aura, dell'emicrania cronica con e senza abuso di farmaci quali familiarità per emicrania, esordio del dolore, durata di malattia, durata di cronicizzazione, durata di abuso di farmaci, localizzazione, tipo, frequenza, intensità, durata del dolore, prodromi, fenomeni d'accompagnamento (fotofobia, fonofobia), allodinia, terapia per l'attacco, farmaci di profilassi, risposta ai triptani. La presenza di UAs è stata indagata attraverso domande specifiche e soggetti con almeno uno dei sintomi quali lacrimazione, iniezione congiuntivale, edema palpebrale, congestione nasale, rinorrea, durante l'attacco di emicrania, sono stati considerati emicranici con UAs, differenziandoli dagli emicranici senza UAs. Sono stati inoltre raccolti dati relativi alle abitudini di vita e voluttuarie (fumo, caffè, alcol, BMI, stato civile), comorbidità, uso di contraccettivi orali ed altre terapie concomitanti di tutti i partecipanti allo studio.

Sono stati arruolati 757 emicranici (F/M 604/153) di cui 283 con UAs e 474 senza UAs. Centocinquanta soggetti (53%) hanno presentato un unico sintomo, 108 (38.2%) due e 25 (8.8%) tre sintomi in combinazione. Il 61.8% degli emicranici con UAs ha mostrato esclusivamente sintomi oculari (lacrimazione e/o iniezione congiuntivale e/o edema palpebrale), il 25.8% sintomi oculari contemporaneamente a quelli nasali (congestione e/o rinorrea) ed il 12.4% sintomi nasali isolati. Lo studio ha confermato la sede unilaterale ( $p < 0.001$ ), la qualità pulsante ( $p = 0.044$ ), la maggiore intensità ( $p < 0.005$ ) e durata ( $p < 0.001$ ) del dolore dei soggetti con UAs rispetto ai controlli. I fenomeni associati all'attacco emicranico quali prodromi ( $p = 0.042$ ), fotofobia ( $p < 0.001$ ), fonofobia

( $p=0.003$ ), allodinia ( $p<0.001$ ) e postdromi ( $p=0.062$ ) sono comparsi negli emicranici con UAs più frequentemente rispetto a quelli senza UAs.

Così come già riportato in studi precedenti, la presenza di UAs durante l'attacco emicranico ha rappresentato un elemento predittivo di buona risposta ai triptani ( $p<0.001$ ) rispetto agli emicranici senza UAs. Non sono state riportate differenze statisticamente significative negli emicranici con e senza UAs relative a comorbidità, uso di contraccettivi orali ed altre terapie concomitanti, abitudini voluttuarie (fumo, caffè, alcol, BMI). Gli emicranici con UAs sono stati identificativi con uno stato civile di coppia rispetto agli emicranici senza UAs ( $p=0.046$ ). È in corso la stesura di un lavoro scientifico.

### *Studio prospettico sulla prevalenza e caratteristiche dell'emicrania in una popolazione di atleti afferenti al CONI*

L'associazione tra sport ed emicrania è nota fin dai tempi di Ippocrate che per primo ne descrisse la comparsa in un gruppo di studenti in seguito ad attività sportiva (ginnastica, corsa, camminata veloce, etc). Gli studi condotti sulla prevalenza dell'emicrania negli atleti sono risultati finora sporadici e scarsamente esaurienti, effettuati per lo più su sport specifici (quali, ad esempio, pallacanestro, corsa, etc). Pertanto le basi scientifiche di riferimento, in tema di esercizio fisico ed emicrania, si riferiscono a studi aneddotici o osservazionali in aperto senza popolazioni di controllo.

Lambert e Barnett in uno studio condotto sull'esercizio fisico e l'emicrania hanno concluso che l'esercizio fisico potrebbe rappresentare un trigger per l'emicrania così come l'altitudine o l'ipoglicemia. In un altro studio, Lockett e Campbell asseriscono, al contrario, che l'esercizio fisico diminuisce sia l'intensità che lo stress nel percepire il dolore dell'attacco emicranico. Per quanto riguarda la prevalenza dell'emicrania negli atleti, uno studio condotto da Williams nel 1994 presso l'Università di Otago, ha evidenziato che più di un terzo degli atleti lamentava emicrania correlato allo sport. Sempre in uno studio sulla prevalenza dell'emicrania condotto in Australia ed effettuato su una popolazione di giocatori di football, è risultato che il 50% di questi soffriva di emicrania ed approssimativamente il 25% di emicrania correlata con lo sport.

Lo scopo del presente progetto è quello di valutare, in una popolazione di atleti, la prevalenza e le caratteristiche dell'emicrania; il rapporto intercorrente tra tipo di cefalea e tipo di pratica agonistica, con riferimento anche al timing di insorgenza del dolore in rapporto al carico dell'allenamento o della gara; il comportamento, terapeutico e non, dell'atleta con l'insorgenza dell'attacco emicranico.

Sono stati arruolati consecutivamente tutti gli atleti afferenti per le regolari visite di idoneità sportiva presso l'Istituto di Medicina e Scienza dello Sport del C.O.N.I. di Roma, a partire dal 1 settembre 2011, secondo i seguenti criteri di inclusione: età  $\geq 14$  anni; attività sportiva agonistica; atleti afferenti all'Istituto di Medicina e Scienza dello Sport del C.O.N.I.; atleti in buona salute secondo l'opinione del medico sulla base di una valutazione iniziale che include la storia medica e l'esame fisico; atleti in grado di comprendere le procedure dello studio e che acconsentivano volontariamente a partecipare allo studio firmando il consenso informato; in grado di completare i questionari valutativi previsti da protocollo e diario. Sono stati esclusi dallo studio: gli atleti non in grado di comprendere le procedure dello studio e di completare i questionari; gli atleti non in grado di comprendere e firmare il consenso informato.

A tutti gli atleti è stato consegnato un questionario autosomministrato per indagare analiticamente dati personali e sportivi, anamnesi generale, medica e per le cefalee.

Il questionario è stato completato da tutti gli atleti a cui è stato distribuito ( $n=331$ ; M/

F=212/119; età media=25.5+6.6). 89 soggetti (26.8%) hanno riportato emicrania (M/F=44/45); di questi emicrania senza aura = 56, probabile emicrania senza aura = 18, cefalea tensiva = 15. 44 atleti hanno riferito la comparsa di emicrania sia in correlazione che al di fuori dell'esercizio fisico, 13 in associazione con la pratica sportiva o la competizione e 32 indipendentemente dalla pratica sportiva. Non sono state riscontrate correlazioni tra la specifica pratica sportiva e l'incidenza o specifiche caratteristiche cliniche dell'emicrania. E' in corso una più accurata elaborazione statistica per poter procedere con la stesura del lavoro.

## AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO

### *Studio caso-controllo sui fattori di rischio familiari e diagnosi precoce della malattia di Parkinson*

Nella maggior parte dei casi le cause della Malattia di Parkinson (MdP) restano sconosciute e modelli di tipo monogenico non sembrano molto verosimili. Probabilmente ci si trova di fronte a complesse interazioni di molti fattori di tipo genetico e non-genetico. La MdP tende a ricorrere nella stessa famiglia più frequentemente di quanto possa avvenire per effetto del caso. Questo fenomeno viene ormai confermato in modo molto consistente dagli studi epidemiologici. Circa il 15-25% dei pazienti riferisce infatti la presenza di familiarità positiva. La ricorrenza familiare di una malattia non è sinonimo di ereditarietà; esistono infatti molti altri fattori, come esposizioni ambientali, occupazionali, ecc. che tendono a ricorrere nelle famiglie, e potrebbero avere un ruolo nel determinare l'aggregazione familiare di malattia. La potenziale multifattorialità dell'eziologia della MdP, combinata alla presenza di un quadro di debole suscettibilità genetica sostiene un modello di interazione gene-ambiente come modello eziologico preferenziale. In associazione con l'identificazione dei fattori di suscettibilità genetica, la letteratura ha riportato alterazioni nella distribuzione in casi e controlli di alcuni fattori fenotipici, fra cui l'instabilità genetica ed il danno al DNA. A completamento delle variabili considerate nella definizione del modello eziopatologico del Parkinson, una serie di variabili ambientali sono state investigate in studi di tipo clinico ed epidemiologico. Fra queste, vari aspetti dello stile di vita: la dieta, l'occupazione, la residenza. Anche parametri di funzionalità fisiologica sono stati in varie occasioni considerati come predittori dello sviluppo di malattia.

Obiettivo di questo studio osservazionale di tipo caso controllo è il calcolo dell'Odds Ratio per i singoli fattori di rischio, di tipo genetico (Single-nucleotide polymorphism - SNPs), ambientale (Occupazione, life-style, etc.), clinici (stipsi, etc.). Ulteriori endpoints riguardano: i) la valutazione dell'interazione gene-ambiente fra le SNPs valutate nei gruppi in studio con i fattori di rischio della malattia; ii) validazione dei principali meccanismi connessi con le fasi precoci della malattia; iii) creazione di un biorepository per lo studio dei fattori di rischio della MdP.

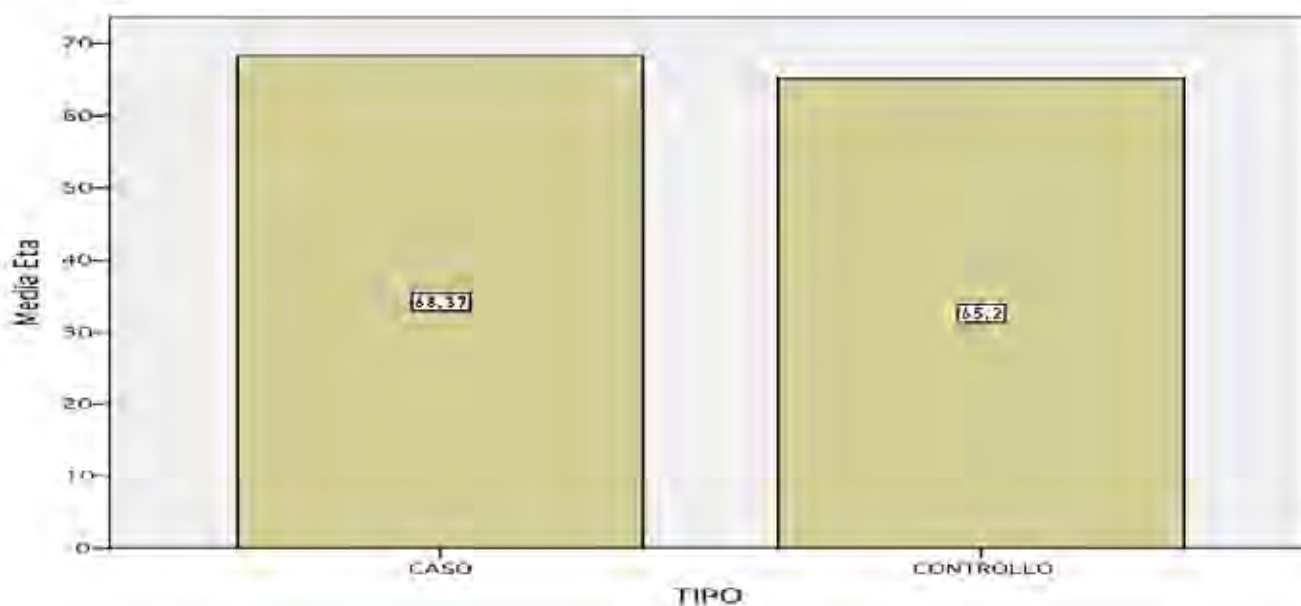
La popolazione dei casi è rappresentata dai soggetti con diagnosi confermata di MdP afferenti agli ambulatori del servizio di neuroriabilitazione dell'IRCCS San Raffaele Pisana. I controlli, appaiati per sesso ed età ( $\pm 5$  anni) sono stati selezionati fra gli afferenti al centro riabilitativo San Raffaele Pisana per prestazioni non legate a patologie di tipo neurodegenerativo.

A tutti i soggetti che finora hanno dato il consenso a partecipare allo studio è stato somministrato un questionario da personale addestrato. L'intervista, proposta dopo gli ac-

certamenti clinici di routine, ha una durata di circa 15 minuti. La dimensione dello studio è stata valutata con il software dedicato Power 3.0. I parametri inseriti sono stati scelti sulla base della prevalenza della familiarità con pazienti affetti dalla malattia di Parkinson nella popolazione generale ( $p_1$ ). Pertanto, dato  $p_1=.20$ ; Ratio Case to Controls 1:1;  $a = 0.05$ ;  $1-b=.80$ , per trovare significativo un OR di 1.30 corrispondente ad un rischio di malattia aumentato del 30% per il fatto di avere un parente di primo grado affetto da Parkinson sarà necessario reclutare 1000 pazienti affetti dalla malattia di Parkinson ed altrettanti controlli (circa 2000 soggetti complessivamente).

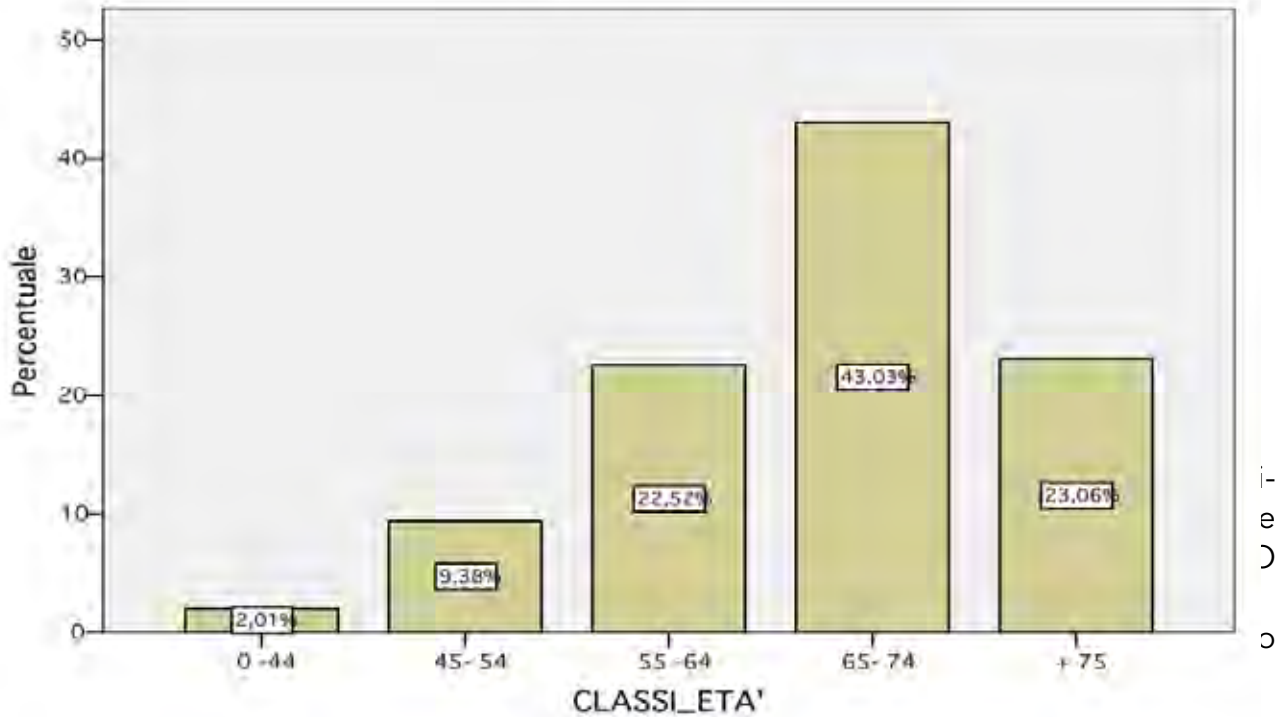
Nel 2013 il questionario predisposto è stato somministrato a 746 soggetti ed ha rilevato la presenza per la maggior parte di pazienti classificati come CASI (67.2%) vs CONTROLLI (32.8%). La rilevazione dei soggetti intervistati mostra che il campione sia rispetto alla variabile sesso e sia rispetto al tipo paziente per età media è ugualmente rappresentato:

	Frequenza	%	% valida	% cumulata
<b>FEMMINA</b>	363	48,7	48,7	48,7
<b>MASCHIO</b>	383	51,3	51,3	100,0
<b>Totale</b>	746	100,0	100,0	



Il livello di istruzione è medio alto (i diplomati sono il 37.4% e i laureati 23.3%) con età media di 67 anni, deviazione standard 9.62. I soggetti sono per lo più concentrati nella penultima classe (43.03%) nella quale ricadono tendenzialmente persone con età in cui si inizia ad andare in pensione; altro aspetto da notare è la quasi uguaglianza delle due classi 55-64 (non ancora età del tutto pensionabile) e 75+ anni (sicuramente età pensionabile) infatti i soggetti sono per il 57.1% pensionati.

### CLASSI\_ETA'



	TIPO CASO Conteggio	CONTROLLO Conteggio
FEMMINA	199	164
MASCHIO	302	81

Test Chi-quadrato di Pearson

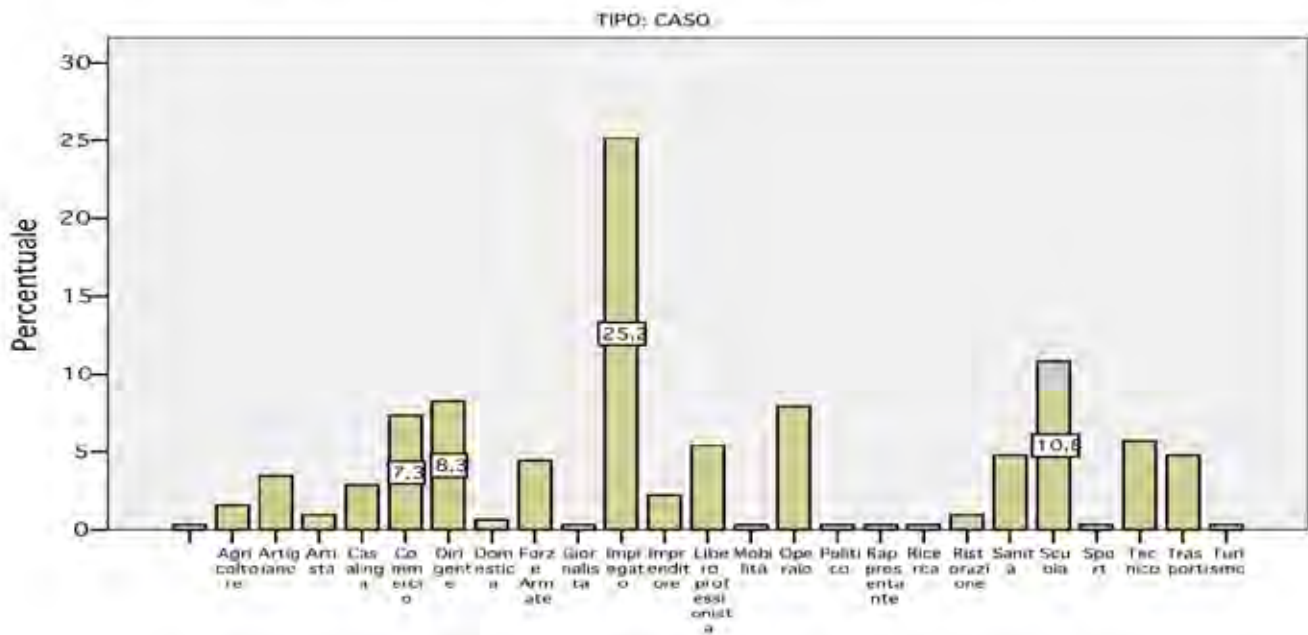
SEX	Chi-quadrato	TIPO
	48,793	
	df	1
	Sig.	,000(*)

I risultati sono basati sulle righe e colonne non vuote di tutte le tabelle più interne.

\* La statistica Chi-quadrato è significativa al livello 0.05.

Essendo il progetto volto allo studio dell'incidenza dell'ambiente lavorativo all'origine della MdP si nota che la variabile ultima attività lavorativa rispetto al tipo paziente il 25.2% dei CASO ha ricoperto un ruolo di impiegato e a seguire con il 10.8% ha svolto attività in ambito scolastico.

## ULTIMA ATTIVITA' PRIMA DEL PENSIONAMENTO



Vista la difficoltà a raggiungere il target prestabilito, condizione necessaria per raggiungere la significatività statistica, si è deciso di prorogare l'arruolamento dei pazienti a tutto il 2014.

### *Studio di comorbidità in pazienti geriatrici affetti da malattia di parkinson*

La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa ad incidenza crescente nella popolazione. Nei pazienti in età geriatrica (>65 anni) tale patologia, ad andamento cronico e progressivo, frequentemente si associa alla presenza di comorbidità, anch'esse a carattere cronico, che concorrono a configurare un quadro di "fragilità" clinica. Tale condizione, non solo comporta un aumento del rischio di disabilità funzionale, istituzionalizzazione e morte, con notevoli conseguenze socio-economiche, ma potrebbe condizionare, attraverso meccanismi fisiopatologici diretti ed indiretti, il decorso stesso della patologia e la risposta alla terapia farmacologica. Un valido strumento, in grado di quantificare il peso della comorbidità sul paziente, è rappresentato dalla Cumulative Illness Rating Scale (CIRS) e, con particolare riferimento alla popolazione oggetto del nostro studio, dalla revisione della scala per l'età geriatrica CIRS-G. Essa fornisce un punteggio totale che scaturisce dalla valutazione del grado di compromissione di 14 organi/sistemi. Oltre al punteggio totale, possono essere calcolati ulteriori indici descrittivi (Indice di Severità della Comorbidità e Indice di Comorbidità Complessa). Tali indici forniscono una stima rispettivamente della severità di comorbidità media e del numero di organi affetti da patologia cronica di grado moderato/severo. Nella compilazione della scala CIRS-G non è stato tenuto conto della presenza della malattia di Parkinson, dato che accomunava tutti i partecipanti. Per ogni paziente è stata raccolta una dettagliata anamnesi patologica e farmacologica al fine di ottenere un dato sulla polifarmacoterapia, argomento che merita particolare attenzione nel paziente anziano. In aggiunta alla scala di comorbidità, per ogni paziente è stato utilizzato lo strumento della valutazione multidimensionale geriatrica ed alcune scale di valutazione e stadiazione della malattia di Parkinson.

Obiettivo dello studio è quello di valutare la presenza di comorbidità in pazienti am-



bulatoriali ultrasessantacinquenni affetti da malattia di Parkinson attraverso la somministrazione della scala CIRS-G (Punteggio totale-Indice di Severità della Comorbidità-Indice di Comorbidità Complessa) ed analizzarne le eventuali associazioni con: qualità della vita del paziente, eventuale deficit cognitivo, disabilità funzionale ed outcome sfavorevoli quali istituzionalizzazione e morte. Attraverso l'analisi dei dati si è cercato di comprendere se ed in quale misura la presenza di comorbidità e quindi di poli-farmacoterapia possano determinare una ridotta risposta alla terapia specifica per il Parkinson e di conseguenza una più veloce progressione di malattia o una maggiore incidenza di complicanze motorie.

Per ogni paziente è stata compilata una scheda clinica comprendente: valutazione della patologia neurologica con stadiazione clinica secondo Hoehn & Yahr e anamnesi patologica prossima e remota (attraverso intervista al paziente e caregiver e valutazione della documentazione clinica disponibile), raccolta degli indici antropometrici e calcolo del BMI. Sulla base dei dati raccolti è stata quindi compilata la scala CIRS-G calcolando per ogni paziente il punteggio totale e due ulteriori indici descrittivi (Indice di Severità della Comorbidità e Indice di Comorbidità Complessa). Sono stati, inoltre, somministrati ad ogni soggetto arruolato: Mini-Mental State Examination per la valutazione dello stato cognitivo (MMSE), Activities of Daily Living (ADL) ed Instrumental Activities of Daily Living (IADL) per la valutazione dell'autonomia nelle attività semplici e complesse del vivere quotidiano, (EuroQoL) EQ-5D per la valutazione della qualità di vita del paziente. Sono stati annotati in cartella dati su eventuali ricoveri effettuati nell'ultimo anno.

Sono stati arruolati 100 pazienti provenienti dagli ambulatori San Raffaele affetti da malattia di Parkinson, 52 maschi e 48 femmine. Le caratteristiche del campione sono documentate nella tabella 1.

**Tabella 1. Caratteristiche del campione**

<b>Baseline Characteristics</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Standard</b>
<b>ETA'</b>	73.2	5.54
<b>SCOLARITA'</b>	10.01	4.60
<b>ANNI DI MALATTIA</b>	7.15	5.26
<b>HY</b>	2.48	0.66
<b>BMI</b>	25.86	3.98
<b>N. FARMACI PER PD</b>	2.06	0.98
<b>N. FARMACI ALTRE PATOLOGIE</b>	2.50	2.17

La Tabella 2 mostra i risultati degli indici descrittivi relativi alla scala CIRS-G e i risultati della valutazione multidimensionale geriatrica (stato cognitivo e autonomia funzionale).

**Tabella 2: Risultati CIRS-G, MMSE, ADL, IADL**

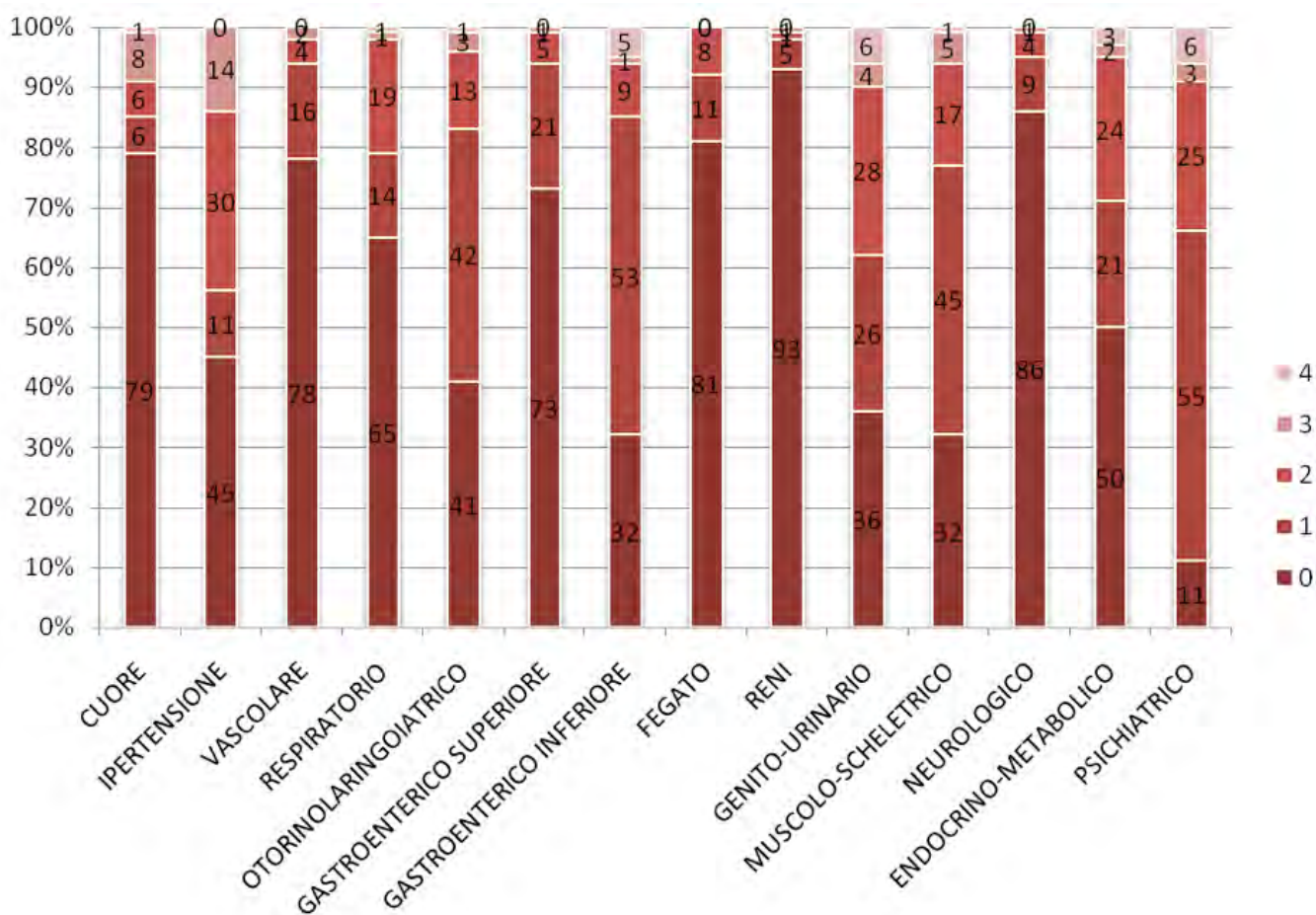
<b>Baseline Characteristics</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Standard</b>	<b>Mediana</b>	<b>Minimo</b>	<b>Massimo</b>
<b>TSC</b>						
Total	100	9.55	3.75	10	2	21
<b>SV13</b>						
Total	100	0.63	0.27	0.65	0.07	1.31
<b>CM13</b>						
Total	100	2.25	1.43	2	0	6
<b>CM14</b>						
Total	100	2.6	1.50	2.5	0	7
<b>MMSE</b>						
Total	100	24.95	4.54	26	7.4	30
<b>ADL</b>						
Total	100	5.54	1.04	6	1	6
<b>IADL</b>						
Males	52	4.27	1.07	5	2	5
Females	48	5.50	1.97	6	1	8
Total	100	4.86	1.68	5	1	8

La Tabella 3 mostra i risultati della scala EQ-5D per la valutazione della qualità di vita.

<b>Baseline Characteristics EQ5-D</b>	<b>Media</b>	<b>Deviazione Standard</b>
<b>MOBILITA'</b>	1.75	0.43
<b>CURA DI SE'</b>	1.64	0.58
<b>ATTIVITA' USUALI</b>	1.63	0.53
<b>DOLORE/DISAGIO</b>	1.54	0.50
<b>ANSIA/DEP</b>	1.76	0.56
<b>EQ5-D VAS</b>	57.93	19.73

È stata effettuata una analisi della distribuzione della frequenza delle varie patologie nel campione di pazienti parkinsoniani (Figura 1).

**Figura1: distribuzione delle patologie per sistema e severità di comorbidità nel campione di 100 pazienti con PD.**



I risultati dello studio hanno mostrato la presenza, oltre alla malattia di Parkinson, di almeno una patologia cronica concomitante di grado moderato/severo nel 90.5% del campione. L'indice di comorbidità complessa ha evidenziato una media di patologie croniche (oltre alla malattia di Parkinson) di grado moderato/severo per paziente di  $2.60 \pm 1.50$ . Il grado di compromissione medio dei vari sistemi/organi è risultato, tuttavia, essere, in media, lieve (SV index medio  $0.63 \pm 0.27$ ).

Le patologie più frequentemente presenti nei pazienti sono risultate essere: ipertensione arteriosa (55% del campione), patologie oculistiche/otorinolaringoiatriche (59% del campione), patologie dell'apparato gastroenterico inferiore (68% del campione), patologie dell'apparato genito-urinario (64% del campione), patologie dell'apparato muscolo-scheletrico (68% del campione), patologie psichiatriche - in questa sezione la scala include anche il deficit cognitivo- (89% del campione).

Un'analisi mirata ad evidenziare l'assunzione cronica di farmaci nel campione ha mostrato come, in media, ogni paziente assumeva  $2.06 \pm 0.98$  farmaci per la cura della malattia di Parkinson e  $2.50 \pm 2.17$  farmaci per la cura delle malattie croniche concomitanti. Inoltre, nel 43% del campione andava aggiunto un farmaco antidepressivo/ansiolitico e nel 6% dei pazienti un antipsicotico.

I test della valutazione multidimensionale geriatrica hanno mostrato un quadro cognitivo medio del campione al limite con il decadimento cognitivo lieve (MMSE me-

dio=24.95±4.54). I pazienti presentavano in media una buona autonomia nelle attività basilari della vita quotidiana, con alcune disabilità nelle attività complesse, dato confermato anche dai punteggi medi alla scala EQ-5D. I punteggi della EQ-5D VAS, che rilevano lo stato di salute percepita dal paziente stesso su una scala da 0 a 100, hanno evidenziato, comunque, in media una buona qualità di vita, malgrado la malattia di Parkinson e le altre comorbidità. Dai dati raccolti al baseline emerge l'importanza della valutazione globale del paziente geriatrico con malattia di Parkinson. Nella gestione medica di questo paziente è di fondamentale importanza integrare l'aspetto neurologico con quello internistico, che peraltro più di quello neurologico nella maggior parte dei casi condiziona la prognosi e la qualità di vita del paziente. Nella prescrizione dei farmaci per la gestione della malattia di Parkinson è inoltre molto importante considerare le interazioni con i farmaci per le altre comorbidità ed eventualmente aggiustarne i dosaggi. Non appena saranno disponibili i dati completi del follow-up, si potrà inoltre capire quanto la presenza di comorbidità somatiche possa influire sull'andamento della patologia neurologica e quanto questa condizioni la risposta alla terapia farmacologica.

#### *La stimolazione transcranica con correnti dirette (tDCS) nei pazienti affetti da malattia di Parkinson in fase avanzata*

La Stimolazione transcranica con Correnti Dirette (transcranial Direct Current Stimulation - tDCS) è una metodica di stimolazione cerebrale non invasiva capace di indurre cambiamenti funzionali nella corteccia cerebrale. La tDCS consiste essenzialmente nell'applicazione sullo scalpo di elettrodi eroganti una corrente continua di bassa intensità in grado di attraversare lo scalpo e influenzare le funzioni neuronali. Scopo dello studio, è stato quello di valutare l'eventuale efficacia della tDCS sulla velocità del movimento, sulla deambulazione e sulle discinesie (outcome primario) di pazienti parkinsoniani con gravità moderata di malattia. Come outcome secondari sono state valutate le eventuali modifiche della qualità della vita e della eventuale depressione. Durante il primo anno di attività del progetto in oggetto è stato innanzitutto valutato su un gruppo di 5 pazienti ricoverati in day hospital e/o regime di degenza dell'IRCCS San Raffaele Pisana il sistema tDCS in modalità sham (placebo-senza erogazione di corrente) per validare la gestione del corretto auto-trattamento a domicilio. I primi risultati hanno dimostrato come i pazienti con discinesie, con minimo aiuto, riuscivano a indossare la cuffia e a effettuare il ciclo di trattamento con un minimo di training i primi giorni. Validata la procedura si è passati a includere i primi soggetti nello studio. Sono stati arruolati nello studio 10 pazienti le cui caratteristiche cliniche sono riportate nella tabella 1.

Tutti i pazienti hanno effettuato un ciclo completo di trattamento a domicilio di tDCS secondo il seguente protocollo:

- Prima visita neurologica e fisiatrica per la somministrazione di scale e test clinici (Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), The Timed Up and Go (TUG) Test e 6 minute walking test GAIT Analysis) all'inizio dello studio. Somministrazione delle prime 60 stimolazioni (2 volte al giorno per 30 giorni) in singolo cieco e in modalità sham per analizzare l'effetto placebo del trattamento sui soggetti.
- Seconda visita neurologica e fisiatrica: somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 min walking teste GAIT Analysis) alla fine del primo trattamento.
- Periodo di wash-out di 30 giorni.
- Terza visita neurologica e fisiatrica: somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 minute walking test, GAIT Analysis) all'inizio del secondo trattamento.

- Somministrazione del secondo trattamento composto di 60 stimolazioni di tipo catodico sulla corteccia motoria premotoria bilaterale mettendo l'anodo di riferimento sulla spalla sinistra (2 volte al giorno per 30 giorni) in singolo cieco e ad intensità di 1500 uA per analizzare l'effetto placebo del trattamento sui soggetti.
- Quarta visita neurologica e fisiatrica somministrazione di scale e test clinici (UPDRS, TUG 10m e 6 min walking test e Gait Analysis) alla fine del secondo trattamento.
  - L'indicazione oraria alle stimolazioni per il primo e secondo trattamento è stata 30 minuti prima della seconda dose di farmaco mattutina e 30 minuti prima della seconda dose di farmaco pomeridiana con il paziente in stato OFF.

Pazienti	Età	Sesso	Anni di malattia	H&Y	Anni di terapia
G-C	54	M	12	3	11
C-C	78	M	7	3	6
A-M	71	M	11	3	10
C-C	60	F	6	3	6
M-R	67	F	12	3	11
R-C	70	M	14	3	12
S-P	62	M	9	2.5	9
C-V	74	F	15	3	14
C-E	78	M	16	3	15
R-O	43	M	7	3	6

**Tabella 1: caratteristiche cliniche dei pazienti**

I risultati clinici hanno mostrato come il trattamento domiciliare sia stato ben accetto dai pazienti e ben tollerato. La metà dei pazienti ha riferito difficoltà nel posizionamento e nel perfetto funzionamento degli elettrodi per mancata aderenza al cuoio capelluto e conseguente mancata attivazione della stimolazione e interruzione della stessa. Si è resa necessaria quindi una ulteriore seduta di training per la spiegazione del corretto posizionamento e utilizzo degli elettrodi. Tutti i pazienti hanno riportato una sensazione di formicolio nel sito di stimolazione senza però riferire dolore. Tutti i pazienti hanno terminato correttamente entrambi i cicli di studio. I risultati finali non hanno mostrato variazioni nella media dei punteggi della UPDRS III dopo il ciclo di stimolazione attiva (da 29,4 a 28,1) e dopo il ciclo sham (da 30,2 a 29,5). Si sono modificati in misura significativa solo i parametri della scala riguardanti la bradicinesia come il finger tapping, hand movement e rapid alternate movement, dato questo che concorda con la letteratura. L'efficacia della tDCS si è rilevata più evidente dopo la prima seduta di trattamento con miglioramento in acuto della parte motoria della UPDRS. I valori dell'Abnormal Involuntary Movement Scale (AIMS) non si sono modificati significativamente nel corso dello studio, ma è stata riportata una riduzione nella durata delle discinesie (ore giornaliere con movimenti involontari) come evidenziato dall'item 32 della parte IV dell'UPDRS. Non è stata osservata nessuna modifica della gravità della discinesie così come della presenza di distonia mattutina. Non si sono verificate modificazioni significative nei punteggi della H&Y (Stimolazione: da 2,77 a 2,33 e Sham da 2,8 a 2,54), della Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ39) e della Beck Depression Inventory (BDI) in accordo a quanto riportato nelle parti I e II della UPDRS.

**Tabella 1: Medie delle punteggi ottenuti nelle varie valutazioni cliniche.**

<b>SCALE</b>	<b>PRE-STIM MEDIA</b>	<b>POST-STIM MEDIA</b>	<b>PRE-SHAM MEDIA</b>	<b>POST-SHAM MEDIA</b>
<b>UPDRS III</b>	29,4	28,1	30,5	29,5
<b>H&amp;Y</b>	2,77	2,33	2,83	2,54
<b>PDQ-39</b>	53,27	53,1	58,0	59,5
<b>NMS</b>	49,3	53,1	46,6	48,1
<b>TEN MIN WLK TEST (m/sec)</b>	1,05	1,06	0,89	0,95
<b>TUG (sec)</b>	34,9	31,39	24,06	24,86
<b>AIMS</b>	11,2	11,2	11,2	11,4

L'analisi della GAIT ha mostrato come sia il trattamento che la stimolazione sham modifichino i parametri spazio temporali dei soggetti trattati con un aumento della velocità del cammino, una normalizzazione verso i parametri fisiologici umani della fase di swing e distance e un miglioramento della larghezza dell'appoggio di entrambi i piedi. Il meccanismo con cui la tDCS può migliorare le performance motorie nei pazienti parkinsoniani è per lo più sconosciuto ma potrebbe coinvolgere il rilascio di dopamina nel nucleo caudato e nel putamen. L'attivazione diffusa della corteccia ottenuta mediante tDCS e il conseguente rilascio di dopamina potrebbe spiegare il miglioramento delle performance motorie evidenziato in acuto nei pazienti. In studi clinici l'aumento dei livelli di dopamina è stato però osservato anche dopo stimolazione sham, sia nei pazienti trattati con stimolazione elettrica che con stimolazione magnetica evidenziando l'importante effetto placebo che caratterizza questi tipi di trattamento. E' in quest'ottica che il miglioramento ottenuto in acuto evidenziato nei pazienti potrebbe essere dovuto ad un maggiore effetto placebo durante la prima seduta di trattamento.

*Studio sulla differenza di percezione consapevolezza dei movimenti involontari tra i parkinsoniani e i loro caregivers*

La malattia di Parkinson (MdP) è una patologia degenerativa che colpisce i neuroni di una specifica regione cerebrale, la sostanza nera. La sostanza nera produce dopamina, neurotrasmettitore di importanza centrale nel controllo motorio. I sintomi principali della malattia di Parkinson derivano dalla perdita di neuroni della sostanza nera che determina una riduzione nella produzione di dopamina. Tale perdita produce rigidità, bradicinesia e tremore a riposo. L'obiettivo di questo studio è quello di analizzare la percezione e la consapevolezza dei movimenti involontari tra i parkinsoniani e i loro caregivers utilizzando un nuovo questionario Parkinson's disease /Caregivers Symptoms check list (PD-C SCL). Le aree analizzate sono: difficoltà nel linguaggio, problemi psichiatrici (eccitamento, ossessività, movimenti involontari (tronco, arti, capo), blocchi o rallentamento motorio grave, tremore (capo, arti, freezing, cadute, calo di memoria o attenzione, apatia, gioco d'azzardo). La popolazione dei casi è rappresentata dai soggetti con diagnosi confermata di MdP afferenti agli ambulatori del servizio di neuroriabilitazione dell'IRCCS San Raffaele Pisana e il loro caregivers. A tutti i soggetti che danno il consenso a partecipare allo studio è somministrato un questionario da personale addestrato. Durante la visita che dura circa 45 minuti vengono somministrati: il questionario sulle discinesie Parkinson's disease /Caregivers Symptoms check list (PD-C SCL), Montreal Cognitive Assessment (MoCA), Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS), Hoehn and Yahr scale (H&Y). Ai caregivers è stato somministrato esclusivamente il PD-C SCL. Il questionario PD-C SCL è stato messo a punto dalla neuropsicologa del gruppo. Le aree prese in conside-

razione sono le seguenti: difficoltà nel linguaggio, sintomi psichiatrici (apatia, agitazione/ aggressività, gioco d'azzardo e altri sintomi ossessivo-compulsivi), discinesie del tronco, arti, collo e volto, freezing, stato di off, cadute, deficit di memoria e attenzione, tremore del volto, arti superiori ed inferiori. Il questionario è stato somministrato a 60 soggetti, 30 pazienti, (età media= 67.4, media anni di malattia= 9.1) e 30 caregiver. I dati preliminari hanno mostrato una notevole differenza nella percezione dei sintomi da parte dei pazienti e dei loro caregiver. Tra i sintomi che incidono negativamente sulla loro qualità della vita, i pazienti hanno messo al primo posto il freezing seguito da stati di off, da disturbi del linguaggio e dai movimenti involontari agli arti. I caregiver invece hanno messo al primo posto i movimenti involontari agli arti, e successivamente gli stati di off, il freezing e i movimenti involontari del tronco.

### *Utilizzo del dispositivo medico "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da paralisi sopranucleare progressiva*

Nella maggior parte dei pazienti affetti da malattia di Parkinson (PD) e/o Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP) si osserva un lento e inesorabile decadimento delle funzioni motorie dell'arto inferiore; pertanto la riabilitazione dell'arto inferiore e del cammino in generale, associata ad una terapia farmacologica è un obiettivo fondamentale, ma spesso insoddisfatto, del trattamento. Il recupero di funzione nelle malattie neurologiche si è dimostrato avvenire come ormai ampiamente dimostrato, grazie a fenomeni di plasticità neuronale che modificano la connettività e l'attività non solo delle aree interessate dalla patologia in oggetto, ma anche di aree poste a distanza da essa, quali ad esempio aree motorie. L'utilizzo di dispositivi elettromeccanici, in aggiunta alle convenzionali terapie farmacologiche, nell'ultimo anno sono risultate di estremo ausilio nel trattamento dei pazienti con PD.

GONDOLA® è un innovativo dispositivo di riabilitazione personale portatile che può consentire alle persone con Parkinson di recuperare parte delle capacità motorie e dell'autonomia in molte attività personali quotidiane, con conseguente miglioramento della qualità di vita. GONDOLA® è stato progettato per erogare individualmente la Foot Mechanical Stimulation (FMS), una terapia riabilitativa complementare rispetto alle cure farmacologiche. L'innovazione tecnologica di GONDOLA® si basa su stimolazioni del sistema nervoso periferico. Più precisamente, stimola specifiche aree dei piedi con impulsi meccanici controllati. I pazienti che rispondono positivamente alla Terapia FMS, erogata da GONDOLA®, possono acquisire maggiore sicurezza e maggiore velocità nella deambulazione e nel controllo del movimento e possono quindi riappropriarsi di parte della propria indipendenza e della capacità di relazione e di partecipazione alla vita sociale e lavorativa.

Gli specifici obiettivi di questo progetto sono stati:

- verificare l'effettiva efficacia del dispositivo Gondola nel ridurre il deficit motorio soprattutto negli arti inferiori;
- analizzare l'eventuale miglioramento attraverso analisi cinematiche e cinematiche;
- analizzare l'eventuale miglioramento in termini di riduzione dell'instabilità posturale e rischio di cadute;
- analizzare l'impatto sulla qualità della vita dei pazienti.

Rispetto al progetto originale si è deciso, in accordo con tutti gli sperimentatori, di intraprendere un'iniziale progetto pilota (studio randomizzato, controllato in singolo cieco, cross-over) per meglio delineare il tipo di popolazione sulla quale il dispositivo potesse essere efficace. Il campione è stato, quindi, ridotto a 20 pazienti affetti da

Malattia di Parkinson in fase avanzata di malattia con fluttuazioni motorie e 10 pazienti affetti da PSP. Il disegno dello studio è stato inoltre modificato: i pazienti sono stati randomizzati in 2 gruppi: terapia GONDOLA o SHAM GONDOLA. Alla fine del primo ciclo di 6 stimolazioni (GONDOLA o SHAM), il soggetto è stato sottoposto ad un periodo di washout di 3 settimane seguite da un secondo ciclo di trattamenti (SHAM o GONDOLA). Alla fine dello studio tutti i pazienti hanno eseguito entrambi i tipi di trattamento. Un campione dei due gruppi di pazienti è stato sottoposto ad una Gait Analysis all'inizio e alla fine di ogni ciclo di trattamento (GONDOLA O SHAM).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a:

- visita di screening per verificare l'eleggibilità allo studio;
- se eleggibile, randomizzazione computerizzata per l'assegnazione di ciascun paziente ad un braccio dello studio;
- valutazione pre-trattamento (base-line) (T0-T2) e post-trattamento alla fine delle 6 sedute (T1-T3), per ogni ciclo di stimolazione GONDOLA device or the SHAM GONDOLA. Viene inoltre effettuata una valutazione clinica di follow-up ad un mese (T4). Le valutazioni cliniche vengono effettuate da uno sperimentatore in cieco rispetto al trattamento effettuato dal paziente.
- somministrazione di analisi Video-optocinematica del cammino (GAIT ANALYSIS).

Somministrazione di scale specifiche:

- Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)
- Hoehn And Yahr (H&Y)
- Progressive Supranuclear Palsy Rating Scale and Staging
- Freezing of Gait Questionnaires
- Timed Up And Go Test
- The Six-Minute Walk Test
- Ten Meter Walk Test (Tmwt)
- Hamilton Rating Scale For Depression
- Non Motor Symptoms Scale
- Gait Analysis
- The Parkinson's Disease Questionnaire (Pdq-39) E Euroqol5d
- Montreal Cognitive Assessment (MoCA)

Nel protocollo sono stati arruolati 18 pazienti con malattia di Parkinson e 9 pazienti con Paralisi Soprannucleare Progressiva (PSP). Sono stati raccolti ed analizzati separatamente i dati dei due gruppi di pazienti studiati (MdP e PSP). Dei 18 pazienti con MdP, solo 12 hanno effettuato entrambi i cicli previsti di trattamento. Gli altri pazienti non hanno terminato lo studio per: ritiro del consenso (3 pazienti), mancanza di efficacia (2 pazienti). I risultati clinici ottenuti sono riportati nelle seguenti tabelle:

**Tabella 1: Dati su 12 pazienti che hanno effettuato entrambi i cicli di trattamento.**

SCALE	PRE-STIM MEDIA (SD)	POST-STIM MEDIA (SD)	PRE-SHAM MEDIA (SD)	POST-SHAM MEDIA (SD)	p PRE VS POST STIM*	p PRE VS POST SHAM*
UPDRS III	28.79 (9.43)	28.08 (11.38)	28 (10.6)	26.95 (10.66)	0,03945	0,12294
H&Y	2.79 (0.25)	2.58 (0.35)	2.62 (0.21)	2.56 (0.32)	0,01620	0,36322
PDQ-39	51 (29.27)	51.18 (30.44)	56.27 (34.89)	53 (31.69)	0,85658	0,14978
NMS	47.18 (32.55)	47.9 (35.56)	43.72 (33.28)	43.63 (32.88)	0,10538	0,94438
TEN MIN WLK TEST (m/sec)	1.09	1.09	0.91	1.0	0.62	0,22176
TUG (sec)	32.7	29.41	22.70	22.52	0,63782	0,90238

\* p significativa se  $\leq 0.05$



**Tabella 2: Dati sui 18 pazienti che hanno effettuato la stimolazione attiva**

SCALE	PRE-STIM MEDIA (SD)	POST-STIM MEDIA (SD)
UPDRS III	30.6 (8.7)	28.5 (10.51)
H&Y	2.82 (0.24)	2.7 (0.35)
PDQ-39	52.8 (29.74)	53.06 (30.24)
NMS	47.75 (32.89)	46.43 (34.21)
TEN MIN WLK TEST (m/sec)	1.02	1.04
TUG (sec)	32.26	33.25

**Tabella 3: Dati sui 13 pazienti che hanno effettuato il trattamento SHAM**

SCALE	PRE-SHAM MEDIA (SD)	POST-SHAM MEDIA (SD)
UPDRS III	28.0 (15.14)	27.03 (12.4)
H&Y	2.58 (0.28)	2.54 (0.33)
PDQ-39	57.5 (32.55)	55.8 (31.73)
NMS	42.66 (31.49)	42.83 (31.47)
TEN MIN WLK TEST (m/sec)	0.9	1.0
TUG (sec)	23.42	21.69

I dati raccolti ed elaborati hanno evidenziato un lieve miglioramento, statisticamente significativo dei valori UPDRS-III e H&Y. Il miglioramento di entrambi i valori è principalmente legato ad un miglioramento della stabilità posturale, verificatosi già dalla prima seduta di trattamento attivo e mantenutosi per tutta la durata del ciclo di trattamento. Non sono state evidenziate variazioni statisticamente significative nelle altre scale di valutazione effettuate.

Dei 9 pazienti con PSP, solo 7 hanno concluso almeno un ciclo di trattamento. Gli altri pazienti non hanno terminato lo studio per: ritiro del consenso (2 pazienti), stimolazione eccessivamente dolorosa (1 paziente), e per problematiche legate alla patologia di base (2 pazienti). Si riportano di seguito i dati clinici, divisi tra pazienti che hanno effettuato la stimolazione attiva e pazienti che hanno effettuato lo sham (alcuni di questi sono riusciti ad effettuare l'intero studio in cross-over).

**Tabella 4: Dati sui 7 pazienti che hanno effettuato la stimolazione attiva**

SCALE	PRE-STIM MEDIA (SD)	POST-STIM MEDIA (SD)	p PRE VS POST STIM*
SCALA PSP	42,1 (16.2)	39.6 (16.1)	0.12
PSP STAGING	3.43 (0.97)	3.43 (1.13)	1
PDQ-39	75 (17.4)	74.2 (18.9)	0.37
NMS	67 (34.2)	66 (34.8)	0.36
TEN MIN WLK TEST (m/sec)	0.71 (0.23)	0.65 (0.22)	0.03*
TUG (sec)	78.87 (130.6)	37.57 (38.64)	0.32

\* p significativa se  $\leq 0.05$

**Tabella 5: Dati sui 4 pazienti che hanno effettuato la stimolazione SHAM**

SCALE	PRE-SHAM MEDIA (SD)	POST-SHAM MEDIA (SD)	p PRE VS POST SHAM*
SCALA PSP	35.75 (11.53)	37 (11.34)	0.59
PSP STAGING	3 (1.15)	3 (1.15)	1
PDQ-39	61.67 (25.42)	71 (10.44)	0.41
NMS (3 PZ)	32.67 (12.5)	34.67 (18.34)	0.67
TUG (sec)	38.94 (24.86)	36.10 (24.84)	0.02*

\* p significativa se  $\leq 0.05$

Le tabelle 6 e 7 mostrano i risultati delle valutazioni con Gait Analysis effettuate su 5 pazienti in stimolazione attiva e 4 pazienti in stimolazione SHAM:

**Tabella 6: Dati relativi alla Gait Analysis di 5 pazienti nel gruppo stimolazione attiva**

	VELOCITA' (m/s)		STRIDE LENGTH (m)		CADENCE (step/min)		DOUBLE SUPPORT (%gc)	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
PZ 1	0.43	0.41	0.73	0.78	69.33	66.67	14.94	15.17
PZ 2	0.56	0.60	0.88	0.87	76.00	82.00	13.00	12.17
PZ 3	0.42	0.25	0.49	0.46	103.67	112.33	16.17	13.17
PZ 4	0.37	0.39	0.64	0.72	72.33	77.00	16.00	8.09
PZ 5	0.74	0.86	0.95	1.01	92.67	99.67	10.67	11.67
<b>MEDIA</b>	<b>0.51</b>	<b>0.50</b>	<b>0.74</b>	<b>0.77</b>	<b>82.80</b>	<b>87.53</b>	<b>14.16</b>	<b>12.05</b>
<b>ST.DEV.</b>	<b>0.15</b>	<b>0.24</b>	<b>0.18</b>	<b>0.20</b>	<b>14.75</b>	<b>18.30</b>	<b>2.32</b>	<b>2.59</b>
p-value	0.96		0.23		0.07		0.26	

**Tabella 7: Dati relativi alla Gait Analysis di 4 pazienti nel gruppo stimolazione SHAM**

SHAM PRE-POST 6FMS								
	VELOCITA' (m/s)		STRIDE LENGTH (m)		CADENCE (step/min)		DOUBLE SUPPORT (%gc)	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
PZ 1	0.57	0.59	0.71	0.73	96.33	95.50	13.17	12.25
PZ 2	0.38	0.47	0.60	0.77	71.00	72.33	15.83	14.83
PZ 3	0.36	0.43	0.63	0.67	67.33	75.33	14.83	12.00
PZ 4	0.52	0.63	0.75	0.84	82.00	87.33	12.17	11.17
<b>MEDIA</b>	<b>0.46</b>	<b>0.53</b>	<b>0.67</b>	<b>0.75</b>	<b>79.17</b>	<b>82.62</b>	<b>14.00</b>	<b>12.56</b>
<b>ST.DEV.</b>	<b>0.11</b>	<b>0.10</b>	<b>0.07</b>	<b>0.07</b>	<b>13.03</b>	<b>10.75</b>	<b>1.64</b>	<b>1.58</b>
p-value	0.04		0.10		0.18		0.05	

\* p significativa se  $\leq 0.05$

I risultati ottenuti sia dal punto di vista clinico che dal punto di vista dell'analisi computerizzata del cammino, non hanno mostrato variazioni statisticamente significative, pertanto si è deciso di non proseguire la sperimentazione in questo gruppo di pazienti data anche la gravità della malattia da cui risultano affetti.

Il protocollo è quindi stato modificato includendo solo pazienti con MdP avanzata e fluttuazioni motorie.

Inoltre, il disegno dello studio è stato modificato in un doppio cieco randomizzato per gruppi paralleli, a causa della difficoltà rilevata nel disegno cross-over a mantenere il cieco per il paziente rispetto al trattamento ricevuto in quanto le caratteristiche della stimolazione ("algica" e "non algica") erano differenti e tale differenza risultava percepibile ed individuabile dal paziente stesso.

Nel nuovo protocollo verranno inclusi 40 pazienti affetti da MdP con disturbi della deambulazione. I pazienti saranno randomizzati in due gruppi: il primo gruppo effettuerà il trattamento con GONDOLA. Alla fine di 8 stimolazioni (2 stimolazioni a settimana) e dopo 4 settimane di washout, il paziente effettuerà una visita di follow up. Il secondo gruppo invece effettuerà 8 stimolazioni con SHAM GONDOLA (stimolazione "placebo") e, analogamente, dopo 4 settimane di washout, effettuerà la visita di follow up.

Le valutazioni cliniche vengono eseguite all'inizio (T0), alla fine del ciclo di stimolazioni (T1) e dopo un follow up di 4 settimane (T2), da osservatori in cieco rispetto al trattamento effettuato. Lo studio computerizzato del cammino (GAIT) verrà effettuato, all'inizio e alla fine di ciascun ciclo di stimolazioni, in almeno il 50% dei pazienti con Malattia di Parkinson.

### Laboratorio di Neurobiologia Molecolare e Cellulare

#### *Ruolo dell'alterazione della funzionalità nucleolare nella patogenesi della malattia di Alzheimer*

La disfunzione del sistema proteolitico dei proteasomi è un processo cellulare legato all'invecchiamento ed è associato a diverse patologie neurodegenerative inclusa la malattia di Alzheimer (AD). Nell'AD, un ruolo determinante di questo processo sembra essere svolto dal peptide beta amiloide (A $\beta$ ), un importante fattore eziopatogenico di questa patologia. Lo stress nucleolare, un fenomeno cellulare caratterizzato dall'inibizione della trascrizione dell'rRNA e da una alterata integrità del nucleolo, sta emergendo come elemento importante del processo neurodegenerativo e studi recenti suggeriscono un legame funzionale tra il nucleolo ed il sistema dei proteasomi. In particolare, è stato dimostrato come il trattamento con inibitori specifici dei proteasomi è in grado di alterare la morfologia nucleolare ed inibire la sua funzionalità. D'altra parte l'inibizione dei proteasomi può attivare una risposta compensatoria allo stress proteotossico attivando la sintesi dell'rRNA ed inducendo nucleogenesi.

Al fine di determinare la correlazione tra disfunzione del sistema dei proteasomi indotta da A $\beta$  ed alterazione della funzionalità dei ribosomi, è stata trattata la linea neuronale PC12 con preparazioni di A 1-42 oligomerica (1-50  $\mu$ M, 4-72h) e la versione "scrambled" del peptide come controllo. Le cellule sono state quindi sottoposte ad estrazione proteica e saggio di attività enzimatica dei proteasomi (chimotripsinica- e tripsinica-simile). In parallelo, mediante immunofluorescenza indiretta, sono stati analizzati i livelli di trascrizione dell'rRNA utilizzando come sonda il precursore alogenato dell'rRNA (5-FU). I risultati hanno mostrato che l'A 1-42 oligomerica è in grado di inibire l'attività proteolitica dei proteasomi e che i livelli di inibizione sono associati ad un'alterazione della morfologia nucleolare così come ad un'inibizione dei livelli trascrizionali di rRNA. In queste condizioni sperimentali, l'alterazione della distribuzione subcellulare della proteina nucleolina, una proteina nucleolare importante negli step tardivi del processamento ribosomiale, così come dei suoi livelli proteici suggerisce inoltre come l'inibizione dei proteasomi mediata dall'A possa influenzare la biogenesi dei ribosomi. Utilizzando inibitori specifici dei proteasomi quali lactacystin (1-10  $\mu$ M, 1-16 h) e MG132 (25-50 $\mu$ M, 1-16 h) è stata confermata la relazione funzionale esistente tra sistema dei proteasomi e funzionalità ribosomiale. L'insieme di questi risultati supporta l'ipotesi che nella patogenesi dell'AD, l'accumulo di A possa essere uno dei fattori scatenanti l'alterazione del cross-talk tra sistema dei proteasomi e funzionalità nucleolare, contribuendo al processo di neurodegenerazione tipica di questa patologia. Più in generale, è possibile speculare come lo stress nucleolare indotto dalla generazione e l'accumulo di aggregati misfoldati legati ad altre patologie neurodegenerative quali l'huntingtin (nella malattia di Huntington) e l'-synuclein (nel Parkinson), possa svolgere un ruolo neurotossico importante in queste patologie.

#### *Caratterizzazione della proteina SIRT6 nel sistema nervoso centrale*

Diverse evidenze sperimentali hanno mostrato come SIRT6, una proteina appartenente alla classe III delle istoni deacetilasi, svolga un ruolo importante in numerosi processi quali il controllo del metabolismo del glucosio e dei lipidi, la regolazione dei geni coin-

volti nella risposta allo stress ed all'invecchiamento, la riparazione del DNA ed il cancro. Diversamente, la funzione di SIRT6 nel sistema nervoso centrale, così come un suo possibile ruolo nel processo di sopravvivenza neuronale, non sono ancora stati definiti. L'analisi biochimica di estratti totali cerebrali murini derivanti da tessuti embrionali e di adulto ha evidenziato come SIRT6 sia espressa ad alti livelli in questi tessuti, mentre l'analisi effettuata sulla corteccia e sullo striato di un modello murino di malattia di Huntington ha mostrato come i livelli proteici di SIRT6 siano minori rispetto a quelli dei corrispondenti topi di controllo. Inoltre, topi knock-out per il gene SIRT6, specificatamente a livello neurale, mostrano un ritardo nella crescita postnatale e presentano delle caratteristiche tipiche di un topo obeso.

In questo primo anno di progetto, al fine di contribuire alla caratterizzazione di SIRT6 nel sistema nervoso centrale, l'attenzione è stata focalizzata su:

- a) Caratterizzazione della distribuzione e della compartimentalizzazione subcellulare di SIRT6 nella corteccia e nell'ippocampo di topi adulti;
- b) Analisi dei livelli proteici di SIRT6 durante il processo di maturazione in vitro di neuroni primari corticali ed ippocampali.

L'analisi per immunofluorescenza su sezioni coronali di ippocampo e corteccia frontale murine ha mostrato come SIRT6 sia distribuito in maniera estesa ed omogenea in entrambe le regioni, con una colorazione particolarmente intensa a livello dello strato piramidale delle subregioni ippocampali CA e dello strato granulare cellulare del giro dentato. Le immagini evidenziano una localizzazione prevalentemente nucleare come già riportata in altri tessuti.

Per valutare la localizzazione subcellulare di SIRT6 è stato adottato un tipico metodo di frazionamento mediante centrifugazioni sequenziali seguito da Western Blot con anticorpi specifici. Come previsto SIRT6 è presente nei nuclei ma assente nel citosol ed a livello delle cosiddette membrane "leggere" (che includono il reticolo endoplasmatico, l'apparato di Golgi etc) sia nell'ippocampo che nella corteccia. La cosa interessante è la presenza di SIRT6 nella frazione delle membrane sinaptiche, che suggerisce un suo ruolo potenziale nelle funzioni sinaptiche. L'utilizzo di marcatori specifici delle frazioni subcellulari isolate ha confermato la specificità di questi risultati.

Le modificazioni epigenetiche, come ad esempio l'acetilazione degli istoni, costituiscono un meccanismo regolatorio importante per la maturazione dei neuroni postmitotici. Diversi studi hanno evidenziato come SIRT6 abbia attività deacetilasica specifica, suggerendo un suo ruolo potenziale nella maturazione dei neuroni postmitotici. Utilizzando le colture neuronali primarie, uno strumento utile ed efficace per studiare i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo neuronale e della maturazione, sono state valutate le variazioni dei livelli proteici di SIRT6 durante la maturazione in vitro di neuroni corticali ed ippocampali. L'analisi per Western blot su estratti proteici totali derivanti da neuroni ippocampali e corticali mantenuti in coltura per 1,4,7 e 11 giorni, ha mostrato come durante il processo di maturazione vi sia una riduzione consistente di SIRT6 che raggiunge i livelli massimi dopo 11 giorni di coltura. In particolare si osserva una riduzione pari al 76% del valore iniziale (giorno 1) nei neuroni corticali rispetto ad una diminuzione pari al 54% per i neuroni ippocampali. Risultati simili sono stati ottenuti mediante Real-time PCR su estratti di RNA, suggerendo una regolazione negativa di SIRT6 già a livello trascrizionale. L'aumento graduale dei livelli proteici del marcatore pre-sinaptico sinaptofisina e di quello post-sinaptico PSD95 confermano l'avvenuta maturazione in vitro dei neuroni in coltura.

Ci si attende di:

1. identificare gli effetti biologici associati alla sovraespressione di SIRT6 in neuroni

corticali e ippocampali, mediante generazione ed infezione con vettori ricombinanti adenovirali (rAAV).

2. determinare il ruolo di SIRT6 nella risposta ad uno stimolo di stress ossidativo.

### *Sviluppo di strategie immunoterapeutiche innovative specifiche per la malattia di Alzheimer utilizzando gli anticorpi intracellulari*

L'accumulo del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) sotto forma di strutture conformazionali quali protofibrille, fibrille ed oligomeri costituisce uno degli eventi chiave nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD). Strategie immunoterapeutiche mirate a diminuire l'accumulo di  $A\beta$  nel cervello così come a neutralizzare gli effetti neurotossici e sinaptotossici ad essa associati si sono dimostrate potenzialmente efficaci. Tra queste la tecnologia degli anticorpi intracellulari mostra diversi vantaggi: utilizza formati anticorpali che non inducono risposte immunologiche avverse, possono essere veicolati verso compartimenti intracellulari specifici, sono facili da manipolare e modificare etc.

Numerose evidenze sperimentali ottenute sia in vitro che in vivo hanno evidenziato un ruolo primario degli oligomeri dell' $A\beta$  1-42 nell'induzione dei fenomeni neurotossici e sinaptotossici tipici dell'AD. Al fine di sviluppare nuove strategie immunoterapeutiche specifiche per le forme oligomeriche del peptide  $A\beta$ , sono stati generati anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica (ScFv $A\beta$ 1-42) diretti verso quattro diversi compartimenti subcellulari: l'apparato secretorio, la membrana plasmatica, il compartimento pre-sinaptico e quello post-sinaptico.

Nel corso del 2013, per ottenere una caratterizzazione funzionale degli anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica, sono stati espressi tali anticorpi (unitamente ad un anticorpo non rilevante come controllo negativo) in linee neuronali geneticamente modificate ad esprimere elevati livelli di  $A\beta$  oligomerica. Utilizzando i lisati proteici di cellule esprimenti gli anticorpi Pre- e Post-Syn-ScFv $A\beta$ 1-42, ed i lisati e i soprannatanti di colture trasfettate con l'anticorpo Sec-ScFv $A\beta$ 1-42, mediante saggio ELISA si è osservato che questi ScFv possiedono una significativa attività di legame verso le forme oligomeriche del peptide  $A\beta$  1-42. Un risultato analogo è stato osservato mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione.

Per valutare le proprietà sinapto e neuroprotettive degli ScFv anti- $A\beta$  1-42 oligomerica, sono stati subclonati questi costrutti (unitamente ad un anticorpo non rilevante) in vettori ricombinanti adenovirali (rAAV) ed infettato colture murine primarie di neuroni corticali. Dopo circa 7-9 giorni di infezione, le colture infettate sono state trattate con preparazioni oligomeriche di  $A\beta$  1-42. Mediante saggi di MTT, LDH e TUNEL si è osservato come gli ScFv anti- $A\beta$  1-42 sono in grado di contrastare gli effetti neurotossici mediati dalle preparazioni di  $A\beta$  1-42 oligomerica. Inoltre, utilizzando marcatori specifici pre e post-sinaptici mediante analisi per immunofluorescenza e Western blot, si è rilevato che questi anticorpi intracellulari possiedono una buona capacità sinaptoprotettiva. Ci si attende di poter effettuare una determinazione in vivo degli effetti sinapto e neuroprotettivi degli anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica utilizzando il modello murino AD 5XFAD.

### *Ruolo della DNA-PK nella risposta allo stress ossidativo*

Uno sbilanciamento tra fattori cellulari pro-ossidanti ed anti-ossidanti può indurre una produzione eccessiva di ROS che, eccedendo la capacità anti-ossidante cellulare, causa quello che normalmente viene definito stress ossidativo. Lo stress ossidativo è un fat-

tore importante nel processo di invecchiamento così come nella neurodegenerazione associata a diverse malattie neurodegenerative inclusa la malattia di Alzheimer. Tra i diversi danni associati allo stress ossidativo, le rotture a doppio filamento del DNA (DSBs) rappresentano uno dei fattori più pericolosi che, se non opportunamente riparati, possono indurre morte cellulare. La proteina chinasi DNA-PK svolge un ruolo essenziale nella riparazione dei DSBs e alcune evidenze sperimentali hanno evidenziato un suo coinvolgimento nella risposta allo stress ossidativo.

In questo secondo anno di progetto è stata valutata la funzione della DNA-PK nella risposta allo stress ossidativo mediata dall'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e l'eventuale correlazione con la sua attività di riparazione dei DSBs. A tal fine sono state utilizzate come modello cellulare le PC12 e sono state trattate con un range di concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pari a 0.1-1 mM per 30 minuti per identificare la concentrazione necessaria ad indurre la risposta massima di DSBs. L'analisi mediante immunofluorescenza del numero di foci di  $\gamma$ H2AX (un indicatore specifico di DSBs) ha evidenziato come il trattamento con 300  $\mu$ M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è in grado di indurre i livelli massimi di DSBs, ed è stata quindi usata nei successivi esperimenti. Incubando le cellule PC12 con un inibitore specifico dell'attività catalitica della DNA-PK (NU7026, 10 $\mu$ M) 24 ore prima e dopo il trattamento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (300  $\mu$ M, 30 minuti), ed analizzando le cellule apoptotiche mediante colorazione con Hoechst 33342, si è osservato come l'inibizione dell'attività della DNA-PK induca un aumento significativo del numero di cellule apoptotiche. Questo aumento di morte cellulare non sembra associato ad una mancata riparazione dei DSBs. Infatti, la percentuale di cellule  $\beta$ H2AX positive è essenzialmente lo stesso nelle cellule trattate con NU7026 rispetto a quelle non trattate (DMSO). Questi risultati suggeriscono che in presenza di stress ossidativo mediato da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> la DNA-PK esercita un ruolo protettivo che non appare correlato alla sua attività di riparazione dei DSBs.

Ci si aspetta di poter identificare il "pathway" di sopravvivenza mediati dalla DNA-PK in risposta allo stress ossidativo.

## **Laboratorio di Elettrofisiologia**

*Studio degli effetti degli endocannabinoidi sulla risposta colinergica in muscoli umani da pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica*

La sclerosi laterale amiotrofica (SLA) è una patologia degenerativa del sistema nervoso ad esito fatale dovuta ad una progressiva degenerazione dei motoneuroni centrali e periferici. E' opinione comune, tuttavia, che diversi meccanismi siano la causa della malattia, in quanto dati recenti supportano l'idea che anche il muscolo partecipi alla patologia. Recentemente è stata applicata la tecnica del microtrapianto di membrane (Miledi et al., 2006) per studiare la funzionalità dei recettori muscolari dell'acetilcolina (ACh) dei pazienti con SLA. Questo approccio ha permesso di avere a disposizione piccoli frammenti da biopsie muscolari minimizzando il trauma per i pazienti. Recentemente, è stato osservato che molti pazienti traggono beneficio in seguito al trattamento con l'N-Palmitoyletanolamide (PEA). Il PEA è un mediatore lipidico appartenente alla famiglia degli endocannabinoidi (ECs). Il sistema ECs è stato definito come un complesso di neurotrasmettitori in grado di regolare l'eccitabilità neuronale, e svolge un ruolo centrale in numerose condizioni fisiopatologiche. Considerando che i recettori per l'ACh mediano la comunicazione nervo-muscolo e che i pazienti SLA sono cronicamente esposti a questo farmaco, diventa di fondamentale importanza studiare la modalità di

azione del PEA sui recettori dell'ACh. In questo progetto ci si propone di verificare se le risposte colinergiche, ottenute dall'applicazione di neurotrasmettitore su preparazioni di tessuto umano affetto da SLA e di tessuto di controllo ottenuto da pazienti denervati in seguito a trauma, siano modificate dal PEA.

I tessuti di pazienti affetti da SLA e di controllo ottenuti da pazienti denervati in seguito a trauma sono stati forniti dal Centro SLA del Policlinico Umberto I di Roma. L'ago-biopsia è stata effettuata dai muscoli bicipite e deltoide come descritto precedentemente (Palma et al., 2011).

I metodi utilizzati sono stati i seguenti:

- Preparazione di membrane: le membrane sono state preparate come descritto precedentemente (Miledi et al., 2002).
- Iniezione negli ovociti: le cellule sono state iniettate nel citoplasma come precedentemente descritto (Miledi et al., 2002) con circa 50-100 nl di glicina 5 mM (10-12 mg proteina/ml) e mantenute a 16°C fino alle registrazioni elettrofisiologiche.
- Registrazioni voltage-clamp: dopo 24 ore dall'iniezione citoplasmatica di membrane sono state registrate negli ovociti le correnti totali dell'ACh con la tecnica del voltage-clamp intracellulare con due elettrodi (3 M KCl, Miledi 1982) come descritto precedentemente (Palma et al., 2011). Gli esperimenti di ampiezza, decadimento, le relazioni dose-risposta per l'ACh e gli esperimenti di rundown sono stati effettuati come precedentemente descritto (Palma et al., PNAS 2011).

È stato dimostrato che il PEA agisce sulla corrente colinergica dei pazienti SLA rendendo più stabile il recettore. Infatti, ripetute perfusioni di alte concentrazioni di ACh inducono una fisiologica desensibilizzazione della risposta registrata come una corrente colinergica inward. La preincubazione delle cellule con PEA migliora, in modo statisticamente rilevante, la risposta colinergica inducendo una forte riduzione della desensibilizzazione. Inoltre, la forma delle correnti evocate dall'ACh, viene sostanzialmente modificata dalla pre-applicazione di PEA. Ora ci si sta preparando a somministrare clinicamente la sostanza nei pazienti SLA, dopo loro consenso informato. Ci si aspetta un netto miglioramento delle performance muscolari dei pazienti. I dati ottenuti indicano, in linea con altri lavori, che il muscolo può contribuire alla patogenesi della malattia, e come tale può essere un target terapeutico.

#### *Studio del ruolo della chemochina CX3CL1 nelle epilessie umane del lobo temporale farmaco-resistente*

Numerosi studi supportano l'ipotesi che i processi infiammatori ricoprano uno dei ruoli fondamentali nella patofisiologia delle epilessie lobo temporali farmaco-resistenti (TLE). È infatti descritto in pazienti epilettici, così come in modelli animali, che processi infiammatori, tra cui attivazione di microglia e sintesi e rilascio di citochine e chemochine infiammatorie, siano coinvolti nell'insorgenza e propagazione dell'ipereccitabilità neuronale. Recentemente, si ritiene che la chemochina CX3CL1 e il suo recettore CX3CR1 abbiano un ruolo chiave nella modulazione della trasmissione eccitatoria e nelle patologie del sistema nervoso a carattere infiammatorio. Infatti, è stato dimostrato che la CX3CL1 riduce le correnti eccitatorie AMPA-mediate mentre aumenta l'attività GABAergica postsinaptica nei neuroni serotonergici del nucleo del rafe. (Ragozzino et al., 2006; Limatola et al., 2005; Heinisch and Kirby, 2009). Sebbene ci siano in letteratura dati sull'aumento di CX3CL1 nella corteccia temporale e nel fluido cerebrospinale di pazienti con epilessia farmaco-resistente, ad oggi non ci sono evidenze riguardo ai livelli di espressione e funzionamento del suo recettore in tessuti TLE. È stato recentemente



mostrato che i recettori GABA-A nel cervello epilettico, quando ripetutamente attivati dal GABA mostrano una marcata desensibilizzazione che è stata chiamata rundown. Sulla base di queste evidenze, l'obiettivo principale del progetto è stato indagare se la chemochina CX3CL1 potesse modulare la trasmissione GABAergica in pazienti con epilessia del lobo temporale farmaco resistenti e confrontare eventuali risultati con tessuti di controllo da autopsie, attraverso la tecnica del microtrapianto di membrane cerebrali umane in oociti di *Xenopus* e l'uso di fettine cerebrali da pazienti trattati chirurgicamente. In particolare ci si è focalizzati sull'effetto di CX3CL1 sulle correnti inibitorie GABAergiche e sull'eventuale effetto modulatore sul rundown del GABA. Inoltre, attraverso tecniche di co-localizzazione immunostochimica si è voluto vedere se l'espressione del recettore della chemochina CX3CR1, presente sulla microglia, durante l'epilettogenesi fosse alterato in seguito all'attivazione della risposta immunitaria.

I tessuti di pazienti affetti da TLE e FCD oltre ai tessuti di controllo sono stati forniti dal Dipartimento di Neuropatologia dell'Università di Amsterdam. L'uso di questi tessuti è stato autorizzato, oltre che dalle Commissioni Etiche olandesi e dalla Commissione Etica dell'Università Sapienza di Roma.

Le membrane sono state preparate come descritto precedentemente (Miledi et al., 2002).

- Animali: Rane femmine *Xenopus Laevis* sono state acquistate dal Centre d'Elevage de Xenopes CNRS-CRBM (Montpellier Cedex Francia) e stabularizzate presso il Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia dell'Università di Roma.
- Iniezione negli oociti: Le cellule sono state iniettate nel citoplasma come precedentemente descritto (Miledi et al., 2002) con circa 50-100 nl di glicina 5 mM (10-12 mg proteina/ml) e mantenute a 16°C fino alle registrazioni elettrofisiologiche.
- Registrazioni in voltage-clamp: Dopo 12 ore dall'iniezione citoplasmatica di membrane sono state registrate negli oociti le correnti totali con la tecnica del voltage-clamp intracellulare con due elettrodi (3 M KCl, Miledi 1982). Le correnti GABA sono state registrate dagli oociti come descritto precedentemente (Palma et al., 2002). Gli esperimenti di ampiezza, decadimento e rundown sono stati effettuati come precedentemente descritto (Palma et al., 2002).

Questo progetto ha permesso di studiare gli effetti della chemochina CX3CL1 sulle correnti GABAergiche in tessuti di pazienti con epilessia del lobo temporale farmaco-resistente e confrontarli con tessuti di altra natura come le displasie focali pediatriche ed adulte o di controllo da autopsie. Attraverso la tecnica del microtrapianto di membrane in oociti di *Xenopus* e l'uso di fettine cerebrali da pazienti con epilessia farmaco-resistente trattati chirurgicamente, è stata riscontrata una riduzione dell'ampiezza di corrente e una maggiore efficienza della funzionalità del recettore GABA dopo incubazione con CX3CL1. Di particolare interesse è risultato il fatto che l'effetto fosse peculiare del tessuto epilettico e assente nelle displasie e nei tessuti di controllo. Inoltre, andando ad analizzare i tessuti attraverso tecniche di co-localizzazione immunostochimica, è stato visto che proprio nei tessuti dove si verifica l'effetto di CX3CL1 vi è un'aumentata espressione del suo recettore CX3CR1 sulla microglia dovuto all'attivazione del sistema immunitario. L'effetto modulatore sulle correnti del GABA e l'aumentata espressione del recettore sulla microglia attivata suggeriscono pertanto nuovi approcci terapeutici per le epilessie farmaco-resistenti sulla base di numerose evidenze che la propagazione degli attacchi epilettici possa essere influenzata da processi infiammatori.

## Laboratorio di Biochimica dell' Invecchiamento

### *Studio dei meccanismi fisiopatologici della malattia di Parkinson*

Il coinvolgimento dello stress ossidativo ed energetico nella patogenesi della neurodegenerazione ha posto le basi per la ricerca di approcci terapeutici e preventivi capaci di rallentare il processo degenerativo attraverso il mantenimento della bioenergetica neuronale e dello stato redox cellulare. In particolare, la mancata up-regolazione della risposta adattativa a condizioni di stress (biogenesi mitocondriale, autofagia, induzione di enzimi antiossidanti) sembra essere l'elemento chiave scatenante il processo di neurodegenerazione. In questo contesto, i sensori precoci dello stress ossidativo/energetico possono rappresentare il target specifico di nuovi approcci farmacologici o nutrizionali per contrastare le neurodegenerazioni.

La capacità di regolare l'omeostasi redox a livello cellulare diminuisce con l'età come evidenziato dal calo del glutatione (GSH), il più importante fattore antiossidante non proteico, in diversi tessuti ed organi. Di conseguenza, l'aumento dello stress ossidativo è un importante fattore che contribuisce all'eziologia di diverse malattie neurodegenerative età-correlate come la malattia di Parkinson. Il coinvolgimento dello stress ossidativo nella neurodegenerazione è stato confermato dall'accumulo di danno ossidativo alle macromolecole e alle strutture cellulari in modelli sperimentali e in cervelli post mortem. Uno dei principali determinanti della degenerazione ossidativa neuronale è l'alterazione della bioenergetica, dovuta ad esempio all'inibizione del complesso I, come riscontrato nella malattia di Parkinson, che porta alla perdita della funzionalità mitocondriale. Inoltre, l'alterazione dell'autofagia sembra essere responsabile di ulteriore danno dovuto all'accumulo di organelli danneggiati e di aggregati proteici ossidati e alla ridotta capacità di sintetizzare ATP. L'alterazione del metabolismo del glucosio sembra essere l'evento che precede la comparsa del deficit cognitivo in molti modelli sperimentali di neurodegenerazione. Dati recenti dimostrano che la ridotta disponibilità di glucosio può spostare l'ambiente redox intracellulare verso condizioni più ossidanti, attraverso la preferenziale utilizzazione del glucosio-6-fosfato nella glicolisi che porta a inibizione della via dei pentosi fosfato e conseguente ridotta sintesi di nicotinamide adenina dinucleotide fosfato (NADPH). È stato, infine, dimostrato un ruolo chiave di p53 nella regolazione dell'espressione di geni antiossidanti e correlati al metabolismo cellulare (geni glicolitici, geni mitocondriali) e geni autofagici in risposta a stress ossidativo e metabolico. Il co-attivatore trascrizionale PGC-1alpha è anch'esso coinvolto nella risposta a stress metabolici (carenza di nutrienti) e ossidativi (decremento dei livelli di GSH) ed è regolato da pathways di trasduzione del segnale redox-mediati che spesso si sovrappongono a quelli che determinano l'attivazione di p53 (es. NO/cGMP). A riprova di ciò è stato dimostrato uno stretto cross-talk tra p53 e PGC-1alpha nel determinare la risposta adattativa cellulare a condizioni di stress, o nell'indurre il fenomeno autofagico o apoptotico.

Gli obiettivi specifici della ricerca sono stati:

1. Identificare i residui di cisteina di p53 coinvolti nel processo di S-nitrosilazione e nell'attivazione di PGC-1alpha. In particolare, sono state identificate le cisteine reattive responsabili del legame al DNA che conferiscono una maggiore attività trascrizionale sul promotore di PGC-1alpha.
2. Caratterizzare il ruolo di p53 nei processi redox di induzione dell'autofagia e della biogenesi mitocondriale. È stato dimostrato che l'induzione di PGC-1alpha mediata da p53 culmina esclusivamente nell'induzione di geni antiossidanti e non in un

processo autofagico o di induzione della proliferazione mitocondriale. Al contrario, l'induzione della biogenesi mitocondriale dipende da un processo di S-nitrosilazione e attivazione del fattore CREB sul promotore di PGC-1alpha.

3. Caratterizzare il ruolo delle MAP kinasi nella regolazione del processo autofagico. In particolare è stato dimostrato un ruolo modulatore del rate autofagico da parte di p38 che si attiva in seguito a carenza di nutrienti per evitare flussi autofagici elevati che potrebbero portare a morte cellulare.

Per studiare e caratterizzare le differenze nella suscettibilità all'apoptosi e nei meccanismi di adattamento (autofagia, biogenesi mitocondriale, induzione di antiossidanti) sono state utilizzate diverse tecniche di biochimica e biologia molecolare atte a mettere in evidenza l'attività, l'espressione e il contenuto di RNA di proteine marker di tali condizioni. Per modulare la biodisponibilità di ossido nitrico (NO) sono stati utilizzati inibitori chimici delle NO sintasi o flussi di NO (donatori chimici). Il ruolo delle cisteine reattive di p53 nella reazione di binding al DNA è stato valutato trasferendo cellule prive di p53 (H1299) con i plasmidi contenenti i mutanti di cisteina di p53. Per mimare il regime di restrizione calorica, è stata effettuata una deprivazione di nutrienti (starvation) coltivando le cellule anziché in un terreno standard in un mezzo contenente basso contenuto di glucosio e in assenza di siero. Sulle cellule così trattate è stato caratterizzato: I) lo stato redox intracellulare analizzando: il contenuto delle forme ridotte ed ossidate del GSH, nonché la quota di GSH legato a proteine, mediante HPLC; l'espressione di enzimi antiossidanti (superossido dismutasi, glutatione perossidasi, catalasi, tioredossina reductasi) mediante RT-qPCR e Western blot. Inoltre è stata misurata la produzione di ROS mediante l'uso di sonde fluorescenti specifiche per il superossido (DHE) e l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DHDCF-DA), nonché i livelli di proteine carbonilate e le rotture alla doppia elica di DNA mediante Western blotting e immunofluorescenza dell'istone H2A.X. I livelli di NO sono stati valutati direttamente mediante l'uso di sonde fluorescenti specifiche (DAF-2) e indirettamente attraverso valutazione di proteine S-nitrosilate (metodi immunochimici o biotin-switch assay); II) il processo di autofagia attraverso l'analisi delle isoforme LC3-I e LC3-II della proteina LC3 associata agli autofagolisosomi. Inoltre le cellule sono state trasferite con un plasmide esprimente LC3 associato alla GFP (LC3-EGFP) per effettuare analisi in microscopia a fluorescenza di co-localizzazione tra LC3 e lisosomi mediante marcatura con LisoTracker Red. L'autofagia è stata valutata anche mediante l'analisi morfologica, in citofluorimetria, previa valutazione del pH intracellulare con arancio di acridina. La mitofagia è stata studiata analizzando il reclutamento di Parkin sui mitocondri (analisi confocale o Western blot su proteine mitocondriali purificate); III) la biogenesi mitocondriale attraverso analisi: del contenuto di mtDNA (qPCR); dei marcatori canonici (es. TFAM, PGC-1alpha, NRF-1) mediante Western blot e RT-qPCR; della massa mitocondriale mediante sonde fluorescenti; IV) le vie di segnalazione redox-sensibili attraverso analisi dell'espressione e dell'attività delle MAPK (analisi Western blot delle forme fosfo-attive), di Nrf2 e p53 (Western blot e RT-qPCR). L'analisi dell'attività di tali fattori di trascrizione è stata seguita mediante saggi ChIP. Recentemente è stato dimostrato che in seguito alla deplezione di glutathione (GSH) si realizza un incremento dei livelli fisiologici di ossido nitrico (NO) e un conseguente aumento della nitrosilazione delle proteine. Questo evento è responsabile dell'attivazione del fattore trascrizionale p53, il quale è in grado di legare il promotore del gene PGC-1alpha (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha), determinando così un aumento dei suoi livelli trascrizionali. Sebbene PGC-1alpha giochi un ruolo fondamentale nell'induzione della biogenesi mitocondriale, la

sua up-regolazione culmina esclusivamente nell'attivazione della risposta antiossidante mitocondriale (aumento dei livelli di espressione della MnSOD) attraverso l'attività del fattore di trascrizione NFE2L2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2). Questi risultati suggeriscono che l'up-regolazione di PGC-1alpha, mediata da p53, potrebbe rappresentare una risposta adattativa per limitare il danno ossidativo indotto dalla deplezione di GSH. E' stato poi dimostrato che l'attività di legame di p53 sul promotore di PGC-1alpha è incrementata a seguito di un processo di S-nitrosilazione su tre residui di cisteina (Cys176, Cys238, Cys242) presenti nel dominio di legame al DNA.

E' stato in seguito dimostrato che l'aumentata produzione di NO, dovuta ad un incremento dei livelli dell'enzima responsabile della sua sintesi (nNOS), porta all'induzione di PGC-1alpha. Al contrario di quanto osservato dopo la deplezione di GSH, tale induzione determina un aumento della proliferazione mitocondriale. In particolare, si è dimostrato che l'nNOS è in grado di legarsi sulla membrana nucleare e attivare, attraverso un processo di S-nitrosilazione, l'attività trascrizionale di CREB su geni mitocondriali. Al contrario, in queste condizioni non si osserva una attivazione dell'asse p53/PGC-1alpha e l'espressione dei geni antiossidanti a valle.

Per quanto riguarda i processi che regolano l'autofagia è stato dimostrato che lo stato redox gioca un ruolo predominante nella regolazione di tale processo. In particolare, è stato dimostrato un duplice ruolo di p38 nel modulare il metabolismo del glucosio, in condizioni di privazione di nutrienti, che sfocia in una diminuzione di ROS e del processo autofagico. Si è infatti osservato che l'attivazione di p38 porta all'aumento della localizzazione in membrana del trasportatore del glucosio (GLUT3) e allo stesso tempo all'indirizzamento del glucosio nella via dei pentosi fosfato, con aumento della concentrazione di NADPH. Questa riprogrammazione metabolica dettata da p38 porta ad un ridotto rate autofagico e ad una aumentata resistenza alla privazione di nutrienti.

## **Laboratorio di Patologie cronico-degenerative**

*Ruolo dell'aging nella determinazione di effetti neurodegenerativi in seguito ad infezioni ricorrenti da virus influenzale: studio dei marker molecolari tipici della malattia di Parkinson in cellule neuronali infettate*

La malattia di Parkinson è una malattia neurodegenerativa progressiva legata all'età, caratterizzata dalla perdita di cellule neuronali nella substantia nigra pars compacta (SNpc) ed associata alla presenza di inclusioni (corpi di Lewy) formate principalmente da aggregati di  $\alpha$ -sinucleina. Malgrado siano stati dimostrati i meccanismi molecolari che determinano la formazione di questi aggregati e la perdita delle cellule neuronali, l'agente scatenante questi eventi rimane sconosciuto. Negli ultimi anni, il virus influenzale è stato descritto come potenziale candidato nel determinare la malattia di Parkinson.

I primi casi che documentano complicazioni neurologiche con sintomi tipici della malattia di Parkinson risalgono ai casi di influenza letargica (malattia di von Economo, dal nome del medico che ha documentato i casi per la prima volta) riscontrata nel 1918 durante la pandemia di influenza spagnola. Per anni è stato ampiamente dibattuto il ruolo del virus influenzale nel determinare la malattia di Parkinson, in quanto il virus influenzale provoca un'infezione di tipo acuto tale per cui il genoma virale non è mai stato rilevato in campioni autoptici di cervello di pazienti morti di Parkinson. Nonostante pochi studi epidemiologici (Harris et al, 2012; Toovey et al. 2011) supportino l'associazione tra influenza e Parkinson, recenti evidenze sono a favore di questa teoria:

- Jang et al. (2009) hanno dimostrato che il virus influenzale H5N1 (ceppo aviario) può entrare nel SNC e indurre l'attivazione della microglia, la fosforilazione e la formazione di aggregati di  $\alpha$ -sinucleina, piccola proteina (140 aminoacidi) localizzata a livello degli assoni terminali nei neuroni, in topi infettati per via intranasale;
- Rhon e Catlin (2011), hanno rilevato il virus influenzale nella SNpc in sezioni di cervello postmortem prelevati da pazienti affetti da Parkinson, suggerendo un suo ruolo nel contribuire alla neuroinfiammazione associata alla malattia.

Una caratteristica comune tra la malattia di Parkinson e l'influenza è il cambiamento dello stato redox intracellulare verso uno stato pro-ossidante che si riscontra durante le due malattie. Infatti, il gruppo di ricerca ha dimostrato che il virus influenzale causa una deplezione dei livelli di glutatione (GSH), principale antiossidante intracellulare, e un aumento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) al fine di promuovere la propria replicazione (Sgarbanti et al., 2011). Tale stato pro-ossidato può determinare anche l'attivazione di pathway redox-sensibili coinvolti nel processo infiammatorio e apoptotico (Nencioni et al., 2009). Anche il sistema immunitario adattativo e la neuroinfiammazione possono giocare un ruolo nella patogenesi della malattia del Parkinson, ma come questi processi siano correlati e modulano l'accumulo dell' $\alpha$ -sinucleina e l'attivazione della microglia è tuttora sconosciuto. In pazienti affetti dalla malattia sono stati comunque riscontrati infiltrati di linfociti CD4/CD8 nel sistema nervoso, aumentati livelli di TNF, IL-1 e interferon  $\gamma$  e un'alterazione del pool periferico di linfociti T.

L'ipotesi che si intende verificare, quindi, è che il virus influenzale possa peggiorare lo stress ossidativo osservato nelle cellule neuronali invecchiate portando ad un'aumentata produzione e ad un accumulo di proteine non correttamente foldate e all'attivazione di processi apoptotici contribuendo alla patogenesi della malattia di Parkinson.

L'obiettivo principale di questo progetto è stato quello di chiarire i meccanismi molecolari attraverso i quali il virus influenzale induce l'attivazione di pathway neurodegenerativi, caratteristici della malattia di Parkinson.

La ricerca svolta nel secondo anno ha perseguito i seguenti obiettivi: a) verificare la diversa suscettibilità all'infezione da virus influenzale in topi invecchiati rispetto a topi giovani in correlazione con lo stato redox fisiologico e lo stato immunologico; b) verificare il ruolo della risposta infiammatoria indotta dal virus nel causare il danno neuronale.

Materiali/pazienti e metodi:

- Allestimento dell'infezione da virus influenzale in topi giovani e invecchiati. Per il modello sperimentale sono stati utilizzati topi femmine BALB/c di 6/8 settimane di peso medio 20 grammi e topi femmine invecchiati di 13 mesi del peso medio di 30 grammi. Gli animali sono stati anestetizzati con avertina e infettati per via intranasale con 0.5 unità formante placca (PFU) di virus influenzale A PR8/H1N1 diluito in 50  $\mu$ l PBS. Durante lo studio gli animali sono stati monitorati giornalmente per 20 giorni e sono state valutate la sopravvivenza e i segni clinici quali peso corporeo, attività motoria e temperatura corporea.
- Dosaggio del contenuto di glutatione e glutatione ossidato. Gli organi prelevati sono stati pesati e omogeneizzati in MES buffer. Dopo centrifugazione, i supernatanti sono deproteinati ed i livelli di GSH e GSSG sono quantificati mediante saggio enzimatico.
- Real Time PCR

L'RNA virale è stato estratto dai polmoni omogeneizzati mediante TRIreagent (SigmaAldrich, S. Louis, MO). Gli esperimenti e le analisi dei dati sono stati effettuati utilizzando il IQ5 Multicolor Real-Time Detection System (Bio-Rad).

Sulla base dei risultati ottenuti nel primo anno della ricerca che suggerivano che in

cellule sperimentalmente invecchiate l'accumulo dell'alfa-sinucleina, marker di pathway neurodegenerativi, è associata a ripetute infezioni da virus influenzale, il secondo anno della ricerca è stato dedicato all'allestimento dell'infezione da virus influenzale in topi invecchiati dell'età di 13 mesi e alla verifica della suscettibilità di topi anziani all'infezione da virus influenzale in correlazione allo stato redox fisiologico e allo stato immunologico. Per tali studi sono stati acquistati topi Balb/c anziani dell'età di 11 mesi e sono stati mantenuti nello stabulario per ulteriori due mesi. La prima fase della ricerca è stata dedicata all'allestimento del modello sperimentale di infezione da virus influenzale nei topi anziani al fine di individuare la dose di virus influenzale in grado di mimare un'influenza stagionale. A tal fine dieci topi anziani maschi e femmine sono stati suddivisi in due gruppi (n=5) e infettati con diverse concentrazioni di virus influenzale di tipo A, ceppo umano PR8/H1N1, 0.5 e 1 pfu/topo. Durante lo studio gli animali sono stati monitorati giornalmente fino al termine dell'esperimento (20 giorni) e sono state valutate la sopravvivenza e i segni clinici dell'infezione quali il peso corporeo, l'attività motoria e la temperatura corporea. I risultati ottenuti hanno permesso di individuare la dose di 0.5 pfu/topo di virus influenzale in grado di mimare un'influenza stagionale.

Quindi, nella seconda fase, topi anziani e giovani (n=30 per ogni gruppo) sono stati infettati per via intranasale con 0.5 pfu/topo di virus influenzale di tipo A, PR8/H1N1, e durante lo studio gli animali sono stati monitorati giornalmente come descritto precedentemente. Inoltre, a diversi giorni dall'infezione (8°, 15°) sono stati prelevati campioni di sangue al fine di valutare i parametri ematologici nel sangue intero, le immunoglobuline IgG, IgG1 (Th2) e IgG2a (Th1) e citochine Th1/Th2 nel plasma. Alcuni topi invecchiati e giovani sono stati sacrificati agli stessi giorni dopo l'infezione per il prelievo dei seguenti organi: cervello, polmoni, milza, pancreas e linfonodi per verificare il contenuto tiolico, i livelli di glutatione ossidato e il titolo virale mediante RT-PCR. I risultati ottenuti dimostrano che i topi giovani sono più suscettibili all'infezione rispetto ai topi anziani, in quanto è stata riscontrata una mortalità del 28%. Malgrado non si è osservata mortalità nei topi anziani, l'infezione provocava una diminuzione del peso e della temperatura corporea associata alla carica virale nei polmoni che era massima al picco dell'infezione (3° giorno) e diminuiva nei giorni successivi (8° e 15° giorno). L'analisi del contenuto del glutatione ossidato non ha rilevato nessuna differenza significativa tra i topi giovani e anziani di controllo e infettati. Tuttavia, i topi anziani non infettati presentavano un minor contenuto tiolico negli organi prelevati, ad eccezione del cervello, e una minor conta di globuli bianchi rispetto ai topi giovani. L'infezione determinava, nei topi giovani, una riduzione dei globuli bianchi osservata all'ottavo giorno dopo l'infezione, probabilmente dovuto al reclutamento di questi nel polmone. Al contrario, nei topi invecchiati infettati, tale fenomeno era osservabile a tempi tardivi dall'infezione (15° giorno), dopo la risoluzione della malattia, probabilmente dovuto al loro stato immunologico basale alterato che potrebbe rallentare la capacità cellulare di rispondere alle infezioni contribuendo a causare danni cronici che finora sono stati sottostimati. La misurazione del contenuto tiolico, delle citochine infiammatorie e la presenza del virus influenzale negli altri organi dei topi giovani e anziani infettati è in corso.

## Laboratorio di Patologia molecolare e cellulare

### *Studio dei meccanismi di riparo cellulare in cellule postmitotiche: ruolo delle proteine CRP e delle sirtuine*

Le sirtuine sono una classe di acetilasi coinvolta nella risposta a diversi tipi di stress, associata all'allungamento della vita e soprattutto al miglioramento della qualità di quest'ultima. Il ruolo delle sirtuine nella sopravvivenza cellulare dei tessuti neuronali e muscolari è ormai assodato, ma è necessario approfondire lo studio dei meccanismi che regolano la funzione delle sirtuine nella risposta allo stress nel tessuto neuronale e muscolare.

Le sirtuine (SIRT) sono una famiglia di deacilasi coinvolte in molteplici processi cellulari. Nei mammiferi esistono sette sirtuine che, attraverso la loro localizzazione e attività, regolano molti aspetti del metabolismo energetico e modulano la trascrivibilità della cromatina.

Le Cysteine-rich proteins (CRP1, CRP2, CRP3/MLP and TLP) sono caratterizzate da due domini LIM che mediano le interazioni specifiche tra proteine.

Esse hanno importante ruolo nell'organizzazione del citoscheletro, nella miogenesi e nella trasduzione del segnale generato da meccanicettori. CRP1 e 2 sono espresse per lo più nella muscolatura liscia e scheletrica, MLP è espresso per lo più nel muscolo cardiaco e scheletrico.

Il presente studio si propone di:

- Indagare il ruolo delle sirtuine e delle CRP nei meccanismi di morte e di riparo cellulare.
- Studiare l'impatto sulla morte cellulare e sul riparo molecolare nei miociti e nei cardiomiociti delle CRP valutando la risposta al danno della cellula indotto da infarto (MI). In particolare, valutare se l'infarto miocardico regola l'espressione delle CRP e le sirtuine e la loro interazione.
- Studiare il ruolo delle sirtuine nel mediare gli effetti benefici dell'esercizio fisico. In particolare, studiare l'espressione e la regolazione delle sirtuine in tessuti neuronali, muscolari e cardiaci in topi sottoposti ad esercizio fisico.

Le linee cellulari di mioblasti murini C2C12 sono state differenziate in vitro mediante semina in terreno contenente il 2% di siero di cavallo. Sono stati ottenuti cloni di tali cellule overesprimenti e silenziate per CRP3/MLP. Il danno cellulare è stato indotto tramite trattamento con etoposide o in assenza di gravità. Lo studio dei meccanismi indotti dai trattamenti sopra indicati e del ruolo delle sirtuine e delle CRP è stato effettuato mediante Real Time-PCR, Western blotting e immunoprecipitazione su cellule proliferanti e differenziate. Mediante immunoprecipitazione è stata studiata l'interazione tra queste proteine, fattori trascrizionali coinvolti nella sopravvivenza e markers di apoptosi. Per il recupero funzionale è stata analizzata la morfologia tramite microscopia elettronica e delle proteine sarcomeriche per le cellule muscolari.

Per lo studio del ruolo delle sirtuine e delle CRP nell'infarto sono stati utilizzati modelli in vivo costituiti da topi in cui è stato indotto un infarto. L'espressione proteica, l'interazione proteica e la localizzazione cellulare è stata valutata mediante western blotting, immunoprecipitazione e immunofluorescenza.

Gli esperimenti condotti dimostrano che nei miociti differenziati e nei miocardiociti le sirtuine e le CRP si associano.

Questa associazione avviene tra la SIRT6 e CRP3 e tra SIRT2 e CRP2. Inoltre, in presenza di un danno come l'infarto tale associazione si perde. E' stato anche overespresso o si-

lenziato CRP3 nei miociti osservando le variazioni della morfologia al microscopio ottico ed elettronico. Questi stessi cloni hanno mostrato una maggiore resistenza alla morte cellulare dopo overespressione della CRP3.

Ci si aspetta che le sirtuine e le CRP intervengano nella regolazione di pathway di morte e sopravvivenza, ad esempio che interagiscano e regolino il pathway apoptotico mitocondriale. Lo studio della morte cellulare e del riparo molecolare nei miociti e nei cardiomiociti fornirà informazioni sull'eventuale ruolo che CRP e sirtuine giocano.

Ci si aspetta inoltre che l'attività fisica sia caratterizzata da aumentati livelli delle sirtuine e/o CRP e che l'attività fisica attivi un'interazione tra CRP e sirtuine. Si sa già da studi preliminari che l'esercizio fisico altera l'espressione dei messaggeri di diverse sirtuine. Ci si aspetta che anche le CRP siano alterate. A tal fine verranno utilizzati sia modelli murini sottoposti ad esercizio fisico (treadmill) che modelli umani.

### *Sirtuine mitocondriali mantenimento e recupero dell'integrità mitocondriale e sopravvivenza cellulare in presenza di stress*

Le sirtuine mitocondriali SIRT3, SIRT4 e SIRT5 deacetilano, demalonilano, desuccinilano o ADP ribosilano diverse proteine mitocondriali controllando numerose funzioni mitocondriali come fosforilazione ossidativa, ciclo di Krebs, glicolisi, ciclo dell'urea, apoptosi. A loro volta i mitocondri hanno un ruolo fondamentale nel regolare lo stato energetico cellulare mantenendo la vitalità cellulare. Questo è particolarmente importante in cellule post-mitotiche come neuroni e cardiomiociti in cui l'assenza di replicazione richiede il prolungato mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale della cellula. Disfunzioni mitocondriali sono presenti nell'invecchiamento, malattie neurodegenerative e tumori.

Lo studio si prefigge di:

- Studiare il ruolo delle sirtuine mitocondriali nel regolare la funzione e l'integrità mitocondriale misurata tramite: produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), aumento della permeabilità di membrana con formazione del poro di membrana mitocondriale (MPT) in linee cellulari.
- Studiare il ruolo delle sirtuine mitocondriali nel mantenimento dell'integrità, funzionalità e vitalità cellulare in cellule post-mitotiche e non.

Sono state usate linee cellulari MDA-MB-231, NG108-15 e C2C12. Queste sono state trasfettate o silenziate per le varie sirtuine mitocondriali tramite vettori plasmidici. Le linee parentali o trasfettate sono state sottoposte a ipossia o a trattamento con apoptogeni. La mortalità cellulare è stata misurata tramite citofluorimetria a flusso.

I livelli delle sirtuine mitocondriali (SIRT3 e SIRT5) sono stati misurati tramite western blot nelle frazioni mitocondriali. Sempre nelle frazioni mitocondriali è stata misurata l'attività deacetilasi delle sirtuine tramite l'utilizzo di un substrato fluorescente e misurazione della fluorescenza emessa in un fluorimetro.

I livelli dei ROS sono stati misurati al citofluorimetro previa incubazione delle cellule con diclorofluoresceina-diacetato (DCFH-DA). Il pH intracellulare, indice di un'attività glicolitica elevata, è stato misurato al citofluorimetro previa incubazione delle cellule in BCECF-AM.

La variazione della permeabilità di membrana mitocondriale è stata determinata mediante rilascio del citocromo c, associazione della esochinasi II (HK-II) alla membrana esterna dei mitocondri. I livelli di proteine apoptotiche come AIF, Bax, Bak e Bcl-2 sono stati misurati nella frazione mitocondriale.

Gli esperimenti condotti dimostrano che le sirtuine hanno un ruolo fondamentale nel



controllare e mantenere la funzionalità dei mitocondri. Infatti le cellule overesprimenti la SIRT3 hanno una maggiore resistenza allo stress ipossico e al trattamento con apoptogeni. Tale resistenza è dovuta alla capacità della SIRT3 di deacetilare e attivare diversi enzimi mitocondriali che hanno un ruolo chiave nella funzionalità di tale organello. Uno di questi è la anidrasi carbonica Vb la cui attività, è stato dimostrato, è aumentata nelle cellule overesprimenti SIRT3 con conseguente tamponamento dell'acidificazione intracellulare. Infine, controllando il pH intracellulare, la SIRT3 consente di regolare meglio l'induzione dei processi apoptotici e necrotici.

Un altro aspetto che è stato studiato è il controllo che SIRT3 esercita sulla formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). In questo caso SIRT3 diminuisce i livelli dei ROS intracellulari e dei danni da essi provocati. Infatti, le cellule overesprimenti SIRT3 hanno una maggiore resistenza ai danni da ROS e non attivano i processi controllati dai ROS stessi.

Ci si propone di studiare:

- Il coinvolgimento delle sirtuine nucleari e in particolare SIRT1 e SIRT6 nel regolare l'espressione di quelle mitocondriali al fine di dimostrare la presenza di una risposta coordinata dei vari membri di questa famiglia genica allo stress;
- Il ruolo delle sirtuine mitocondriali nella dinamica mitocondriale di fusione e fissione. In questo caso ci si propone di studiare se tali sirtuine siano coinvolte in patologie mitocondriali.

## LINEA 2

Studio dei meccanismi di recupero funzionale nelle patologie croniche, disabilitanti dell'apparato cardiovascolare e respiratorio.

## AREA DI RICERCA CARDIOVASCOLARE

*Valutazione prospettica di parametri innovativi di rischio cardiovascolare in pazienti con aumentato rischio cardiovascolare e/o malattie cardiovascolari*

Le malattie cardiovascolari (CV) rappresentano la principale causa di morbidità e mortalità nella popolazione mondiale, in entrambi i sessi, con crescente incidenza. L'attuale sistema di prevenzione e valutazione del rischio di CV non tiene conto dell'impatto differenziale che i fattori di rischio e le risposte ai trattamenti farmacologici hanno nei due sessi. La ricerca di parametri innovativi ad alto valore prognostico, che tengano conto delle differenze di genere, è, quindi, di primaria importanza. Lo studio della funzione endoteliale e, più recentemente, della elasticità vascolare e la valutazione di nuovi biomarkers hanno dimostrato la possibilità di predire il rischio cardiovascolare futuro, indipendentemente dai classici fattori di rischio.

Il presente studio è volto a valutare parametri innovativi di rischio CV in pazienti con aumentato rischio CV e/o malattie CV.

Obiettivi primari:

1. valutare prospetticamente la rilevanza di parametri innovativi di rischio CV;
2. valutare l'effetto dell'esercizio fisico in pazienti con aumentato rischio e/o malattie CV;
3. valutare il rischio di insorgenza di eventi CV futuri in pazienti con aumentato rischio CV e/o malattie CV;
4. identificare il ruolo di fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore) e/o di indici precoci di aterosclerosi (stiffness e funzionalità vascolare, microalbuminuria e nuovi biomarcatori) in pazienti a basso rischio CV.

Obiettivi secondari:

1. valutare la concordanza di diverse carte del rischio CV (SCORE e carta del Rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità) in una popolazione di soggetti a basso rischio;
2. valutare prospetticamente l'effetto dell'aderenza alle diverse strategie di prevenzione e/o di intervento (educazionali e/o terapeutiche) riabilitativo.

È stata eseguita una valutazione basale del rischio individuale di eventi CV (morte, infarto del miocardio o ictus) per mezzo di carte del rischio CV validate (carta SCORE e carta del rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità), quindi i soggetti sono stati sottoposti ad una valutazione dei fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, valutazione della qualità di vita mediante World Health Organization Quality of Life - WHOQOL test), valutazione dello stato cognitivo (mediante Mini Mental State Examination - MMSE test), valutazione dello stato dell'umore (mediante Geriatric Depression Scale - GDS test) e valutazione dei disturbi del desiderio sessuale (Hypoactive Sexual Desire Disorder - IIEF) e degli indici precoci di aterosclerosi (stiffness vascolare, valutazione della velocità dell'onda di polso e della pressione aortica centrale, mediante devices dedicati, quali il Complior e lo Sphygmocor), della funzione endoteliale (mediante EndoPAT, pletismografia e/o metodica ecografica), alla valutazione di alcuni parametri basali (peso, altezza, circonferenza vita e fianchi e misurazione della pressione arteriosa), ad un prelievo di sangue e alla raccolta delle urine.

I soggetti sono stati quindi sottoposti a valutazione dell'elasticità vascolare (mediante Complior e Sphygmocor) e della funzione endoteliale (mediante Endopath, pletismografia e/o metodica ecografica) secondo protocolli standardizzati e già approvati dall'IRCCS San Raffaele Pisana.

I soggetti con aumentato rischio cardiovascolare ed i pazienti con malattie cardiovascolari e/o metaboliche sono stati sottoposti, a discrezione del medico, a prova da sforzo con o senza consumo di ossigeno, ecocardiogramma, ecoDoppler vascolare, monitoraggio ambulatoriale dell'ECG o della Pressione Arteriosa, TC cardiaca, RMN cardiaca. Le suddette valutazioni sono state ripetute annualmente durante il follow-up.

I soggetti/pazienti sono stati quindi inclusi in un programma di riabilitazione cardiometabolica che includeva dieta individualizzata ed esercizio fisico commisurato alle capacità funzionali.

Ad ogni visita annuale, atta a valutare eventi e stato di salute, è stato effettuato il calcolo del rischio cardiovascolare.

Ci si aspetta pertanto di:

- individuare la modificazione dei fattori di rischio CV tradizionali, da soli o in associazione a nuovi fattori di rischio emergenti (fattori psico-ambientali, qualità di vita, umore, tempo di inizio della menopausa, stiffness e funzionalità vascolare, biomarcatori) in maniera prospettica, correlando le modificazioni di questi fattori con la comparsa delle malattie CV, tenendo anche in considerazione le eventuali differenze di genere;
- verificare la concordanza di diverse carte del rischio cardiovascolare (SCORE e carta del Rischio del Progetto Cuore dell'Istituto Superiore di Sanità).
- implementare il dialogo fra diversi specialisti (medici di medicina generale, internisti, cardiologi, ginecologi, etc) al fine di ottimizzare le strategie di prevenzione e/o intervento nei pazienti ad aumentato rischio cardiovascolare.

Le attività future includeranno il follow-up dei pazienti inclusi ed il reclutamento di nuovi pazienti.

Nell'anno 2013 sono stati arruolati 63 pazienti.

I pazienti con disfunzione ventricolare sinistra in cui sono state misurate la variabilità della frequenza cardiaca (HRV) e la sensibilità baroriflessa (BRS) sono stati inclusi in un sottostudio al fine di valutare l'importanza prognostica di tali valori e per valutare se l'esercizio fisico è in grado di modificare il controllo baroriflesso.

Poiché tali parametri sono alterati nei pazienti con scompenso cardiaco cronico (CHF) e rappresentano fattori di prognosi negativa, e poiché l'esercizio fisico migliora questi parametri, è stata testata l'ipotesi secondo la quale nei pazienti con CHF variazioni di HRV e BRS siano dose-risposta correlati al carico di lavoro ("volume/intensity training load", TL). I dati suggeriscono che i miglioramenti nelle HRV e BRS in seguito all'esercizio fisico, osservati nei pazienti con CHF, sono correlati a TL in modo non-lineare; con risultati migliori in seguito a dosi moderate di esercizio.

I pazienti con CHF postinfartuale sottoposti a training aerobico continuativo (ACT) ed a intervalli (AIT) sono stati inclusi in uno studio teso ad indagare quale sia la formula ottimale di esercizio fisico nei pazienti con CHF. Lo studio ha testato l'ipotesi che il ACT e l'AIT inducano effetti simili sulla capacità funzionale, emodinamica centrale e sul profilo metabolico di pazienti con CHF postinfartuale a condizione che, in entrambi, il carico di lavoro sia uguagliato da una dose di esercizio individualizzata. Lo studio ha dimostrato che sia ACT che AIT portano un significativo miglioramento della capacità aerobica nei pazienti con CHF postinfartuale, senza differenze significative tra le due modalità di training, a condizione che i pazienti siano addestrati alla medesima dose di esercizio individualizzata tramite il metodo TRIMPi (individualized TRaining IMPulse). Tale metodo può quindi consentire l'individuazione di un allenamento aerobico su misura per lo stato clinico e funzionale del paziente all'interno di programmi di riabilitazione cardiaca. I pazienti con CHF sottoposti a un programma di regime fisico sono stati inclusi in uno

studio volto ad indagare l'effetto a breve termine (3 settimane) del training sul numero di cellule progenitrici endoteliali (EPC) e sui livelli sierici della metalloproteinasi della matrice (MMP) in pazienti con CHF, nonché sulla capacità del siero di favorire unità formanti colonie-cellule endoteliali (CFU-EC) in vitro. Poiché sia EPC che MMP potrebbero giocare un ruolo nel rimodellamento vascolare, l'aumento del numero di EPCs e attività MMP osservati in questo studio suggeriscono che un programma di esercizio fisico a breve termine potrebbe costituire una potenziale strategia terapeutica per salvare la funzione cardiaca in pazienti con CHF.

I pazienti seguiti al follow-up con disfunzione ventricolare sinistra, in terapia con Trimetazidina, sono stati inclusi in uno studio multicentrico di coorte che ha valutato retrospettivamente, in pazienti con insufficienza cardiaca cronica (CHF), l'effetto a lungo termine di Trimetazidina sulla morbilità e la mortalità. Lo studio ha dimostrato che Trimetazidina è efficace nel ridurre la mortalità e migliorare la sopravvivenza libera da eventi nei pazienti con CHF. L'aggiunta di Trimetazidina alla terapia medica migliora la sopravvivenza a lungo termine in pazienti con CHF.

*Correlazione fra funzione ventricolare destra e capacità funzionale in pazienti affetti da Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO).*

La ridotta tolleranza allo sforzo è uno dei sintomi cardini dei pazienti affetti da BPCO ed ha effetti negativi sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza di detti pazienti. Diversi fattori insieme concorrono alla scarsa capacità funzionale dei pazienti con BPCO, fra questi l'ipertensione polmonare (IP) svolge un ruolo primario. La disfunzione del ventricolo destro (DVD) è spesso osservata in corso di BPCO essendo strettamente collegata all'IP, ma potendo anche precedere la stessa IP. La DVD sembra essere correlata ad una scarsa capacità funzionale, ma ad oggi, nella pratica clinica non c'è accordo su quale indice di DVD correla meglio con la capacità funzionale. Sono stati arruolati 44 pazienti con diagnosi nota di BPCO (da almeno 6 mesi), moderata/severa (classe GOLD II-IV) senza patologie note del ventricolo sinistro, in condizioni cliniche stabili afferenti al reparto di riabilitazione respiratoria dell'IRCCS San Raffaele Pisana.

Sono stati esclusi dallo studio coloro che presentavano limitazioni neurologiche e/o ortopediche tali da impedire l'attività fisica o che possedevano una elevata impedenza acustica toracica.

Lo studio si componeva delle seguenti fasi:

1. Valutazione iniziale: ecocardiogramma c/d a riposo. Test del cammino di 6 minuti.
2. Training fisico: i pazienti hanno effettuato attività aerobica ad intensità moderata e costante e limitata dalla comparsa di dispnea, per un totale di 40 minuti. Tale attività si svolge su treadmill ed è preceduta e seguita rispettivamente da 10 minuti di riscaldamento e 10 minuti di rilassamento muscolare. Il protocollo di esercizio si compone di 2 sessioni quotidiane di esercizio per un totale di 20 gg.
3. Rivalutazione finale: ecocardiogramma c/d a riposo. Test del cammino di 6 minuti. Test cardiopolmonare: Viene eseguito su cyclette (protocollo incrementale 10 W/min). Sono determinati: Vo<sub>2</sub> basale ed al picco; soglia anaerobica; quoziente respiratorio; rapporto ventilazione/VCO<sub>2</sub>: Il test cardiopolmonare viene eseguito prima e dopo il training fisico. Ecocardiogramma c/d: viene eseguito a riposo e durante sforzo prima e dopo il training fisico. A riposo, sono acquisite immagini nelle proiezioni standard (parasternale ed apicale 2 e 4 camere).

Negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato un crescente interesse nei confronti dei sistemi endocrini la cui insufficienza è probabilmente responsabile di un peggior assetto clinico, emodinamico, funzionale e prognostico in sottogruppi di pazienti con Insufficienza Cardiaca Cronica (ICC). L'esperienza clinica suggerisce la possibile esistenza di un "disequilibrio ormono-metabolico": infatti, nei pazienti con ICC, si osserva un'ingente perdita di massa muscolare nelle fasi più avanzate e, d'altra parte, un maggior peso corporeo è associato ad una migliore sopravvivenza (obesity paradox). La progressione dell'ICC verso la cachessia cardiaca avviene quando il normale assetto metabolico di catabolismo ed anabolismo è alterato, con aumento del primo rispetto al secondo. Si può, quindi, affermare che nei pazienti affetti da ICC è comune una perdita (deplezione) di ormoni anabolici, testimoniata dall'incremento del metabolismo basale, che cresce con l'aumentare della classe NYHA (New York Heart Association).

L'ormone della crescita (GH) ed il suo effetto tissutale insulin-like growth factor-1 (IGF-1) rappresentano regolatori fisiologici della crescita miocardica e della funzione cardiaca. Nei pazienti affetti da ICC e, soprattutto, in quelli con scompenso avanzato o cachessia cardiaca è stata evidenziata la presenza di un deficit dell'asse somatotropo con ridotti livelli di IGF-1. Grandi studi di coorte (Framingham, DAN-MONICA, e Rancho Bernardo) hanno dimostrato come bassi livelli di IGF-1 siano predittivi di morbilità e mortalità cardiovascolare. Infine, è stato evidenziato un miglioramento della funzionalità cardiopolmonare e della prognosi nei pazienti affetti da ICC e deficit di GH dell'adulto tramite terapia ormonale sostitutiva.

Nei soggetti affetti da ICC è, inoltre, comune osservare un quadro di insulino-resistenza (IR) con elevati valori di insulinemia in grado di determinare effetti antidiuretici e di aumentare la ritenzione idrosalina. L'IR è anche correlata alla gravità della malattia indipendentemente dai valori plasmatici di catecolamine e dai valori di frazione d'eiezione del ventricolo sinistro (LVEF). È stato dimostrato che l'IR è un fattore predittivo indipendente di rischio di sviluppo di ICC. A parte l'IR, nei pazienti con ICC si associa spesso diabete clinico con valori di prevalenza che possono superare il 40% nell'ICC in fase molto avanzata.

Anche l'asse tiroideo appare depresso nell'ICC. Il tipico quadro della secrezione degli ormoni tiroidei osservabile nei pazienti con ICC è la cosiddetta "Low T3 Syndrome", caratterizzata da bassi valori di triiodotiroxina circolanti ( $fT3 < 3,1 \mu\text{mol/l}$ ). Il principale meccanismo sottostante sembra essere una ridotta attività dell'enzima 5'-monodeiodasi, che catalizza la conversione periferica degli ormoni tiroidei da T4 a T3.

È stato dimostrato che, nei pazienti con ICC, la presenza di "Low T3 Syndrome" costituisce un forte fattore predittivo di morte e sembra essere implicata direttamente nella cattiva prognosi di questi soggetti. Nei pazienti affetti da ICC, inoltre, si osserva una riduzione dei livelli di testosterone libero e deidroepiandrosterone direttamente proporzionale alla severità della malattia.

Nonostante l'interesse crescente per identificare i meccanismi che sottendono l'associazione tra sistema endocrino e cuore, restano ancora dei quesiti insoluti:

- l'esatta prevalenza dei difetti ormono-metabolici nell'ICC;
- i criteri diagnostici di questi difetti;
- l'impatto degli stessi su progressione e prognosi dell'ICC.

Lo scopo di questo registro consiste nel determinare la prevalenza dei difetti ormono-metabolici in pazienti affetti da ICC con disfunzione sistolica, esplorandone la possibile associazione con particolari pattern clinici e morfofunzionali, oltre che con squilibri di

altri sistemi neuromorali. Sarà inoltre interesse dell'Area di Ricerca valutare in maniera prospettica l'andamento clinico dei pazienti con deficit ormono-metabolici in termini di mortalità, eventi cardiovascolari, e cambiamenti nei parametri morfo-funzionali cardiaci. Si tratta di uno studio di registro prospettico multi-centrico, che prevede il follow-up di un gruppo di pazienti con insufficienza cardiaca congestizia (ICC) al fine di verificare l'associazione tra end-point e difetti ormono-metabolici. Saranno arruolati complessivamente almeno 700 pazienti consecutivi affetti da ICC secondaria a disfunzione sistolica in classe funzionale NYHA I-IV.

Lo studio si prefigge di valutare la prevalenza e l'impatto prognostico dei difetti ormono-metabolici nell'ICC.

End-point primario consiste nel valutare l'associazione tra presenza di deficit ormono-metabolici e mortalità da tutte le cause.

L'end-point secondario consiste nel valutare l'associazione tra presenza di deficit ormono-metabolici ed il combinato di mortalità da cause cardiache e ospedalizzazione per scompenso cardiaco.

Gli end-point terziari consistono in: variazioni di VO<sub>2</sub> max, volumi ventricolari, capacità funzionale, e frazione di eiezione del VS.

Vengono inclusi nello studio:

- Uomini e donne di età superiore ai 18 anni;
- Pazienti con diagnosi di ICC secondo le attuali linee guida (28);
- Frazione di eiezione del ventricolo sinistro <40%.

Criteri di esclusione:

- Insufficienza renale richiedente dialisi
- Cirrosi epatica
- Malattia neoplastica con aspettativa di vita inferiore ad 1 anno
- Malattie autoimmuni in fase attiva
- Sindrome Coronarica Acuta nei 6 mesi precedenti

La durata prevista per il registro è di 5 anni con un follow-up medio di 2,5 anni.

Se nel registro viene arruolato un numero di pazienti di almeno 700, lo studio permetterà di testare l'ipotesi che i deficit ormono-metabolici sono predittori di mortalità nei pazienti con ICC.

Lo studio si svolge in collaborazione con l'Università di Napoli e altri 26 centri italiani tra cui l'IRCCS San Raffaele Pisana.

L'arruolamento dei soggetti è iniziato nel mese di Ottobre 2013. Sono stati arruolati 7 pazienti che hanno tutti completato la visita 1.

### *Effetti del training fisico sulla funzione ventricolare destra in pazienti affetti da scompenso cardiaco*

Tradizionalmente si ritiene che la ridotta tolleranza all'esercizio dei soggetti con scompenso cardiaco cronico (SCC) dipenda da fattori periferici, quali il deterioramento dei muscoli scheletrici, piuttosto che da fattori centrali, cardiaci. A conferma di tale ipotesi vi è il dato della mancanza di correlazione fra la frazione d'eiezione ventricolare sinistra di tali pazienti e la loro capacità di fare esercizio.

Durante la loro storia clinica, i pazienti con SCC possono sviluppare disfunzione del ventricolo destro (dvdx). La dvdx è spesso secondaria all'incremento della pressione polmonare ma può anche dipendere dalla perdita di massa contrattile a causa di un infarto che interessa il Vdx. La presenza di dvdx nel contesto di SCC rappresenta un importante fattore prognostico negativo essendo correlato ad una più elevata morta-

lità. Inoltre essa sembra concorrere a determinare l'intolleranza allo sforzo: la frazione d'eiezione  $V_{dx}$  è correlata significativamente al Consumo di Ossigeno ( $Vo_2$ ) a riposo ed al picco di esercizio. Metwin et al hanno inoltre dimostrato che in soggetti con SCC il grado di inefficienza ventilatoria, espressa dal rapporto ventilazione/volume di  $CO_2$  ( $VE/VCO_2$ ), tipicamente alterato in soggetti con SCC, è correlato all'entità della  $d_{vdx}$ . Poiché un aumento del rapporto  $VE/VCO_2$  è dovuto prevalentemente ad un aumento dello spazio morto fisiologico a sua volta secondario, nel caso dello SCC, ad ipoperfusione polmonare, questo stabilirebbe un legame fisiopatologico fra  $d_{vdx}$  ed inefficienza ventilatoria. In letteratura ci sono pochi studi che hanno valutato gli adattamenti del cuore destro al training fisico, ed in particolare non ci sono dati in soggetti con scompenso cardiaco e disfunzione ventricolare sinistra. In un recente studio non pubblicato è stata dimostrata una correlazione positiva fra picco di  $Vo_2$  ottenuto al test cardiopolmonare ed incremento dell'escursione sistolica dell'anello tricuspide (TAPSE). In particolare non è noto se al miglioramento del rapporto  $VE/VCO_2$  osservato dopo un periodo di training fisico nello SCC concorra anche un incremento della perfusione polmonare e, pertanto, della funzione ventricolare destra. Inoltre non è noto se differenti tipologie di esercizio fisico (interval training, training continuo) possano esercitare effetti diversi. E' dunque probabile che il miglioramento della tolleranza all'esercizio che si osserva in soggetti con scompenso cardiaco dopo training fisico sia secondario oltre che al condizionamento dei muscoli scheletrici ed alla conseguente modulazione dei metaboriflessi, ad un miglioramento della funzione ventricolare destra.

L'ipotesi dello studio è che il training fisico determini un miglioramento della funzione ventricolare destra quantificata attraverso la valutazione dell'escursione dell'anello tricuspide – TAPSE - in pazienti con SCC; che tale miglioramento è correlato al miglioramento dell'efficienza ventilatoria e che è più marcato nel gruppo di pazienti che effettua interval training.

Lo studio prevede l'arruolamento di 30 pazienti con diagnosi nota di scompenso cardiaco (da almeno 6 mesi) con frazione d'eiezione  $<45\%$ , in condizioni cliniche stabili (non ricoveri per acuzie da almeno 2 mesi) ed in trattamento farmacologico non modificato da almeno un mese.

Criteri di inclusione: Frazione d'eiezione  $V_{sn} < 40\%$ ; stabilità clinica, non ricoveri per scompenso negli ultimi 2 mesi; non modifiche terapeutiche nell'ultimo mese.

Criteri di esclusione: angina; classe funzionale NYHA IV; aritmie minacciose; limitazioni neurologiche e/o ortopediche tali da impedire l'attività fisica; elevata impedenza acustica toracica.

Lo studio si compone delle seguenti fasi:

1. Valutazione iniziale: prelievo ematico (con pazienti a digiuno da 12 h): emocromo, azotemia, creatinina, NT pro-BNP. Ecocardiogramma c/d a riposo ed al massimo sforzo. Test cardiopolmonare.
2. Randomizzazione dei pazienti arruolati in 2 gruppi: 1) gruppo A: che effettua attività aerobica ad intensità moderata e costante (50-70% del  $VO_2$  picco) per un totale di 40 minuti. Gruppo B: che effettua interval training alternando periodi di 5 minuti all'80-90% del  $VO_2$  picco a 5 minuti al 50% della  $VO_2$  picco, per un totale di 40 min. Per entrambi i gruppi tale attività si svolge su treadmill ed è preceduta e seguita rispettivamente da 10 minuti di riscaldamento e 10 minuti di rilassamento muscolare. Il protocollo di esercizio si compone di 3 sessioni settimanali di esercizio per un totale di 3 mesi.
3. Rivalutazione finale: (Prelievo ematico a digiuno: Ecocardiogramma c/d a riposo ed al massimo sforzo. Test cardiopolmonare).



Test cardiopolmonare: viene eseguito su cyclette (protocollo incrementale 10 W/min). Sono determinati: Vo<sub>2</sub> basale ed al picco; soglia anaerobica; quoziente respiratorio; rapporto ventilazione/VCO<sub>2</sub>. Il test cardiopolmonare viene eseguito prima e dopo il training fisico.

Ecocardiogramma c/d: viene eseguito a riposo e durante sforzo prima e dopo il training fisico. A riposo, sono acquisite immagini nelle proiezioni standard (parasternale ed apicale 2 e 4 camere). Durante lo sforzo sono acquisite immagini nella proiezione apicale con paziente seduto su cyclette. Vengono valutati i seguenti parametri. Frazione d'eiezione V<sub>sn</sub>, volume telediastolico TAPSE, Rapporto E/E.

Ci si prefigge di individuare i parametri ecocardiografici che correlino con la performance fisica dei pazienti con scompenso cardiaco cronico ed inoltre che siano predittivi della risposta che si ottiene dopo il training fisico.

Sono sinora stati valutati 14 pazienti. Hanno tutti effettuato le valutazioni iniziali. Di questi 11 hanno completato il ciclo di training fisico ed hanno effettuato le valutazioni finali.

### *Ruolo delle sirtuine nel mediare gli effetti benefici della riabilitazione nel paziente con scompenso cardiaco*

L'esercizio fisico regolare è potenzialmente in grado di influenzare i meccanismi dell'infiammazione, della morte cellulare e dello stress ossidativo. Ad esempio, è stato recentemente osservato che l'esercizio fisico aumenta i livelli plasmatici della sirtuina 1 (SIRT 1) che, a sua volta, aumenta la FOXO3A e la capacità di quest'ultima di aumentare l'espressione della GADD45, un bersaglio della FOXO3A, coinvolta nella riparazione del DNA. Inoltre è stato riportato che l'esercizio fisico di tipo aerobico aumenta il contenuto di SIRT 1 nel muscolo scheletrico.

Si potrebbe ipotizzare che parte degli effetti benefici dell'esercizio fisico che si verificano sia negli individui sani che nei pazienti cardiopatici, inclusi i pazienti con scompenso cardiaco, possano essere collegati all'effetto modulatore dell'esercizio fisico sull'attività di una serie di fattori, il cui fine ultimo sarebbe quello di mantenere un equilibrio tra la morte cellulare programmata (apoptosi) e la riparazione cellulare. In tal senso, è noto che una singola sessione di esercizio fisico intenso determina profonde alterazioni nell'espressione genica nucleare e mitocondriale sia nel cuore che nel muscolo scheletrico, nel tentativo di neutralizzare gli effetti potenzialmente dannosi di questo tipo di stress metabolico/ossidativo. In questo contesto è importante sottolineare che la catena di trasporto elettronico mitocondriale è stata identificata quale la maggior sorgente di ROS intracellulare durante lo stress imposto dall'esercizio e l'accumulo di ROS modula rapidamente l'attività delle sirtuine.

Infine, uno studio effettuato sui maratoneti (maratona di Roma 2008) ha mostrato che è in grado di modulare la risposta cellulare allo stress dell'esercizio, indicando che il bilancio tra geni pro e antiapoptotici varia a favore di uno stato antiapoptotico dopo un esercizio fisico intenso e prolungato.

I risultati ad oggi riportati, anche se limitati, suggeriscono che numerosi fattori proteici di tipo ripartivo-protettivo ed anti-infiammatori vengono attivati dall'esercizio fisico e sono coinvolti nei meccanismi adattativi da questo indotti. Tali markers, rilevabili nel sangue circolante, potrebbero rivelarsi regolatori chiave nel mediare alcuni effetti benefici del training fisico.

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è quello di studiare il possibile ruolo dell'esercizio fisico strutturato svolto nell'ambito di un programma di riabilitazione cardiologica in pazienti con scompenso cardiaco sull'espressione di markers proteici di ripa-

razione e protezione del danno cellulare da stress ossidativo ed anti-infiammatori, quali sirtuine, TNF , FOXO3A etc.

Tale studio permetterà di analizzare se questi markers rivestono un ruolo rilevante nel mediare gli effetti benefici dell'attività fisica nell'ambito della riabilitazione cardiologica. Ci si attende di poter identificare i markers biologici circolanti correlati con l'espressione di proteine, con attività protettiva-riparativa cellulare ed anti-infiammatoria influenzabili da diverse modalità di training fisico da utilizzare, in prospettiva, come indicatori addizionali di recupero funzionale, correlabili agli effetti benefici dell'allenamento e all'outcome dei pazienti.

Nel corso del 2013 si è provveduto al reclutamento dei pazienti.

### *Programma di esercizio fisico strutturato come contromisura verso l'intolleranza ortostatica indotta dalla permanenza nello spazio*

Secondo i dati disponibili, nessun programma di esercizio fisico strutturato, specificamente rivolto a valutare gli adattamenti neurovegetativi in risposta a uno specifico programma di allenamento, è stato svolto dagli astronauti. Il programma si riferisce alla dose di attività fisica da svolgere al fine di prevenire, o almeno ridurre, l'intolleranza ortostatica che si verifica al rientro nello spazio gravitazionale terrestre dopo voli spaziali. La prescrizione ottimale di esercizio (in termini di modalità, frequenza, intensità e durata) per raggiungere questo scopo negli astronauti non è stata ancora identificata.

La domanda: "Quanto e quale tipo di esercizio fisico è necessario per migliorare la tolleranza ortostatica", rimane attualmente senza risposta.

Recentemente, il gruppo di ricerca ha sviluppato un nuovo metodo chiamato TRIMPi (individualized Training IMPulses) che rappresenta una misura integrata, e individualmente determinata, delle risposte biologiche al carico di allenamento. Questo metodo utilizza un unico parametro che tiene conto degli effetti sia del volume che dell'intensità del programma di allenamento, cioè la dose di esercizio, sulla regolazione nervosa cardiovascolare. Questo metodo è stato utilizzato sia in corridori di maratona che in pazienti affetti da insufficienza cardiaca.

E' stato riscontrato un rapporto dose-risposta curvilineo tra il carico di allenamento individualizzato (cioè il valore di TRIMPi) e i parametri che esprimono il funzionamento del sistema nervoso autonomo, con un incremento della variabilità del componente a bassa frequenza del battito cardiaco e della pressione arteriosa, marker di modulazione simpatica cardiaca e vascolare, al picco del carico di esercizio allenante.

L'aumento di attività simpatica diretta al cuore e ai vasi potrebbe essere fondamentale nel prevenire l'intolleranza ortostatica, poiché una ridotta risposta simpatica vasocostrittrice rappresenta un meccanismo predominante dell'intolleranza ortostatica assieme al contributo di un incremento relativamente attenuato della FC. Pertanto piani di allenamento di resistenza aerobica, di elevata intensità, programmati individualmente sulla base del TRIMPi, potrebbero dimostrarsi efficaci nel contrastare l'intolleranza ortostatica degli astronauti dopo voli spaziali.

Di conseguenza lo scopo di questo progetto è di valutare l'efficacia di un programma strutturato di allenamento aerobico strutturato, personalizzato in base al TRIMPi, nel prevenire l'intolleranza ortostatica e i meccanismi che ne sono all'origine, legati principalmente alla regolazione nervosa cardiovascolare, in astronauti durante un volo spaziale. Come consolidata metodologia per la valutazione del controllo nervoso del sistema cardiovascolare durante lo stress ortostatico (ortostatismo attivo) pre- e post-volo spaziale, saranno utilizzati l'analisi spettrale della variabilità della Frequenza Cardiaca (FC)

e della pressione arteriosa e la sensibilità baroriflessa.

A questo fine, gli astronauti fanno uso dei sistemi esistenti di esercizio e di monitoraggio cardiovascolare presenti a bordo della ISS come il tapis-roulant, il modulo ARMS, un sistema di ricerca fornito dall'Agencia Europea Spaziale che dovrebbe essere disponibile a terra e a bordo dello shuttle o dell'European Physiological Module.

I dati ottenuti da questo studio potrebbero fornire una base per consentire la progettazione efficace di programmi di addestramento all'esercizio fisico per gli astronauti in future missioni di lunga durata sull'ISS, in cui protocolli di contromisure di attività fisica sono fortemente consigliati dall'Agencia Spaziale Europea e dalla NASA.

Lo sviluppo delle contromisure specifiche per accelerare la riabilitazione di equipaggi in missioni di esplorazione potrebbe trovare delle applicazioni cliniche nel prevenire disturbi legati all'inattività o a problemi di gravitazione e ai disabili qui sulla terra. Queste contromisure saranno benefiche per prevenire disfunzioni autonome legate allo stress gravitazionale, come quelle riscontrate nei soggetti allettati e con scompenso cardiaco come ipotensione ortostatica, l'atrofia o antigravità dei muscoli, ecc.

Questo aspetto è particolarmente importante nella nostra società che sta invecchiando con molte persone anziane costrette a letto. La conoscenza accumulata dagli studi sulle funzioni neurali autonome nello spazio dovrebbe essere di grande utilità per stabilire contromisure e metodi preventivi efficaci per diverse categorie di pazienti caratterizzati da segni e sintomi di disfunzioni autonome.

Una serie di teleconferenze hanno avuto luogo tra Agencia Spaziale Italiana e la NASA al fine di integrare al meglio tutti i progetti previsti durante il volo spaziale, tra cui quello in oggetto. In queste occasioni sono stati presentati tutti i dettagli del progetto alla Commissione della NASA. Inoltre, vi è stato un incontro presso l'ASA in cui sono stati presentati all'astronauta italiana Samantha Cristoforetti i singoli progetti e sono state discusse con lei eventuali problematiche e criticità.

## **AREA DI RICERCA BIOTECNOLOGIE AVANZATE**

*Fattori genetici come determinanti di outcome nell'invecchiamento vascolare e nelle malattie cardiovascolari*

L'invecchiamento corrisponde a modificazioni organiche che rendono l'organismo più suscettibile alle patologie neurodegenerative e cardiovascolari indipendentemente dai fattori di rischio presenti. In particolare, l'invecchiamento vascolare è associato ad una graduale modificazione della struttura e del funzionamento dei vasi, risultante in una minore capacità vascolare ed in un aumento della rigidità della parete arteriosa. A questo processo di invecchiamento fisiologico dei vasi, con l'avanzare dell'età, si associa un aumentato rischio per patologia aterosclerotica, con un incremento della presenza delle placche aterosclerotiche nei vasi e un graduale ispessimento medio/intimale arterioso. In alcuni soggetti più suscettibili, questi processi possono presentare un decorso più rapido risultando in un maggior rischio di malattie cardiovascolari come l'ictus cerebrale e l'infarto del miocardio indipendentemente dai classici fattori di rischio. L'aterosclerosi è una patologia complessa causa principale di infarto del miocardio e di ischemia cerebrale. Nonostante la natura di patologia multifattoriale, è stato dimostrato come l'ambiente e i classici fattori di rischio vascolari influiscano solo in parte sulla variabilità clinica e subclinica di tale patologia. Recenti ricerche genetiche condotte su popolazioni di gemelli, fratelli e famiglie tipizzate hanno accertato una forte componente genica nello

sviluppo della malattia aterosclerotica e nell'incidenza della patologia cardiovascolare. Le placche carotidiche (PC), l'ispessimento medio/intimale carotideo (IMIC) e l'ipertrofia ventricolare sinistra (IVS) risultano essere importanti marcatori della malattia aterosclerotica e fenotipi subclinici di patologia cardiovascolare. PC, IMIC e IVS vengono definiti, sia da un punto di vista biologico sia genetico, distinti fenotipi subclinici di patologia cardiovascolare e come importanti fattori prognostici di eventi clinici cardiovascolari. Per tale motivo, una analisi dei fattori genetici associata ad una valutazione dei fattori di rischio per le patologie cerebro e cardiovascolari può permettere una migliore conoscenza del processo di invecchiamento vascolare e portare ad un intervento precoce di prevenzione in pazienti a rischio. Di conseguenza, l'obiettivo principale del progetto prevede l'utilizzo di campioni biologici umani allo scopo di ottenere una popolazione specifica ed ampia statisticamente utilizzabile per studi di associazione caso-controllo. L'obiettivo principale è quindi l'identificazione e caratterizzazione di marcatori genetici-molecolari da utilizzare quali indici predittivi di invecchiamento vascolare e rischio cardiovascolare. Un ulteriore obiettivo prevede la validazione di questi marcatori in popolazioni con diversa etnia grazie al database messo a disposizione dall'Università di Miami, USA, per meglio inquadrare la loro capacità di valutare il rischio di progressione dell'aterosclerosi e gli outcome clinici della malattia cardiovascolare. Inoltre, analisi successive, permetteranno di determinare l'impatto della terapia (anticoagulanti, antiipertensivi, statine, ecc) sulla progressione della malattia aterosclerotica in queste popolazioni di studio. Uno studio approfondito dell'impatto dei fattori di rischio vascolari, come il diabete, sui diversi marcatori subclinici di aterosclerosi, permetterà una strategia predittiva migliore sui maggiori outcome cardiovascolari.

I campioni biologici (sangue intero, siero, plasma, urine, etc.) di pazienti con fattori di rischio vascolari e patologie cardiovascolari, sono adeguatamente preservati nella biobanca dell'Università di Miami e presso la BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana previo consenso informato scritto. Tutte le analisi genetiche sono effettuate presso l'IRCCS San Raffaele e presso l'Human Genomic Center, University of Miami, Miami, FL, USA. Le analisi delle varianti genetiche sono effettuate con metodiche di biologia molecolare ad alta sensibilità per l'individuazione di sequenze di geni coinvolti nei meccanismi dell'invecchiamento vascolare e dei fattori di rischio ad esso correlati. L'indagine ecografica per la valutazione dei diversi fenotipi di aterosclerosi è effettuata in tutti i pazienti arruolati nello studio. Tutti i dati e le informazioni cliniche riguardanti i pazienti sottoposti a ecografia saranno inseriti, previa opportuna anonimizzazione, in un apposito database che sarà a disposizione di tutti i centri partecipanti allo studio. Un adeguato controllo clinico per valutare la progressione della malattia aterosclerotica sarà pianificato in una coorte di pazienti con età superiore ai 60 anni. Studi clinici e di base saranno condotti presso i laboratori del Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università di Roma Tor Vergata, Roma, Italia.

I risultati fin qui ottenuti dimostrano come vi sia una forte componente genetica nello sviluppo della malattia aterosclerotica e di conseguenza nelle malattie cardiovascolari. E' stato dimostrato come geni implicati nello stress ossidativo (sirtuine e UCP2) siano in grado di avere un effetto significativo sulle PC e sul IMIC. Inoltre, altri geni come quelli regolanti i processi di coagulazione/fibrinolisi sono stati identificati come importanti fattori regolatori per aterosclerosi carotidea. Questi dati si aggiungono a precedenti risultati dove è stata dimostrata una associazione statisticamente significativa tra IMIC e loci genetici localizzati su cromosoma 7p e 14q codificanti proteine coinvolte nei processi di infiammazione, coagulazione, metabolismo lipidico e glicidico. Inoltre in un ulteriore studio di associazione sono stati identificati ulteriori loci presenti sul cromosoma 12 cor-

relati ad un maggior rischio per IVS. In quest'ultimo anno uno studio su modello murino ha permesso di sviluppare una nuova tecnica per l'induzione dell'ischemia cerebrale nell'animale da esperimento che può essere utile nello studio dei vari fattori di rischio sulle malattie vascolari determinandone il loro reale impatto. Infine, l'impatto di fattori di rischio come il consumo di alcool, la terapia con antiipertensivi e valori alterati di markers ematici (GGT) sono stati studiati nella popolazione anziana a rischio, compresa la popolazione con scompenso cardiaco, per capirne il loro impatto sulla mortalità.

L'esperienza nel settore maturata presso il Department of Neurology, Miller School of Medicine, University of Miami, FL, USA, l'attiva collaborazione con l'Università di Tor Vergata e la disponibilità di una banca biologica di riferimento (progetto BioBIM) costituiscono un punto di forza per l'individuazione di associazioni significative tra i fattori genetici e predisposizione all'invecchiamento vascolare con conseguente variabilità clinica della patologia cardiovascolare. In particolare, sono in corso nuovi studi per identificare differenze biologiche e genetiche tra i diversi markers subclinici di aterosclerosi e sul ruolo protettivo dei meccanismi antiossidanti in varie patologie vascolari. Inoltre, è in corso il reclutamento di campioni biologici relativi a pazienti con ischemia cerebrale e con presenza di fattori di rischio cardiovascolare, come il diabete. Per ogni categoria di pazienti, una volta raggiunta una popolazione statisticamente rilevante per studi di associazione si inizierà a valutare i polimorfismi genetici potenzialmente correlati alla patologia che, da soli o in associazione tra di loro, possono fornire indicazioni su determinanti di outcome o risposta ad una terapia farmacologia personalizzata. Tali profili genetici, potrebbero in seguito essere utilizzati per una valutazione di un precoce sviluppo della malattia aterosclerotica, permettendo quindi di individuare pazienti asintomatici a rischio di infarto del miocardio e di ictus cerebrale.

#### *Definizione di determinanti di outcome in patologie ad aumentato rischio trombotico*

Allo stato dell'arte, la migliore comprensione dei meccanismi di regolazione dell'emostasi derivata da numerosi studi clinici ha conferito una precisa rilevanza epidemiologica al concetto di "ipercoagulabilità" spesso messo in relazione all'insorgenza della trombosi. Tuttavia, i modelli di valutazione del rischio trombotico finora sviluppati non sono ottimali e potrebbero portare a sottovalutare una percentuale significativa di pazienti. In tale contesto, l'identificazione di nuovi biomarcatori potrebbe offrire la possibilità di migliorare i modelli clinici esistenti per la stratificazione di pazienti ad alto rischio in cui un'anticipazione diagnostica e/o l'applicazione di eventuali programmi di trombofilassi potrebbero intervenire favorevolmente non solo in una fase di prevenzione primaria, ma anche e soprattutto durante il percorso riabilitativo.

Lo studio si prefigge di identificare e caratterizzare nuovi marcatori biomolecolari da utilizzare quali indici predittivi utili alla determinazione del rischio tromboembolico o quali determinanti di outcome in pazienti con aumentato rischio trombotico.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti sono adeguatamente preservati nella BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana previo consenso informato scritto (approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele). Tutti i campioni sono codificati in modo da garantire l'anonimato del paziente ed inseriti in un programma di database computerizzato protetto da doppio codice di accesso/password. In considerazione della stretta interazione esistente tra alterazioni infiammatorie e modificazioni dell'assetto procoagulante, vari marcatori di attivazione emostatico/coagulativa sono analizzati in associazione ad alcuni analiti di significato infiammatorio interconnessi con il sistema emostatico. Su popolazioni selezionate di pazienti viene

eseguito lo studio dei polimorfismi metabolici correlati a diagnosi, prognosi e valutazione dell'approccio multidisciplinare (dieta, esercizio fisico ed eventuale terapia medica). Gli studi condotti nell'ambito di questa linea di ricerca hanno preso in considerazione soprattutto il paziente oncologico, nel quale è necessario garantire una presa in carico globale fin dall'inizio del percorso terapeutico, attraverso un approccio multidisciplinare e multidimensionale, che garantisca da un lato il miglior trattamento antitumorale e dall'altro un precoce riconoscimento di eventuali altri bisogni del malato, permettendo un inserimento precoce delle cure palliative e la riabilitazione per la prevenzione ed il controllo dei sintomi legati alla malattia e/o alle terapie. In particolare, sono stati analizzati alcuni indici predittivi di tromboembolismo venoso (TEV), una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti oncologici, soprattutto nei primi tre mesi di trattamento. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la possibilità di identificare pazienti ad alto rischio grazie all'introduzione diagnostica di alcuni test funzionali coagulativi, o mediante caratterizzazione molecolare di alcune varianti geniche a carico del promoter del gene TNFA. Inoltre, la valutazione di un numero consistente di pazienti oncologici ha evidenziato che il trattamento con regimi chemioterapici a base di composti del platino è responsabile dell'insorgenza di una condizione di trombofilia acquisita e rappresenta una variabile predittiva di TEV anche dopo correzione per altri fattori di rischio noti. Questo dato assume particolare rilievo soprattutto in pazienti anziani (over 70) in cui la presenza di co-morbilità (performance status) aumenta in maniera sostanziosa il rischio tromboembolico in relazione all'uso di composti del platino. È noto che l'impiego di regimi chemioterapici a base di platino nel paziente anziano è limitato a causa dell'elevato rischio di tossicità cardiovascolare, con ricadute clinico-assistenziali di notevole importanza nel percorso terapeutico e riabilitativo del paziente oncologico anziano. Una migliore stratificazione del rischio tromboembolico e l'uso di una profilassi adeguata potrebbe permettere l'applicazione di protocolli chemioterapici a base di composti del platino senza interferire con la morbilità e la qualità di vita (QdV) di pazienti oncologici anziani, evitando di esporre i pazienti non a rischio agli effetti deleteri di eventuali complicanze emorragiche.

Le indagini condotte nel laboratorio suggeriscono la possibile messa a punto di un nuovo algoritmo diagnostico per l'identificazione di sottogruppi di pazienti ad alto rischio trombotico. Risultati preliminari ottenuti mediante tecniche di data mining e KDD (Knowledge Discovery in Databases) sono promettenti in tal senso. Inoltre, la possibilità offerta dalla BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana di estensione dello studio a categorie di pazienti con patologie diverse da quella oncologica, permetterà di caratterizzare in maniera approfondita lo stato di ipercoagulabilità che precede l'evento trombotico, anche e soprattutto nell'ottica delle possibili implicazioni terapeutiche con l'uso di agenti ad azione pleiotropica.

*Applicazione di nuove tecnologie di Biomarker discovery per l'identificazione di determinanti di outcome clinico delle malattie croniche disabilitanti*

La scoperta di nuovi biomarcatori (biomarker discovery) è essenziale per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di numerose malattie croniche disabilitanti, per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e per predire in maniera personalizzata la mancata risposta ad un determinato trattamento farmacologico, o la possibile insorgenza di effetti indesiderati. In tale contesto, le biotecnologie a disposizione (analisi proteomica e genomica) rappresentano lo strumento principe per la identificazione e caratterizzazione di molecole predittive, diagnostiche e pro-

gnostiche potenzialmente utili in fase clinica. Inoltre, la disponibilità di una BioBanca interistituzionale multidisciplinare (progetto BioBIM) per la raccolta di prelievi biologici sui quali poter effettuare indagini diagnostiche tradizionali e, soprattutto, innovative, rappresenta uno strumento prezioso idoneo al disegno sperimentale di studi di biomarker discovery ed alla valutazione di future metodiche diagnostiche al momento non disponibili, di cui potrebbe essere validata l'applicabilità clinica in tempi estremamente ridotti.

Sulla base di tali presupposti, obiettivo principale di questo progetto è l'applicazione di tecniche di biomarker discovery al fine di identificare determinanti di outcome in patologie croniche e disabilitanti. Tale obiettivo è perseguito attraverso l'identificazione, mediante tecniche di genomica e proteomica, di nuovi polimorfismi metabolici, pattern di espressione e profili proteici da utilizzare come marcatori di diagnosi, progressione, prognosi e risposta alla terapia e/o insorgenza di effetti indesiderati in pazienti in trattamento riabilitativo. La possibilità fornita dalle moderne tecniche di farmacogenomica di predire individualmente tali determinanti, potrebbe permettere l'applicazione in tempi rapidi di protocolli terapeutici personalizzati ed un uso razionalizzato dei farmaci.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti (patologie neurodegenerative, cardiovascolari, oncologiche, etc.) sono adeguatamente preservati nella BioBIM. Le procedure di processazione e stoccaggio dei campioni biologici sono state strutturate in base a protocolli standard di riferimento e sono diversificate a seconda dei campioni che vengono trattati. Ad ogni campione biologico sono associati i dati del donatore che comprendono: la cartella clinica, la storia familiare, l'eventuale patologia ed altri eventuali dati ritenuti di rilievo per studi specifici. La BioBIM è organizzata in modo da assicurare: la conservazione del campione per 20 anni, la qualità del campione biologico conservato, il corretto utilizzo dei campioni biologici depositati e la tutela della privacy del soggetto donatore.

Gli aspetti metodologici hanno come punto di partenza un efficiente isolamento e purificazione di proteine da miscele complesse e la loro separazione mediante elettroforesi su gel mono e bidimensionale (2D-GE) o attraverso cromatografia liquida multidimensionale (MD-LC). Il campione così frazionato può essere quindi studiato per determinarne il profilo proteico tramite spettrometri di massa di ultima generazione e, in ultima analisi, le molecole proteiche responsabili delle alterazioni patologiche. Le informazioni ottenute sono inoltre integrate ed analizzate tramite avanzate tecnologie bioinformatiche che permettono la consultazione di banche dati on-line e per la definizione di nuovi target terapeutici e metodi diagnostici.

Sono inoltre utilizzate indagini di diagnostica molecolare per l'individuazione di varianti di sequenza mediante metodiche di diagnostica molecolare e sequenziamento diretto automatico. Enzimi di restrizione, primer extension e Real Time PCR vengono utilizzati per identificare varianti di sequenza utilizzabili come marcatori di diagnosi, progressione, prognosi e risposta alla terapia.

La disponibilità di una biobanca dotata di procedure operative standardizzate e diversificate a seconda della natura dei campioni da analizzare, ha permesso l'esecuzione di alcuni studi specifici atti ad individuare biomarcatori utili per la predittività e l'efficacia terapeutica in alcune patologie cronicodegenerative, quali vari tumori solidi, o patologie cardiovascolari e neurologiche. In ambito oncologico, di particolare rilievo sono le indagini condotte nel corso dell'anno 2013 su una popolazione omogenea di pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto, reclutati presso il Policlinico Tor Vergata di Roma, al fine di individuare patterns biomolecolari correlabili allo sviluppo di neoplasia o alla predittività della risposta al trattamento con farmaci anti-angiogenetici.

Inoltre, i risultati derivati da uno studio disegnato allo scopo di analizzare gli effetti di alcuni regimi chemioterapici standard sulla risposta immunitaria di pazienti con carcinomi hanno messo in evidenza un incremento significativo del numero e della funzione delle cellule T regolatorie, fornendo il razionale per l'uso di regimi di immunoterapia attiva in combinazione alla chemioterapia standard.

Per quanto attiene alle patologie cardiovascolari, sono stati analizzati e discussi gli ultimi studi genetici relativi alle malattie cardiovascolari nell'uomo e come metodiche di ultrasonologia possono aiutare nel predire gli accidenti vascolari specialmente in pazienti ad alto rischio come quelli diabetici.

La possibilità, offerta dalla BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana, di ampliamento della casistica ed ampliamento dello studio, si prevede di estendere gli studi di biomarker discovery su un più ampio campionamento che includa anche altre categorie di pazienti allo scopo di individuare nuovi parametri biologici da utilizzare quali determinanti di outcome in pazienti affetti da patologie croniche disabilitanti e validarne l'applicabilità clinica. In particolare, si sta procedendo alla valutazione di diverse varianti geniche su popolazioni di pazienti affetti da patologie cardiovascolari, neurologiche ed oncologiche allo scopo di verificare le possibili associazioni genotipo/fenotipo utili ad un approccio clinico personalizzato che possa determinare un vantaggio per il paziente.

*Marcatori genetici e studi di associazione caso-controllo per la valutazione dei determinanti di outcome e di efficacia terapeutica in patologie croniche, disabilitanti ed età correlate*

Un valido approccio metodologico alle patologie multifattoriali consiste negli studi di associazione caso-controllo condotti a livello di popolazione. Tali studi sono finalizzati all'individuazione di una associazione tra una o più varianti geniche e una determinata patologia o un particolare aspetto fenotipico della stessa. Inoltre, la valutazione dell'associazione positiva tra una variante di un gene e parametri clinici potrebbe contribuire alla definizione di determinanti di outcome e del ruolo terapeutico di un determinato farmaco.

Obiettivo principale del progetto è l'individuazione di marcatori genetici o epigenetici da utilizzare come strumenti predittivi di insorgenza di determinate patologie (cardiovascolari, disabilitanti e neurologiche), determinanti di outcome e/o di risposta alla terapia per la patologia di interesse. A tale scopo si intende estendere gli studi già in corso nel laboratorio a diverse popolazioni già selezionate o in corso di reclutamento presso la BioBanca Inter-Istituzionale Multidisciplinare dell'IRCCS San Raffaele Pisana (BioBIM). I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti (patologie neurodegenerative, cardiovascolari, oncologiche, etc.) sono adeguatamente preservati nella BioBIM. Le procedure di processazione e stoccaggio dei campioni biologici sono state strutturate in base a protocolli standard di riferimento e sono diversificate a seconda dei campioni che vengono trattati. Ad ogni campione biologico sono associati i dati del donatore che comprendono: la cartella clinica, la storia familiare, l'eventuale patologia ed altri eventuali dati ritenuti di rilievo per studi specifici. La BioBIM è organizzata in modo da assicurare: la conservazione del campione per 20 anni, la qualità del campione biologico conservato, il corretto utilizzo dei campioni biologici depositati e la tutela della privacy del soggetto donatore. Le analisi molecolari degli acidi nucleici vengono effettuate mediante metodiche basate sull'amplificazione mediante PCR e sequenziamento elettroforetico automatizzato.

In collaborazione con l'Area di Scienze Neurologiche, Scienze Motorie e Sensoriali



dell'IRCCS San Raffaele Pisana è stato avviato uno studio che prevede la valutazione di polimorfismi di geni coinvolti nei meccanismi patogenetici della Migraine in circa 600 pazienti affetti da tale patologia. I campionamenti biologici di tali pazienti hanno portato alla costituzione di un settore dedicato a raccogliere in maniera specifica dati clinici e campioni biologici da pazienti affetti da emicrania afferente alla BioBIM, grazie al quale è stato possibile effettuare in 384 pazienti affetti da emicrania e 185 controlli sani la genotipizzazione della variante Met129Val del gene della proteina prionica (PRNP). I dati ottenuti suggeriscono che il polimorfismo 129VV non è un fattore di rischio diretto per l'emicrania ma è significativamente associato ad un esordio precoce della malattia, rappresentando quindi un potenziale determinante di outcome in questa patologia disabilitante. L'implementazione della BioBIM ha offerto la spinta ad implementare gli studi del gruppo per migliorare le Standard Operative Procedures in uso presso i laboratori. A questo scopo, è stato sviluppato un metodo rapido, affidabile, semplice e a basso costo, basato sul fingerprinting del DNA, da utilizzare come strumento di routine nel controllo della qualità dei campioni della BioBIM.

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cardiovascolari dell'Università La Sapienza di Roma, è stato effettuato uno studio che ha permesso di valutare un alto numero di varianti di geni codificanti per proteine implicate nel trasporto del calcio e del potassio intracellulare in 242 pazienti affetti da pregresso infarto del miocardio. E' stata osservata una correlazione tra cardiopatia ischemica con disfunzioni microvascolari e specifici polimorfismi localizzati nei geni eNOS, Kir6.2 e Nav1.5.

In relazione alle patologie oncologiche è stato effettuato lo studio mutazionale dei geni KIT e PDGFRA in 40 casi di pazienti affetti da GIST (gastro intestinal stromal tumors), patologia paradigmatica dello stretto connubio tra analisi delle varianti nucleotidiche e farmacogenetica. I risultati hanno permesso di individuare le neoplasie con resistenza primaria e secondaria al trattamento con inibitori delle tirosin chinasi.

Sempre in relazione agli studi di farmacogenomica sono stati valutati i polimorfismi C677T e A1298C del gene MTHFR su 925 pazienti che riportavano familiarità per la trombosi, frequenti interruzioni di gravidanza o affetti da infertilità idiopatica. Data l'ipotesi secondo la quale in individui eterozigoti per entrambi i polimorfismi, i livelli di omocisteina totale possono variare in base alla configurazione delle basi mutate (in trans su alleli differenti, o in cis sullo stesso allele), è stata presentata una semplice metodica basata sulla separazione allelica e sul clonaggio che consente di discriminare tra queste due possibilità.

Sono in fase di completamento studi sulla popolazione affetta da Migraine afferente alla Biobanca che prevedono ulteriori studi di associazione tra tale patologia e polimorfismi di nuovi geni quali ACE (Angiotensin I Converting Enzyme), SODs (Super Oxide Dismutase) e PGR (Progesterone Receptor).

Un ulteriore progetto in atto è imperniato sullo studio caso-controllo di popolazioni affette da diabete e cancro, al fine di stabilire una base genetica che codifichi per un pathway comune alle due patologie. Infine sono in corso ulteriori studi finalizzati alla stesura di nuove SOPs per il miglioramento della Biobanca e del laboratorio ad essa correlato.

### Laboratorio di Patologia Molecolare e Cellulare

*Espressione genica pro-infiammatoria nella progressione di tumori umani, suo ruolo nel decadimento di organi e tessuti e strategie per il suo controllo*

L'attivazione di una risposta genica infiammatoria coordinata permette alle cellule trasformate ipossiche di acquisire tutte quelle proprietà tipiche del fenotipo maligno (invasione, migrazione, homing nel sito specifico e capacità di riprodurre un tumore secondario). I dati fin qui ottenuti dimostrano che l'ambiente ipossico, in cui si trova un tumore precoce, può essere responsabile dell'espressione de novo dei recettori delle allarmine, attivando una risposta genica coordinata detta risposta riparativa infiammatoria (IRR). Questo fenomeno indurrebbe un fenotipo maligno. L'ipossia, a sua volta, induce due fenomeni: 1) necrosi delle cellule che sono più distanti dai vasi del tessuto ospite; 2) attivazione di HIF-1 con nuova espressione genica, che permette alle cellule tumorali di sopravvivere e crescere.

L'ipotesi di lavoro suggerisce che l'attivazione di una coordinata risposta genica infiammatoria in cellule ipossiche e precedentemente trasformate, permette l'acquisizione delle proprietà cellulari tipiche del fenotipo maligno.

Gli obiettivi specifici di questo progetto sono i seguenti:

- Studiare il ruolo di HIF1alfa NFkB e IRR in diversi tumori. In particolare, vengono analizzati: a) l'espressione di mRNA di 48 geni proinfiammatori (inflammocard); b) l'espressione proteica di diversi fattori pro infiammatori quali P2X7, RAGE, COX2, NOS2, SOCS1, TLR2-3-4, e MMP2; c) l'attivazione di HIF1alfa and NF-kB.
- Identificare quali allarmine/DAMPs sono più efficaci nell'indurre la IRR.
- Analizzare la possibile relazione causa/effetto tra l'upregolazione di alcuni geni IRR: a) capacità di invadere e di migrare; b) produzione di enzimi inducibili e dei loro metaboliti attivi; c) secrezione paracrina di fattori di crescita e sopravvivenza.
- Esplorare in modelli sperimentali in vitro e in vivo il meccanismo di homing specifico delle cellule di cancro attivate dall'ipossia.
- Studiare la possibilità di bloccare o rallentare la progressione tumorale inibendo NFkB e/o HIF1 in vitro e in vivo.

Linee cellulari tumorali e campioni di biopsie umane vengono sezionate (5µm) e sottoposte a laser capture microdissection (LCMD) per separare le cellule tumorali, da quelle peritumorali e da quelle del tessuto ospite normali.

Le microdissezioni ottenute dai tumori e gli estratti cellulari vengono utilizzate per analizzare: l'espressione di mRNA di 48 geni proinfiammatori (inflammocard) mediante Real-time PCR; l'espressione proteica di diversi fattori pro infiammatori quali P2X7, RAGE; l'attivazione di HIF1alfa and NF-kB mediante western blotting o ELISA su frazioni cellulari citosoliche e nucleari.

L'ipossia viene ottenuta incubando le cellule in 1%O<sub>2</sub> in una camera ipossica.

Per studiare gli effetti dell'ipossia sul guadagno di funzione delle MMPs, le linee cellulari MCF7 PC3 e BCPAP vengono trattate con estratti totali di membrane o con frazioni di essi. L'invasione cellulare è misurata mediante uno specifico kit in grado di discriminare tra cellule che invadono e cellule che non invadono.

Si valuta l'aumentata abilità di migrare associata al trattamento ipossico e la conseguente overespressione di CXCR4 sulle linee cellulari sopra descritte. Si comparano queste cellule con frazioni CS/P purificate dalla stessa linea cellulare e con CS/P puri-

ficcate da campioni chirurgici di Ca di mammella, di prostata e di tiroide. Si effettua un silenziamento dei recettori dell'allarmine e di CXCR4 da utilizzare come controllo di un'inibizione specifica. La migrazione cellulare è studiata mediante il "wound healing assay". La chiusura del taglio viene poi valutata in ipossia o normossia mediante microscopio a contrasto di fase.

E' stato dimostrato, in diverse linee cellulari sottoposte ad ipossia, l'attivazione di HIF-1alfa che, a sua volta, regola l'espressione di geni appartenenti alla risposta infiammatoria ripartiva come RAGE, P2X7, SOCS1, ecc. Questi, a loro volta, in presenza di uno stimolo necrotico attivano il pathway che innesca NFkB. In particolare, è stato dimostrato che per l'attivazione di NFkB sono particolarmente efficaci le frazioni di membrane rilasciate dalle cellule necrotiche che nelle cellule tumorali stimolano il rilascio di MMPs e la migrazione.

Riproducendo gli esperimenti descritti sopra sulle cellule staminali tumorali, è stato evidenziato come questa popolazione sia in grado di attivare la stessa risposta infiammatoria ripartiva in modo molto più efficace. Questo permette di ipotizzare che tali cellule siano quelle che si adattano e sopravvivono all'ipossia e alla necrosi presenti nel tumore primario e siano quelle che responsabili, poi della progressione del tumore.

E' stato anche osservato che le cellule tumorali stimulate da ipossia sono in grado di aderire meglio alle cellule endoteliali. Tale capacità di adesione è ulteriormente incrementata se le cellule endoteliali sono state sottoposte ad uno stimolo infiammatorio come quello di estratti necrotici o da infezione batterica.

L'inibizione farmacologica (digossina) o il silenziamento (shRNA) di HIF-1 ha permesso di inibire la migrazione, invasione e adesione delle cellule tumorali messe a contatto con cellule endoteliali.

Ci si aspetta che un danno tissutale nel tessuto bersaglio possa creare un gradiente molecolare capace di dirigere la migrazione metastatica di cellule tumorali o staminali tumorali precedentemente attivate dall'ipossia del tumore primario. In vitro ci si aspetta di osservare diversi gradi di invasione a seconda del trattamento delle cellule tumorali o delle cellule bersaglio come descritto nei metodi. Inoltre il silenziamento di alcuni recettori permetterà di capirne il ruolo primario o secondario per la progressione tumorale. In vivo ci si aspetta che le cellule tumorali attivate da ipossia o da allarmine siano in grado di invadere meglio delle cellule tumorali non trattate. Le metastasi formate dalle cellule tumorali potranno essere influenzate tramite creazione di un sito di necrosi con gradiente citochinico. In questo modo ci si aspetta di poter predire il sito in cui le metastasi si formeranno.

Da quanto sopra detto risulta chiaro che l'inibizione di HIF-1alfa e NFkB dovrebbe essere maggiormente efficace nel bloccare o ridurre la formazione di metastasi con conseguente aumento della sopravvivenza.

### *Ruolo dell'attività fisica e delle sirtuine nella prevenzione e nel rallentamento della progressione tumorale*

E' noto che l'esercizio fisico previene e riduce il rischio di sviluppare tumori come quello della mammella, del colon, nei tumori ematologici e del polmone. I meccanismi molecolari che regolano questo fenomeno sono del tutto oscuri. Una risposta a tale interrogativo potrebbe derivare dallo studio di una nuova classe di proteine, le Sirtuine, che ha un ruolo centrale nella regolazione della risposta cellulare e tissutale a stimoli di stress di varia natura.

Le Sirtuine (SIRT) comprendono 7 membri (SIRT1-SIRT7) che, tramite la loro attività

deacetilasi regolano la funzione di numerosi fattori di trascrizione, la sopravvivenza cellulare a stimoli apoptotici, necrotici e autofagici, il differenziamento cellulare, l'aging e il metabolismo del glucosio e dei lipidi.

L'ipotesi è che nelle cellule tumorali l'attivazione delle Sirtuine in seguito ad attività fisica potrebbe attivare meccanismi in grado di bloccare o rallentare la formazione e/o la progressione del tumore. Infatti recenti studi hanno evidenziato un ruolo nella formazione e nella progressione tumorale di alcune sirtuine. Altri studi effettuati in modelli murini di cancro invece hanno evidenziato un'azione anti-tumorale di SIRT-1. In questi modelli una ridotta espressione di SIRT-1 coincide con una maggiore insorgenza di tumori e viceversa. Anche per SIRT-3 è stata dimostrata un'azione pro-e anti-tumorigenica. SIRT-3 facilita i processi proapoptotici deacetilando proteine coinvolte nell'apoptosi e aumentando l'espressione di enzimi antiossidanti. Inoltre topi KO per SIRT-3 presentano una maggiore instabilità genomica e sviluppano tumori. Allo stesso tempo dati contrastanti derivanti da altri studi indicano che i livelli proteici di SIRT-3 sono aumentati nel tumore della mammella caratterizzato da linfonodi positivi. In altri studi è stata osservata una diminuzione dei livelli proteici di SIRT-3 nel tumore della mammella. Anche SIRT-5, SIRT-6 e SIRT-7 potrebbero avere un ruolo di prevenzione nell'insorgenza del cancro.

Il presente progetto si prefigge di:

- Studiare se l'esercizio fisico sia in grado di incrementare l'attività delle Sirtuine e conseguentemente di ridurre la produzione di ROS e RNS nei pazienti oncologici;
- Studiare in vivo e in vitro se l'espressione delle Sirtuine e la loro attività siano importanti per facilitare l'apoptosi nelle cellule tumorali in seguito ad attività fisica e/o trattamento con chemioterapici;
- Studiare i livelli di Sirtuine nelle biopsie tumorali dei pazienti e confrontarle con i dati dei follow-up in presenza e assenza di attività fisica.

Lo studio dell'attività delle Sirtuine e della loro espressione è effettuato su campioni di sangue ottenuti da pazienti oncologici prima e dopo (1 mese almeno) di attività fisica moderata. Tali valori sono comparati con quelli ottenuti da pazienti oncologici che non svolgono attività fisica. Ad ogni paziente è prelevato sangue periferico (3-6ml). Dall'anello linfomonocitario ottenuto da ciascun prelievo vengono estratti mRNA per analisi di real time-PCR e proteine per analisi in Western blotting delle varie Sirtuine e dei markers tumorali. Inoltre sono effettuati saggi di attività sirtuinica. I livelli di RNS e ROS sono misurati mediante saggi ELISA o citofluorimetrici con sonde specifiche.

Per gli studi in vivo topi nudi in cui sono state iniettate cellule tumorali (MDA-MB231, PC3 e BCPAP) sotto cute e nella vena caudale sono lasciati a riposo o sottoposti ad esercizio fisico (corsa su treadmill ad una velocità costante (10m/min circa) per un periodo di circa 20 minuti per una settimana). Gli animali sono successivamente sacrificati per ottenere sangue e biopsie tumorali da cui estrarre mRNA e proteine per analisi in Real Time-PCR e Western blotting. E' inoltre valutato nei due gruppi la dimensione del tumore primario e il numero delle metastasi in un periodo di tempo di 4-6 settimane. Questi valori numerici sono comparati con l'attività sirtuinica misurata nel sangue e nelle biopsie tumorali.

Per gli studi in vitro le linee cellulari MDA-MB231, PC3, BCPAP, HeLa e SW48 vengono transfettate per overesprimere o silenziare le diverse Sirtuine. I cloni ottenuti sono studiati per la loro capacità tumorigenica. Inoltre la resistenza agli stress dei vari cloni è testata trattando le cellule con specifici chemioterapici.

La valutazione della capacità metastatica è effettuata mediante misurazione dell'attività delle metalloproteasi, della capacità di migrazione e invasione mediante kit specifici della Chemicon e mediante il saggio del wound healing.

Lo studio condotto su ratti ha dimostrato che lo sforzo fisico induce un aumento dell'espressione dell'mRNA e della proteina di SIRT1 e SIRT7 nel cuore e nel muscolo scheletrico. Inoltre si è osservato un aumento dell'espressione della proteina pro-apoptotica bax e una diminuzione dell'espressione della proteina antiapoptotica bcl-2. Analisi statistiche hanno evidenziato che esiste una correlazione significativa tra l'espressione di SIRT1 e SIRT7 e quella di bax e bcl-2.

Lo studio condotto sugli atleti ha mostrato che l'espressione proteica di SIRT1 è bassa nelle cellule dell'anello linfomonocitario dei donatori e diminuisce ulteriormente negli atleti. Al contrario l'espressione proteica di SIRT3, SIRT6 e SIRT7 non mostra una differenza significativa tra controlli e atleti. Anche se sono state osservate significative differenze per l'espressione delle sirtuine, è stato misurato un significativo aumento della attività acetilasi totale negli atleti rispetto ai donatori.

Ci si aspetta che l'attività fisica nei pazienti oncologici incrementi l'espressione proteica e l'attività delle Sirtuine, che riduca la produzione di ROS e RNS, che abbassi i valori dei markers tumorali, che blocchi o rallenti l'invasione e la meta statizzazione e, in conclusione, aumenti il survival. Ci si aspetta inoltre che nelle biopsie e nel sangue le variazioni misurate per l'espressione delle Sirtuine e per la loro attività correlino con outcome positivi. In ultimo ci si aspetta che nei topi nudi l'insorgenza del tumore primario e, soprattutto, dell'invasione e delle metastasi sia rallentata dall'attività fisica e/o dall'overespressione/silenziamento di alcune Sirtuine nelle cellule tumorali iniettate.

#### *Recupero di funzione nelle miocarditi e nelle cardiomiopatie: ruolo delle sirtuine*

Lo scompenso cardiaco rappresenta nei paesi occidentali una importante causa di morbilità e mortalità (20% all'anno e fino al 50% a 4 anni). Le cause di scompenso cardiaco non ischemico sono rappresentate principalmente dalla cardiomiopatia dilatativa idiopatica e dalle miocarditi. A tutt'oggi il trattamento di tali entità è supportivo e tranne rari casi non esiste una terapia specifica in grado di interferire con la storia naturale della malattia interrompendo i meccanismi di danno dei cardiomiociti e stimolando la proliferazione e la riparazione cellulare. Il raggiungimento di tali obiettivi è ottenibile solo studiando il tessuto cardiaco di pazienti affetti da scompenso cardiaco, dove è possibile valutare i livelli di morte e proliferazione cellulare, il grado di miofibrillolisi, il livello di alterazione del metabolismo energetico cellulare, ed i pathways intracellulari che mediano l'instaurarsi ed il perpetuarsi del danno, come ad esempio l'espressione di geni e di proteine implicate nella necrosi, e nella apoptosi (Bcl2, caspasi 3) e nello stress ossidativo. Sul tessuto miocardico è inoltre possibile valutare i meccanismi di risposta al danno, in termini di attivazione di geni implicati nella riparazione cellulare e nella attivazione delle cellule staminali cardiache. Infine è possibile valutare le alterazioni della struttura e della funzione mitocondriale e il ruolo delle sirtuine, una famiglia di deacetilasi coinvolte in molteplici processi cellulari incluso il metabolismo energetico, la riparazione cellulare e la proliferazione attraverso l'attivazione delle cellule staminali. Il progetto si prefigge di:

- Studiare i meccanismi di danno irreversibile e reversibile e l'attivazione dei processi di riparazione e rigenerazione cellulare dei cardiomiociti di pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa e miocardite;
- Studiare la struttura e la funzione mitocondriale e il grado di stress ossidativo miocardico in tali pazienti;
- Studiare il ruolo delle sirtuine nel processo di danno e di recupero cellulare dopo opportuna terapia

Il progetto si propone di reclutare pazienti con le seguenti caratteristiche:

- Dilatazione e disfunzione del ventricolo sinistro (EF<40%) di età compresa tra i 18 e gli 80 anni.
- Assenza di malattia coronarica o valvolare che possa giustificare la severità della disfunzione cardiaca.
- Scompenso cardiaco cronico (da più di 6 mesi) refrattario alla terapia antiscompenso standard.

I criteri di esclusione includono: scompenso cardiaco recente (meno di 6 mesi), cause note di insufficienza cardiaca (come ipertensione arteriosa, malattiacoronaria significativa, malattia valvolare significativa, malattie endocrine, malattie renali significative, abuso di alcool o di farmaci).

I pazienti vengono reclutati in ambulatorio o nei reparti clinici di degenza o di terapia subintensiva.

I pazienti vengono sottoposti ad esami cardiologici invasivi (ECG, ecocardiogramma color Doppler con TDI) e, previo consenso informato, ad esami cardiologici invasivi, incluso il cateterismo cardiaco, la coronarografia, la ventricolografia biventricolare e la biopsia endomiocardica bi ventricolare.

Alcuni frammenti biotici vengono utilizzati per l'esame istologico con colorazioni di routine per identificare il processo patologico alla base della disfunzione cardiaca. Alcuni frammenti congelati vengono utilizzati per valutare la presenza di virus cardiotropi miocardici, in grado di causare una cardiomiopatia dilatativa virale. In pazienti affetti da miocardite virus-negativa viene intrapreso un trattamento specifico immunosoppressore e vengono eseguite biopsie di controllo dopo sei mesi di trattamento per valutare il grado di recupero cellulare.

Le biopsie endomiocardiche di base e di controllo vengono analizzate per: a) istologia, con valutazione morfometrica; b) immunoistochimica per caratterizzare e quantizzare gli infiltrati infiammatori e per analizzare l'attivazione del sistema immunitario (HLA-ABC, HLA-DR); c) valutazione della morte e della proliferazione cellulare e delle cellule staminali cardiache, d) microscopia elettronica con morfometria per valutare il contenuto miofibrillare e il numero e la struttura dei mitocondri e) profili di espressione genica di actina; alpha-MHC, beta-MHC, miR-133 per analizzare i meccanismi di riparazione miocardica e livelli di sirtuine) f) attività degli enzimi della catena respiratoria mitocondriale e dei fosfati ad alta energia (ATP, ADP, fosfocreatina).

Dai pazienti viene anche prelevato del sangue periferico da cui si ottiene un anello linfomonocitario. Estratti proteici e di mRNA sono ottenuti dalle cellule presenti nell'anello linfomonocitario per analisi di real time-PCR, di western blotting e di saggi enzimatici. In particolare l'espressione e l'attività delle sirtuine è messa in relazione alla patologia e al recupero funzionale dopo terapia nel paziente.

E' stato osservato, a seguito di biopsie endomiocardiche del ventricolo sinistro condotte su pazienti ipertesi con scompenso cardiaco a coronarie e valvole integre ed in assenza di patologie sistemiche, che la miocardite, spesso virale, è una causa dominante dello scompenso. La miocardite è stata, infatti, documentata in oltre il 60% dei 45 pazienti studiati suggerendo una particolare suscettibilità alle infezioni virali del cuore con cardiopatia ipertensiva. Nei soggetti con miocardite virus-negativa, la terapia immunosoppressiva è stata seguita da recupero funzionale e strutturale del ventricolo sinistro in oltre l'80% dei pazienti trattati. E' stata inoltre descritta una cardiomiopatia reversibile da deficit di Selenio e Zinco indotta da malassorbimento intestinale cronico. Sono stati riconosciuti i meccanismi operativi caratterizzati da un declino della riserva anti-ossidante cardiaca facente capo alla glutatione perossidasi ed alla superossido-di-

smutasi rispettivamente selenio e zinco-dipendenti, un danno ossidativo della membrane dei miociti con aumentata autofagia cellulare. E' stato riportato attraverso un'ampia casistica bioptica, che in pazienti con fenotipo clinico di cardiomiopia ipertrofica, la biopsia endomiocardica del ventricolo sinistro è in grado di identificare patologie infiltrative o da accumulo nel 18% dei 155 pazienti studiati. Tale studio ha sottolineato il limite degli strumenti non-invasivi nella diagnostica dei pazienti con ipertrofia idiopatica del ventricolo sinistro e come il riconoscimento tramite indagine bioptica della malattia di base possa cambiare il trattamento e la prognosi. Per la prima volta è stato descritto un diretto coinvolgimento muscolare in pazienti con malattia di Fabry. In rapporto all'interessamento cardiaco, il danno muscolare è più lieve e più tardivo. La causa più verosimile di tale divergenza è la differenza nella attività dei due organi con diverso consumo dell' -galattosidase A residua. Infine è stata documentata una cardiomiopia ipertrofica-ipocinetica clinicamente sovrapponibile alla malattia di Fabry dovuta a tossicità da Idrossiclorochina. Attraverso una analisi istologica, ultrastrutturale e della attività degli enzimi lisosomiali su biopsie endomiocardiche eseguite prima e dopo risoluzione della malattia, è stato evidenziato un deficit farmaco-mediato dell'alfa-galattosidasi A che porta ad un accumulo intracellulare di Gb3 simile a quello che occorre per difetto genetico nella malattia di Fabry. L'osservazione implica che in casi di tossicità cardiaca da idrossiclorochina può essere adottata l'infusione di agalsidasi, per ottenere un completo recupero del danno.

E' in atto in studio sul ruolo delle sirtuine nella riparazione del danno miocardico, nell'infiammazione cardiaca, nella morte cellulare e nell'ipertrofia cardiaca nei diversi gruppi di pazienti studiati analizzando sia nel sangue che nel miocardio l'espressione di tali proteine.

#### *Riabilitazione cardiaca: medicina riparativa nello scompenso cardiaco*

E' stato dimostrato che l'epicardio svolge due funzioni fondamentali durante lo sviluppo del cuore: secerne fattori solubili che stimolano sia la formazione dei vasi coronarici che la proliferazione e il differenziamento dei cardiomiociti e contribuisce a diverse linee cellulari del cuore, ovvero rappresenta una fonte di cellule mesenchimali multipotenti che danno origine a cellule endoteliali, muscolari lisce e cardiomiociti.

Studi recenti hanno dimostrato che anche l'epicardio adulto svolge un ruolo simile: in questo compartimento sono presenti cellule staminali residenti che partecipano al processo rigenerativo attivato dopo infarto del miocardio. Il liquido pericardico (LP) sembra avere un ruolo chiave in questo processo grazie alla presenza in esso di mediatori solubili che rappresentano potenziali regolatori in grado di stimolare la crescita dei vasi coronarici e la rigenerazione del tessuto miocardico nel cuore adulto.

Il progetto si prefigge di:

- Identificare le proteine presenti negli esosomi rilasciati nel fluido pericardico dopo infarto acuto del miocardio;
- Studiare l'espressione genica nelle cellule epicardiche dopo infarto del miocardio e in presenza di liquido pericardico;
- Studiare l'effetto della somministrazione della/e proteine individuate al primo punto nella cavità pericardica di topo.

Gli esosomi sono stati purificati dal plasma (PL) e dai fluidi pericardici (PF) di pazienti di controllo (C) e con infarto acuto del miocardio (MI). La presenza degli esosomi in questi fluidi è stata confermata mediante western blot effettuato per l'espressione di alcuni marcatori caratteristici degli esosomi quali RAB 5B e la caveolina-1.

Per caratterizzare le proteine contenute nei liquidi PFC e PFMI, è stata effettuata un'analisi proteomica mediante la quale sono state ottenute 60 e 72 proteine modulate nei PLC e PLMI rispettivamente e 69 contro 65 proteine modulate nei PFC e PFMI rispettivamente. Tra le proteine modulate nei fluidi pericardici, 45 e 42 sono state identificate esclusivamente nei PFC e PFMI rispettivamente, mentre 19 sono risultate comuni alle due classi di liquidi. Mediante analisi statistica, le proteine specifiche per i PFMI sono risultate coinvolte soprattutto nella regolazione della trascrizione di geni. Tra queste è stata trovata la SENP3, responsabile dell'attivazione di HIF1alfa e della proliferazione cellulare sotto stress ossidativo, l'integrina alfa D beta2, che lega la molecola di adesione vascolare VCAM-1 riconosciuta come un marcatore di superficie dei progenitori cardiaci e il Fattore di trascrizione A mitocondriale, che è stato dimostrato inibire il rimodellamento del ventricolo sinistro dopo infarto e quindi fornire un nuovo approccio terapeutico allo scompenso cardiaco.

Oltre a quelle appena citate, tra le proteine modulate è stata trovata anche la clasterina, proteina particolarmente interessante: è stato dimostrato che la forma secreta di questa glicoproteina protegge i cardiomiociti dalla morte (riducendo quindi la grandezza dell'infarto) e induce migrazione dei progenitori cardiaci. Inoltre, in un sistema diverso da quello cardiovascolare ovvero nelle cellule tumorali, la clasterina è stata riconosciuta essere un importante mediatore di un processo noto come EMT ovvero trasformazione epitelio-mesenchimale.

Una volta effettuata l'analisi proteomica, la presenza della clasterina negli esosomi purificati dai PFMI è stata confermata sia mediante Western Blot che mediante tecnica ELISA.

Successivamente è stata verificata l'espressione della clasterina del cuore adulto sia murino che umano. Tramite immunoistochimica è stato possibile evidenziare un segnale molto debole nel tessuto cardiaco umano sano ma estremamente forte nel tessuto ischemico. La clasterina è presente principalmente nei cardiomiociti necrotici e nei vasi, ma cellule positive sono state trovate anche nel compartimento sottoepicardico. Utilizzando la real time PCR, si è potuto confermare la presenza della clasterina anche nel cuore murino dove è presente in modo predominante nel miocardio piuttosto che nell'epicardio ma la sua espressione, dopo infarto, risulta aumentata dalla presenza del fluido pericardico solo nelle cellule epicardiche.

A questo punto ci si è domandati se la clasterina fosse coinvolta nel EMT delle cellule epicardiche in quanto questo processo risulta essere fondamentale per il differenziamento delle cellule staminali epicardiche in cardiomiociti, cellule endoteliali e cellule muscolari lisce ovvero cellule fondamentali per la rigenerazione cardiaca dopo danno. Per verificare questa ipotesi si è prima cercato di capire se i fluidi pericardici (contenenti la clasterina) fossero coinvolti in tale processo effettuando uno studio di espressione genica nelle cellule epicardiche provenienti da cuori di topo infartuati. In particolare, l'infarto del miocardio mediante legatura della coronaria discendente sinistra è stato indotto in due gruppi di topi. In un gruppo, la cavità pericardica è stata aperta poco prima della legatura (e quindi l'infarto è stato eseguito in assenza del fluido pericardico) mentre nell'altro gruppo la cavità è stata mantenuta chiusa (e quindi l'infarto è stato effettuato in presenza del fluido pericardico). Tutti gli animali sono stati sacrificati a tre giorni dal danno e le cellule epicardiche sono state isolate per effettuare uno studio di espressione genica successivamente convalidato mediante real time PCR. Considerando 84 geni coinvolti nell'EMT, è stato verificato che tale processo fosse presente e attivato nelle nostre condizioni sperimentali ovvero se e quanti di questi geni fossero modulati. I risultati hanno evidenziato che, dopo infarto del miocardio, solo in presenza



di fluido pericardico si ha un'attivazione statisticamente significativa dell'EMT. In particolare sono stati trovati modulati dal fluido pericardico marcatori del EMT durante l'embriogenesi quali SNAI1, SNAI2 e TWIST1.

Per verificare se le cellule staminali epicardiche ckit+ fossero coinvolte in questo processo, sono stati effettuati studi in vitro. Cellule epicardiche umane ckit+ sono state messe in coltura in condizioni ipossiche per tre giorni in presenza di PFC e PFMI. L'analisi mediante real time PCR ha mostrato un'aumentata espressione in queste cellule dei geni SNAI1 e SNAI2 in presenza di PFMI.

Infine, esperimenti in vivo sono stati condotti per dimostrare il potenziale coinvolgimento della clusterina nell'EMT delle cellule epicardiche: la proteina ricombinante murina è stata iniettata nel sacco pericardico di topi in assenza di danno. Una settimana dopo l'operazione, mediante immunofluorescenza, è stato trovato un aumentato numero di cellule epicardiche esprimenti la alfa SMA, riconosciuto marcatore dell'EMT, in seguito a trattamento con la clusterina.

I risultati degli esperimenti effettuati per l'identificazione delle proteine rilasciate negli esosomi presenti nei PFMI hanno dimostrato la presenza in queste nanovesicole di diverse molecole coinvolte nelle patologie cardiovascolari tra cui la clusterina. Questa proteina era già nota essere protettiva nei confronti dei cardiomiociti dopo danno e in grado di promuovere la migrazione di progenitori cardiaci ma soprattutto essere coinvolta nell'EMT delle cellule tumorali. Prima di verificare se la clusterina fosse coinvolta anche nell'EMT delle cellule epicardiche, mediante studi di espressione genica è stato dimostrato che l'EMT è un processo che avviene in queste cellule dopo infarto, ma risulta attivato solo quando il danno viene effettuato in presenza del fluido pericardico. Infatti sono stati trovati modulati dal fluido pericardico numerosi geni coinvolti nell'EMT che sono stati validati anche mediante real time PCR. Successivamente, ricorrendo a studi in vitro, è stato dimostrato che l'EMT riguarda non solo le cellule epicardiche in generale ma anche le cellule staminali epicardiche ckit+ in particolare come evidenziato mediante aumentata espressione di due geni fondamentali per l'EMT quali SNAI1 e SNAI2.

Infine, si voleva comprendere se la clusterina, presente nei fluidi pericardici dopo infarto, fosse coinvolta nel EMT. A tal fine sono stati effettuati studi in vivo in cui la proteina ricombinante è stata somministrata nel sacco pericardico di topi in assenza di infarto e mediante immunofluorescenza si è potuto dimostrare un aumento nel numero di cellule epicardiche esprimenti un marcatore del EMT quale la alfa SMA dopo trattamento con la clusterina.

Sulla base dei risultati ottenuti, ci si propone di effettuare esperimenti per valutare se la clusterina oltre a promuovere l'EMT delle cellule epicardiche (processo fondamentale per il differenziamento delle cellule epicardiche nelle tre linee cellulari cardiache principali) sia anche in grado proteggere i cardiomiociti dalla morte cellulare e indurre angiogenesi. E' stato infatti già dimostrato che questa proteina ha un'azione antiapoptotica mentre nulla si sa circa una sua potenziale azione sui vasi.

Inoltre la somministrazione della clusterina in vivo potrebbe avere un effetto sulla funzionalità cardiaca dopo induzione dell'infarto per cui ci si propone di effettuare studi funzionali sia mediante ecocardiografia che emodinamica. Gli studi ecocardiografici (a differenza di quelli emodinamici che possono essere eseguiti una sola volta poco prima del sacrificio) potranno essere ripetuti nei topi consci a diversi intervalli di tempo dall'infarto e questo permetterà di valutare la funzionalità cardiaca nel tempo.

## Laboratorio di Biochimica dell'Invecchiamento

### *Identificazione di marcatori biologici di malattia o di risposta alle terapie in pazienti affetti da Parkinson*

Analisi condotte su cervelli post-mortem di pazienti con malattia di Parkinson (PD) hanno dimostrato un calo significativo dell'espressione di PGC-1alpha e, attraverso studi in vitro, è stato dimostrato che questo evento è responsabile dell'alterazione dell'omeostasi mitocondriale. E' noto che l'Adipose triglyceride lipase (ATGL) svolge un ruolo fondamentale nel mantenere la funzione mitocondriale attraverso la segnalazione lipidica. Inoltre, la letteratura dimostra un dismetabolismo lipidico nel PD e la partecipazione di alcune proteine mutate nel PD (alpha-sinucleina e parkina) nella regolazione del metabolismo lipidico. ATGL è notoriamente espressa nel muscolo scheletrico a livello dei miociti. Recentemente, la sua espressione è stata riportata nel cervello nelle cellule della glia adiacenti alla barriera ematoencefalica. La sua ablazione porta a un sostanziale accumulo di trigliceridi nel cervello, indicando un ruolo di ATGL nel rifornire le cellule neuronali di acidi grassi. Dati preliminari di studi del laboratorio indicano la presenza di ATGL in cellule di origine neuronale (neuroblastoma), lasciando ipotizzare la sua presenza anche nei neuroni. Tutte queste evidenze indicano che un calo di attività di ATGL nel PD possa concorrere all'instaurarsi o alla progressione della patologia. In particolare, la mancata attività di ATGL, potrebbe portare a livello neuronale all'alterazione della massa e della funzionalità mitocondriale e determinare un accumulo di trigliceridi intracellulare. Questa situazione potrebbe verificarsi anche nel muscolo scheletrico con conseguente impatto negativo sull'attività motoria del paziente. Inoltre, è stato dimostrato come l'espressione di ATGL sia un meccanismo redox-mediato e dipendente dall'aumento della produzione di ROS a livello mitocondriale.

Dai risultati ottenuti emerge che ATGL e PGC-1alpha svolgono un ruolo sinergico nell'omeostasi bioenergetica, pertanto gli obiettivi specifici della ricerca sono stati:

- 1) Validare l'efficienza dei processi osservati nel PD. Si è studiato l'asse ROS/ATGL/PGC-1alpha in cellule adipose. In particolare, si è dimostrato che i livelli di mRNA e proteici di ATGL e PGC-1alpha sono modulati da una segnalazione ROS-dipendente. Tale segnalazione porta ad un aumento dell'attività lipolitica intracellulare e del rate ossidativo mitocondriale.
- 2) Suggestire approcci nutrizionali e farmacologici innovativi per la prevenzione ed il trattamento del PD. E' stato dimostrato che un regime nutrizionale di carenza di nutrienti o il trattamento con metformina (farmaco che mima la restrizione calorica) nel tessuto adiposo è in grado di modulare l'asse di segnalazione descritto nel punto 1. Si è verificato che tali approcci nutrizionali/farmacologici che inducono ATGL preven- gono i processi di morte cellulare ed infiammazione comunemente riscontrati nel PD, attraverso il mantenimento dell'omeostasi energetica.

Sono stati utilizzati preadipociti (3T3-L1) e mioblasti murini (C2C12) sottoposti a differenziamento mediante protocolli standard suggeriti dall'ATCC. Le cellule sono state trattate con metformina alla concentrazione di 10 uM. Alternativamente le cellule sono state sottoposte a deprivazione di nutrienti mediante incubazione in HBSS supplementato con amminoacidi non essenziali.

Sono state effettuate trasfezioni con Nucleofector 4D® per la modulazione dell'espressione di ATGL e PGC-1alpha.

Topi C57BL/6 WT, topi KO per ATGL. I topi sono stati sottoposti ad un regime di digiuno (16 h) o trattati con metformina (400 mg/Kg per 10 gg).

Sono stati effettuati saggi biochimici: trigliceridi, glicerolo, enzimi della beta-ossidazione, ATP, consumo di ossigeno. Analisi delle proteine: BN-PAGE, co-IP, Western blot. Biologia molecolare: RT-qPCR, ChIP. Biologia cellulare: microscopia confocale, citofluorimetria. Analisi istologiche.

E' stato dimostrato che un ridotto apporto di nutrienti nell'adipocita innesca dei processi adattativi di sopravvivenza ROS-mediati. In particolare, si è dimostrato che l'assenza di nutrienti provoca l'induzione dell'enzima mitocondriale prolina deidrogenasi che, catalizzando l'ossidazione della prolina, produce ROS. Tali ROS attivano una cascata segnalatoria che prevede la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione FoxO1 ed una sua aumentata attività di legame sui promotori dei geni codificanti per le lipasi ATGL e lipasi lisosomiale acida (LIPA). In particolare, ATGL è un enzima localizzato sulle gocce lipidiche ed essenziale nell'idrolisi dei trigliceridi. LIPA è un enzima lisosomiale implicato nella demolizione delle gocce lipidiche attraverso il processo autofagico (lipofagia). La concomitante attivazione della lipolisi citoplasmatica e lisosomiale promuove un efficiente aumento del rilascio di acidi grassi con conseguente incremento del rate ossidativo mitocondriale, prevenendo la morte ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie da parte dell'adipocita. I dati ottenuti suggeriscono che un deficit dell'attività di ATGL e/o di LIPA può essere implicato nei processi infiammatori età-correlati. Infatti, topi giovani ATGL KO presentano un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie nel tessuto adiposo viscerale comparabile a quella riscontrata in topi vecchi. E' stato infine dimostrato che la metformina, farmaco generalmente utilizzato nel trattamento del diabete di tipo 2, favorisce un aumento dei processi lipofagici e della funzione mitocondriale nell'adipocita suggerendo un suo possibile impiego per contrastare prevenire il danno mitocondriale comunemente riscontrato nel PD.

## **Laboratorio di Patologie cronico-degenerative**

### *Identificazione di biomarcatori diagnostici e prognostici delle infezioni respiratorie nell'anziano*

Tra le malattie infettive che colpiscono gli anziani, le infezioni respiratorie rappresentano una delle cause più importanti di morte. In particolare, negli ultimi anni si è osservato un aumento del numero di morti dovuti a polmoniti da agenti patogeni (virus, batteri, miceti) in individui di età superiore ai 65 anni. I dati forniti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stimano che attualmente centinaia di milioni di persone soffrono di malattie respiratorie croniche: circa 300 milioni per l'asma; 80 milioni con broncopatia cronico ostruttiva (BPCO) di grado moderato o grave; altri milioni soffrono le conseguenze di BPCO lievi, riniti allergiche e altre patologie respiratorie croniche.

L'unico modo per conciliare un'ottimale assistenza sanitaria ai malati ed una spesa pubblica sostenibile è prevenire le malattie respiratorie, assicurare una diagnosi precoce, con strumenti standardizzati cui seguano terapie tempestive e appropriate, in grado di prevenire o ritardare l'invalidità. Un effetto sistemico della BPCO è lo stress ossidativo. In condizioni fisiologiche, l'ambiente intracellulare è mantenuto in uno stato riducente grazie a diverse molecole con funzioni specifiche, tra cui glutatione, superossido-dismutasi, tioredoxina, catalasi ecc. L'invecchiamento è definito come un processo mediante il quale si ha una progressiva perdita nel tempo delle funzioni fisiologiche che culmina con la morte dell'organismo. Le cause di questo declino sono ancora sconosciute, ma negli ultimi anni è stato ipotizzato che i cambiamenti fisiologici osservati durante la

senescenza provenienti dall'effetto deleterio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), prodotte durante il metabolismo cellulare, potrebbero essere la principale causa dell'invecchiamento. Inoltre, in uno studio condotto in pazienti di età compresa tra 19 e 85 anni è stato evidenziato che mentre nel periodo iniziale di vita i livelli plasmatici di GSH sono costanti, dai 45 anni in poi tali livelli diminuiscono e l'organismo non riesce a contrastare la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), tale per cui l'organismo va incontro a stress ossidativo (Rebrin, 2008). Fisiologicamente, i ROS possono essere prodotti principalmente dai mitocondri e dalle NADPHossidasi (NADPH ox) e sono i principali regolatori delle risposte cellulari, della difesa contro diversi patogeni e della senescenza cellulare attraverso la regolazione delle protein chinasi e fattori di trascrizione redox sensibili. Tra questi ultimi, Nrf2 gioca un ruolo chiave nella regolazione dell'espressione di numerosi geni antiossidanti, inclusi quelli relativi al glutatione (GSH). Questo è apparso essere fondamentale in malattie respiratorie, dove i livelli di Nrf2 diminuiscono nel tessuto polmonare dovuto alla perdita di DJ-1, una proteina che stabilizza Nrf2 impedendone la dissociazione dalla subunità regolatoria Keap-1. Inoltre, Nrf2 appare importante anche nel controllo del contenuto di GSH attraverso la regolazione dell'espressione di Mrp1, proteina che esporta il GSH, i cui livelli sono fortemente diminuiti in assenza di Nrf2.

La capacità dei ROS di modificare reversibilmente le cisteine di alcune proteine e di tioli a basso peso molecolare (es. GSH), rende queste specie capaci di governare eventi fisiologici come, ad esempio, la transizione tra crescita/differenziamento e stato di senescenza (Sohal et al., 1986; 1990). Numerose evidenze dimostrano che tra i processi cellulari indotti dallo stress ossidativo, il processo apoptotico gioca un ruolo centrale nella produzione di ROS e/o nell'alterazione dello status di GSH, due fenomeni sempre associati con eventi apoptotici del pathway intrinseco dei mitocondri. Il glutatione, pur se implicato in differenti vie metaboliche, rappresenta la molecola antiossidante non enzimatica più abbondante della cellula regolandone efficientemente l'omeostasi redox in base al rapporto tra la sua forma ridotta (GSH) e ossidata a disolfuro intramolecolare (GSSG) o a disolfuro misto con proteine (GS-prot) (Bass R, 2004).

Bisogna considerare la stretta correlazione tra infezione virale e stato ossido-reduttivo intracellulare (Nencioni L, 2003, Ciriolo MR, 1997, Palamara AT, 1996), in quanto lo stato fisiologico cellulare è un ulteriore fattore che può influenzare la suscettibilità all'infezione virale. Il gruppo di ricerca, infatti, ha dimostrato che la replicazione del virus influenzale è inversamente proporzionale ai livelli di GSH intracellulare (Nencioni, 2003). In particolare, le cellule con minor contenuto intracellulare di GSH, come ad esempio MDCK (epiteliali) e NCI (polmonari), sono più suscettibili all'infezione rispetto a cellule SH-SY5Y (neurali) e U937 (monociti) che possiedono elevati livelli di GSH e dove la produzione di particelle virali nel tempo è quasi assente. Inoltre, nelle cellule MDCK e NCI il virus è in grado di indurre uno stress pro-ossidativo mediante deplezione di GSH.

Durante l'infezione da parte di alcuni virus, tra cui quelli influenzali, si verifica un netto calo delle difese antiossidanti nelle cellule infettate. In particolare, è stato osservato che l'infezione da parte di alcuni ceppi influenzali e parainflenzali determina la risposta fagocitica dei macrofagi polmonari, l'attivazione dei monociti e dei leucociti polimorfonucleati che portano all'aumento dei ROS (Petherans E, 1987, Oda T, 1989). È stato anche dimostrato come il calo di GSH, tra le molecole antiossidanti a livello cellulare plasmatico, e nelle secrezioni bronchiali, giochi un ruolo determinante nell'infezione da parte di HIV, HSV-1 e Sendai (Elbim C, 1999). Nel caso delle infezioni virali, quindi, uno squilibrio generalizzato dello stato redox può essere dovuto sia alla deplezione del GSH che ad una aumentata produzione di ROS. Tale stress ossidativo potrebbe in qualche

modo influenzare la replicazione virale e la risposta infiammatoria mediante l'attivazione di pathway redox-sensibili come ad esempio l'attivazione delle chinasi e dei fattori di trascrizione. È noto, inoltre, che lo stress ossidativo cronico, una principale caratteristica dell'invecchiamento, risulta in un accumulo di proteine non correttamente foldate accompagnato da un sovraccarico del reticolo endoplasmatico (RE) (stress del RE) dovuto sia dalla diretta ossidazione di ossidoreduttasi (es. PDI) che si accumulano con l'età da parte dei ROS che dalla indiretta diminuzione dell'attività di alcune chaperonine (es. ERp55, ERp57, ERp72). Glicoproteine virali ricche in disolfidi, come ad esempio l'emoagglutinina (HA) sfrutta queste ossidoreduttasi e chaperonine per il proprio processo di maturazione. Inoltre, è stato dimostrato che il GSH agisce da antagonista nei confronti della ossidoreduttasi Ero1, limitando la formazione del legame disulfidico nel RE. Tutt'oggi non esistono studi che delineano il ruolo dello stress del RE nell'infezione virale o durante la senescenza.

Da dati in letteratura è già dimostrato che alcune proteine sono indice di specifiche infezioni microbiche. Fin dal 1992 è noto che la procalcitonina (PCT) può essere utilizzata come parametro diagnostico per le infezioni batteriche. Inoltre, si è osservato che la concentrazione plasmatica di PCT aumenta nelle forme acute di malaria e nelle infezioni fungine.

Kaharu e collaboratori (2010) hanno dimostrato che la presenza di IP-10 nel Lavaggio Bronco-Alveolare (BAL) è indice di infezione virale. Inoltre, Jennifer e collaboratori, (2010) hanno rilevato la presenza della proteina IP-10 nel siero di pazienti affetti da infezione respiratoria dove risultava essere un indicatore di infezione dovuta a Rinovirus. Considerando i fattori finora esaminati è possibile ipotizzare che tali meccanismi molecolari possano assumere un ruolo centrale nella suscettibilità e nella patogenesi delle malattie respiratorie nell'uomo e possano contribuire alla cronicizzazione dell'infezione, fenomeno riscontrato nell'anziano.

Gli obiettivi principali dello studio consistono nell'identificazione, in pazienti anziani affetti da infezioni respiratorie, di biomarcatori diagnostici e prognostici che consentano di identificare tempestivamente gli agenti eziologici della malattia ed evidenziare, allo stesso tempo, fattori di rischio che possano fornire una indicazione della severità della patologia. Nel corso del progetto si cercherà inoltre, di definire le basi molecolari di una possibile correlazione funzionale tra lo stato redox intracellulare, la suscettibilità e l'andamento delle infezioni respiratorie durante l'invecchiamento.

Gli obiettivi principali dello studio consistono nell'identificazione, in pazienti anziani affetti da infezioni respiratorie, di biomarcatori diagnostici e prognostici che consentano di identificare tempestivamente gli agenti eziologici della malattia ed evidenziare, allo stesso tempo, fattori di rischio che possano fornire una indicazione della severità della patologia. Inoltre nel corso del primo anno si è cercato di definire le basi molecolari di una possibile correlazione funzionale tra lo stato redox intracellulare, la suscettibilità e l'andamento delle infezioni respiratorie durante l'invecchiamento, utilizzando modelli sperimentali di infezioni in vitro, ovvero Mef sperimentalmente invecchiate.

Nel corso dello studio è stato utilizzato come modello in vitro le Mef isolate da embrioni di topi Balb/c. Queste cellule sono state utilizzate sia allo stato replicativo che di senescenza (raggiunto dopo 5-6 passaggi in coltura). Lo stato di senescenza è stato valutato mediante analisi istochimica della beta-galattosidasi o mediante l'analisi citofluorimetrica della D-galattopiranoside.

Le cellule senescenti e non sono state infettate con diversi ceppi di virus influenzale A/PR8/H1N1, a diverse molteplicità di infezione (m.o.i.) in terreno RPMI-1640 in assenza di siero. Successivamente, il virus non assorbito è stato rimosso mediante lavaggi con PBS

e le cellule incubate con terreno contenente il 2% di siero per i diversi tempi di infezione. L'infezione delle cellule è stata valutata misurando le particelle virali nei sovranatanti cellulari mediante metodiche standard (saggio dell'emoagglutinazione, delle placche e Real-Time PCR).

Il primo anno del progetto è stato dedicato alla messa a punto della metodica di induzione della senescenza in cellule Mef. gli esperimenti sono stati eseguiti in Mef rese senescenti mediante 4-5 passaggi di mantenimento e infettate con il ceppo di virus influenzale A/PR8/H1N1, a diverse molteplicità di infezione (moi) (0.1-1-5-10). Dagli esperimenti effettuati si evince che le MEF indotte in senescenza sono più suscettibili all'infezione virale e che attivano diverse MAPK andando maggiormente incontro ad apoptosi.

Sulla base dei risultati ottenuti, si intende:

1. identificare in pazienti anziani affetti da infezioni respiratorie, biomarcatori diagnostici e prognostici capaci di identificare il/gli agente/i patogeno/i responsabile/i dell'infezione e marcatori indicativi dell'eventuale progressione della malattia;
2. identificare in modelli sperimentali in vitro i principali pathway cellulari attivati durante le infezioni croniche e responsabili dell'infiammazione. Particolare riguardo sarà dato ai pathway cellulari redox sensibili in corso di infezioni respiratorie;
3. stabilire l'eventuale correlazione tra l'andamento dell'infezione ed eventuali alterazioni dello stato redox che si stabiliscono in soggetti anziani. In particolare saranno valutati i cambiamenti dello stato redox intracellulare e l'effetto della modulazione chimica del contenuto di GSH durante l'infezione;
4. definire il ruolo dello stato redox intracellulare nella cinetica di attivazione dei pathway suddetti in Mef sperimentalmente invecchiate e Mef giovani. In particolare, saranno valutati il possibile coinvolgimento dello stress del RE, osservato durante l'invecchiamento, nel favorire la maturazione delle glicoproteine virali e l'attivazione delle proteine MAP chinasi e Nrf2.

### LINEA 3

Sviluppo di sistemi innovativi per il monitoraggio ed il controllo della risposta al trattamento riabilitativo.

## AREA DI RICERCA APPROCCI DI SISTEMA E MALATTIE NON TRASMISSIBILI

*Validazione di biomarcatori molecolari di danno cromosomico e di suscettibilità genetica come predittori di malattia, di sopravvivenza e di efficacia nel trattamento riabilitativo*

La misurazione del micronucleo (MN) frequenza nei linfociti del sangue periferico e nelle cellule esfoliate è una tecnica ampiamente utilizzata in epidemiologia molecolare e citogenetica per valutare la presenza e l'entità del danno cromosomico in popolazioni umane esposte ad agenti genotossici o con un profilo genetico di suscettibilità'. I MN si formano da frammenti di cromosoma o da cromosomi interi che non rimangono inclusi nei nuclei figli durante la divisione nucleare. La formazione di MN nelle cellule in divisione è il risultato di rotture cromosomiche dovute a lesioni del DNA non riparate o mal riparate, o di una segregazione anomala dei cromosomi a causa di un malfunzionamento mitotico. Tutti questi eventi possono provocare la formazione di MN, un'alterata espressione dei geni o aneuploidia. Tali effetti sono associati al fenotipo di instabilità cromosomica spesso osservato nel cancro (Bonassi et al., 2007). La maggior parte di queste evidenze nasce dallo studio della formazione di MN nei linfociti, ma la stretta associazione tra questo endpoint e lo stesso evento studiato in cellule esfoliate, permette di applicare gli stessi modelli di entrambe le condizioni.

Lo studio viene condotto per valutare l'ipotesi che la frequenza di MN in cellule esfoliate della mucosa buccale sia predittiva del rischio di cancro. L'ipotesi in studio viene testata tramite la conduzione di uno studio di coorte storico. La definizione della coorte è ottenuta tramite l'avvio di progetti collaborativi internazionali che permettono il raggiungimento delle dimensioni necessarie.

Circa 50 laboratori coinvolti attivamente nella prima parte del progetto HUMNxl sono stati invitati a contribuire con individui da inserire nello studio di coorte, in attesa di verificare la disponibilità di dati che permettano l'identificazione personale, e che venga verificata l'esistenza di un collegamento con i registri tumore a livello locale o nazionale. Una dimensione arbitrariamente scelta di almeno 50 soggetti analizzati nello stesso laboratorio (anche in diversi studi) e' stata identificata come requisito minimo del contributo di ogni laboratorio per essere incluso nella coorte. Una descrizione dettagliata del protocollo, utilizzato per la misurazione della frequenza di MN in cellule esfoliate della mucosa boccale, è stata raccolta per ciascun laboratorio, contribuendo a costituire un database che sarà prossimamente valutato dal comitato direttivo HUMNxl per valutare la conformità con la metodologia standard. Solo frequenze di MN basate sulla lettura di almeno 1000 cellule sono state prese in considerazione per l'inserimento nella coorte. I soggetti candidati per l'inclusione sono selezionati da studi ad hoc o di sorveglianza, oppure sono stati inseriti negli studi come popolazione di controllo non esposta.

Tutti i soggetti inclusi nella coorte HUMNxl vengono classificati in base ad un codice valido di identificazione personale, devono avere almeno 15 anni, e devono essere liberi da cancro al momento del test citogenetico. Il protocollo dello studio è stato approvato dai comitati etici dell'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma e dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova, che si occupa dell'analisi statistica dei dati.

Una volta completata la coorte, l'effetto della instabilità genetica sull'incidenza del cancro è valutata confrontando i tassi di incidenza del cancro con la frequenza di MN, dopo aggiustamento per gli effetti confondenti di età, sesso, abitudine al fumo ed esposizione professionale ad agenti cancerogeni o mutageni. I software statistici utilizzati per la creazione e gestione della coorte sono stati, Excel, Access, SPSS e STATA.

Nel corso del 2013 sono stati avviati o consolidati i contatti con i centri invitati a con-



tribuire dati alla coorte. Questa fase ha generato una criticità per il progetto in quanto molti laboratori non sono stati in grado di fornire dati completi dei determinanti demografici, oppure non erano in grado di effettuare il Follow-up. Per questo motivo la durata del progetto è stata estesa di un anno, ed anche finanziamenti già assegnati sono stati posticipati.

Nel corso del 2014 si prevede di raggiungere una dimensione sufficiente allo svolgimento dell'analisi statistica della coorte, associando la frequenza di MN riscontrata all'incidenza/mortalità per tumore. Per consentire questa fase, il database pooled sarà arricchito di nuovi laboratori, in particolare sono in corso le trattative per l'ingresso del laboratorio CSIRO di Adelaide, Australia, in possesso di una casistica di oltre mille soggetti. Verrà quindi richiesta l'approvazione di tutti i comitati etici nazionali. Verranno inoltre avviati i contatti con i registri tumore locali per organizzare il linkage.

### *Caratterizzazione fenotipica dei deficit cognitivi e delle alterazioni metaboliche nei disturbi del neurosviluppo in età evolutiva e confronti con le psicosi in età adulta*

Le gravi psicosi sia dell'età evolutiva (autismo) che di quella adulta (schizofrenia) presentano delle sovrapposizioni fenomenologiche, sia a livello fenotipico (deficit cognitivo) che nei possibili modelli fisiopatologici (deficit di connettività neurale). Pertanto appare utile studiare entrambe le patologie sia da un punto di vista genetico che da quello della ricerca di biomarcatori periferici, al fine di effettuare una diagnosi sempre più precoce e di individuare nuovi bersagli terapeutici.

Lo studio si prefigge di indagare il contributo della configurazione genetica alla patogenesi dell'autismo e della schizofrenia con particolare riferimento alle abilità cognitive. Si prefigge inoltre di individuare i possibili biomarcatori periferici sia nell'autismo che nella schizofrenia, utili sia per una diagnosi precoce che per una personalizzazione del trattamento.

Vengono effettuate revisioni sistematiche e meta-analisi sul ruolo del danno ossidativo nell'autismo. Viene effettuata l'analisi sul genoma di soggetti autistici e confronto con controlli sani; analisi di metaboliti periferici in autistici e controlli. Viene effettuato: il reclutamento dei pazienti affetti da schizofrenia dopo consenso informato, la raccolta di campioni ematici e di informazioni clinico-demografiche, l'estrazione e l'analisi del DNA, il sequenziamento genomico e l'analisi di eventuali relazioni con le caratteristiche cliniche.

Nel corso del 2013 sono stati reclutati 145 pazienti schizofrenici. Per ciascun paziente è stato ottenuto un campione di sangue che è stato aliquotato e conservato a -80 C°; da una di queste aliquote per ogni paziente è stato estratto il DNA. Inoltre tutti i pazienti sono stati caratterizzati secondo un approccio multidimensionale che prevede la raccolta di informazioni socio-demografiche, anamnestiche e sintomatologiche, con particolare riferimento alla funzionalità cognitiva.

Sono state realizzate collaborazioni con università a livello nazionale ed internazionale:

- Istituto di Psichiatria dell'Università di Bologna e Dipartimento di Neuroscienze dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri di Milano. Nello specifico, sono state inviate, in forma anonimizzata aliquote di DNA di pazienti con psicosi schizofrenica corredate, sempre in forma anonimizzata, da informazioni clinico-epidemiologiche; ciò allo scopo di effettuare una genotipizzazione relativa ad alcuni geni candidati e ad individuare eventuali relazioni con dimensioni sintomatologiche e funzionalità cognitiva. I campioni di DNA di pazienti schizofrenici entrano in un pool internazionale di campioni che vengono analizzati tramite PsychChip, una nuo-

va piattaforma per analisi genome-wide sviluppata da Illumina in collaborazione con Psychiatric Genetics Consortium (PGC). PsychChip è disegnato per individuare le varianti genetiche sia rare che comuni, specifiche per la genetica psichiatrica.

- Laboratorio del Department of Psychiatry and Human Behaviour della University of California, Irvine, CA-USA. Nello specifico, sono state inviate, in forma anonimizzata, aliquote di DNA di pazienti con psicosi schizofrenica; questi campioni sono stati avviati alla genotipizzazione per mezzo della Illumina Express platform.

Sono state condotte revisioni sistematiche di letteratura e meta-analisi sul danno ossidativo nell'autismo infantile, con pubblicazione su riviste internazionali.

Sono state condotte revisioni sistematiche di letteratura su biomarcatori periferici nella schizofrenia (proteina S100B nel siero).

Sono state condotte analisi di letteratura al fine di individuare nuove ipotesi di indagine molecolare sulla schizofrenia in prospettiva di disturbo del neuro-sviluppo, in particolare sui micro-RNA.

Nel corso del 2014 proseguirà il reclutamento pazienti anche tramite l'avvio di nuove collaborazioni con Enti di ricerca; inoltre si provvederà ad elaborare i dati delle analisi genetiche ed alla diffusione dei risultati tramite pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

*Nuovi paradigmi per la prevenzione, la diagnosi ed il trattamento del paziente complesso. Un approccio di sistema per l'identificazione di modelli clinico-gestionali*

Le malattie croniche rappresentano il principale problema di salute pubblica nei paesi occidentali, oltre a minarne a fondo la sostenibilità dei sistemi sanitari. Le statistiche di mortalità proporzionale evidenziano come le Malattie non trasmissibili (NCD) siano responsabili del 92% di tutte le morti nel nostro paese, con una maggior rilevanza delle patologie cardiovascolari (41%) e dei tumori (28%) (WHO, 2011). I rapidi miglioramenti nella capacità di cura delle patologie croniche, associati alla variazione di alcune condizioni sociali e demografiche quali il rapido invecchiamento della popolazione, fanno sì che con sempre maggior frequenza più patologie croniche vengano diagnosticate nello stesso individuo, particolarmente se anziano, inducendo un quadro di multimorbilità. Tale modalità di occorrenza delle patologie è presente in un terzo della popolazione adulta e la sua prevalenza aumenta con l'età, raggiungendo una prevalenza del 60% tra gli individui di età compresa tra 55 e 74 anni. La multimorbilità è associata in modo significativo ad incrementi della mortalità e della disabilità, al declino dello stato funzionale e ad una più bassa qualità di vita. Questi quadri di complessità clinica provocano un deciso aumento del carico assistenziale, un maggiore utilizzo dei servizi sanitari e in conclusione un incremento della spesa sanitaria.

L'approccio clinico al paziente complesso prospettato da questo approccio è necessariamente focalizzato sulla multimorbilità e patient centered, in cui ciascun paziente è valutato nella sua globalità, compresi gli aspetti psico-sociali e molecolari. La capacità di valutare l'efficacia dei trattamenti in pazienti complessi è ancora nella fase iniziale e alcuni obiettivi specifici vengono identificati. Fra questi, a) la determinazione di patterns di condizioni morbose coesistenti e valutare le connessioni fisiopatologiche tra i vari disturbi; b) una più facile inclusione di pazienti con comorbilità negli studi clinici, utilizzando appropriate strategie analitiche per comprenderne la variabilità individuale e l'eterogeneità degli effetti del trattamento; c) l'identificazione di nuovi modelli fenotipici che tengano in considerazione la complessità dei quadri patologici e che vadano al di là della semplice definizione categoriale delle patologie.

Il progetto utilizza il framework organizzativo della piattaforma San Raffaele di Systems Medicine. Il piano a lungo termine prevede l'inserimento di tutti i pazienti complessi ricoverati nelle strutture partecipanti del network San Raffaele e dei reparti delle strutture esterne nel progetto. E' stato avviato uno studio pilota che valuta la fattibilità delle procedure di raccolta informazioni cliniche e campioni biologici (sangue, urine, BAL). I dati raccolti vengono organizzati in un database relazionale che permette l'estrazione di informazioni in modo organico, mentre i campioni biologici dopo essere stati aliquotati vengono depositati nei frigoriferi dell'area.

Il sistema di raccolta delle informazioni cliniche e di raccolta dei campioni biologici messo a punto negli anni precedenti e testato con pazienti affetti da Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva viene esteso progressivamente, introducendo anche soggetti affetti da altre malattie croniche (malattie cardiovascolari, neurologiche e psichiatriche, diabete). Parallelamente viene sviluppato un database relazionale in grado di permettere un'estrazione guidata dei dati relativi ai pazienti complessi inseriti in piattaforma. La disponibilità di un sistema di raccolta e organizzazione dei dati e dei campioni permette l'avvio di collaborazioni scientifiche nei settori che non sono coperti da expertise interne al San Raffaele. In particolare la disponibilità di campioni annotati permette di consolidare collaborazioni con laboratori esperti nei vari settori delle tecnologie ad high-throughput, e con i laboratori attivi nel campo della modellistica e della network analysis, i quali permettono la gestione di una informazione ad alta complessità quale quella raccolta dalla piattaforma. L'inserimento previsto di casi completi di informazioni cliniche e di campioni biologici è di 4 pazienti per settimana.

#### *Impatto delle procedure riabilitative su nuovi indicatori di infiammazione cronica nella broncopneumopatia cronica ostruttiva*

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) colpisce il 10% della popolazione generale e si associa ad una significativa morbilità e mortalità, in parte attribuibile ad un'aumentata incidenza di carcinoma del polmone. La ricerca scientifica di settore è dedicata all'approfondimento delle attuali conoscenze in merito ai fattori di progressione della BPCO in carcinoma polmonare. Lo studio dei complessi meccanismi molecolari del processo flogistico potrebbe condurre all'individuazione di biomarcatori di progressione neoplastica e all'ideazione di strategie terapeutiche finalizzate ad intervenire specificamente all'interfaccia tra BPCO e cancro.

L'evidenza scientifica a favore di un ampio coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della BPCO si può considerare consolidata. Le modificazioni della risposta innata ed adattativa ad oggi descritte nei pazienti con BPCO includono l'incremento della funzione e l'accumulo di cellule dendritiche (DC) mature nelle vie aeree, il difetto dei circuiti di immunoregolazione, l'espansione delle cellule T regolatorie (Treg).

L'enzima indoleamine 2,3-diossigenasi 1 (IDO1) è deputato alla conversione dell'aminoacido essenziale triptofano in una serie di intermedi denominati kynurenine. Nel contesto clinico del cancro, l'espressione di IDO1 è stata correlata con la soppressione delle risposte immunitarie anti-tumorali e con lo sviluppo di tolleranza agli antigeni tumore-associati, attraverso un'espansione delle cellule Treg. L'ipotesi sperimentale che si intende saggiare è che la via catabolica del triptofano incentrata sull'enzima IDO1 sia coinvolta nel promuovere infiammazione cronica ed espansione delle cellule Treg nei pazienti con BPCO e lo sviluppo di patologia neoplastica, come recentemente dimostrato in un modello sperimentale di cancerogenesi cutanea.

Si intende verificare che stimoli pro-infiammatori siano in grado di indurre l'espressione

dell'enzima di immunoregolazione IDO1 nei pazienti con BPCO, condizionando l'espansione dei linfociti Treg circolanti. Si intende incentrare le sperimentazioni su due fattori di crescita ematopoietici (IFN-gamma ed HGF) associati ad infiammazione cronica ed autoimmunità.

Gli obiettivi specifici della sperimentazione sono i seguenti:

1. Valutare se mediatori solubili ad attività pro-infiammatoria (IFN-gamma, HGF) inducono l'espressione dell'enzima IDO1 a livello sistemico;
2. Correlare l'espressione dell'enzima IDO1 all'assetto fenotipico e funzionale dei linfociti T circolanti;
3. Valutare l'effetto dell'attivazione del catabolismo del triptofano sulla frequenza di cellule dendritiche circolanti mieloidi e plasmacitoidi (CD141+, CD1c+, CD304+).

Sono stati arruolati nello studio 50 pazienti fumatori con BPCO in stadio GOLD 3 o 4, afferenti al Dipartimento di Medicina Respiratoria dell'IRCCS San Raffaele Pisana. Il gruppo di controllo è costituito da 50 soggetti sani ma fumatori, di pari età e sesso. I pazienti vengono sottoposti ad un prelievo di sangue venoso (15 ml) in occasione di una visita medica di routine (campione basale) e successivamente ogni 3 mesi, per un totale di 4 campionamenti a paziente (200 determinazioni di laboratorio). Il disegno dello studio permette di apprezzare se il trattamento riabilitativo al quale i pazienti sono sottoposti in regime di ricovero ordinario influenza i parametri immunologici oggetto dell'indagine.

In relazione agli obiettivi specifici della sperimentazione, vengono eseguite le seguenti valutazioni di laboratorio:

- Obiettivo 1. Vengono misurati i livelli di IFN-gamma ed HGF nel siero e la funzionalità enzimatica di IDO.
- Obiettivo 2. Viene quantificata la frequenza di cellule Treg e di cellule polarizzate al profilo funzionale Th1, Th2 e Th17.
- Obiettivo 3. Viene determinata la frequenza delle popolazioni di cellule dendritiche circolanti mieloidi e plasmacitoidi.

Si intende dimostrare che il processo infiammatorio cronico in atto nei pazienti con BPCO in stadio clinico avanzato si associ ad attivazione del catabolismo del triptofano, ad incremento delle cellule Treg circolanti e a squilibrio nella percentuale relativa di cellule dendritiche mieloidi e plasmacitoidi. L'evidenza di una attivazione del catabolismo del triptofano potrebbe spiegare l'aumento di incidenza di carcinoma polmonare osservato nei pazienti con BPCO, attraverso la promozione di meccanismi di fuga dal controllo immunitario che favorirebbero la trasformazione e la crescita neoplastica. La sperimentazione proposta contribuirà a determinare l'impatto delle procedure riabilitative su specifici parametri di infiammazione cronica e di performance immunologica.

*Caratterizzazione genotipica e fenotipizzazione molecolare della Bronco-Pneumopatia Cronica-Ostruttiva (BPCO). Fase II: "Monitoraggio e valutazione degli effetti della riabilitazione respiratoria: applicazione di un approccio di System Medicine per l'implementazione di una piattaforma di informazioni cliniche, epidemiologiche e campioni biologici relativi all'eziologia, alla patogenesi e al trattamento di pazienti con insufficienza respiratoria"*

Oggi in Italia e in Europa, le malattie del sistema respiratorio costituiscono la terza causa di morte dopo i tumori e le malattie cardiocircolatorie. Per la loro elevata incidenza e prevalenza, rappresentano una delle più frequenti cause di malattia e invalidità, comportando un notevole carico assistenziale per la società. Infatti, in base a stime Istat e

del Ministero della Salute, nel 2002 erano circa 30.000 le persone che ogni anno, a causa della cronicizzazione delle patologie respiratorie, vivevano in condizione di insufficienza respiratoria. Si contano circa 600.000 ricoveri ospedalieri annui dovuti a malattie polmonari, per un totale di quasi 6.000.000 di giornate di degenza. Inoltre, il fenomeno dell'invecchiamento della popolazione e l'aumentata esposizione ai principali fattori di rischio, quali il fumo di sigaretta e i componenti dell'inquinamento atmosferico, rendono l'incidenza delle malattie respiratorie in continua crescita. In questo contesto si colloca l'importanza di attuare programmi di riabilitazione respiratoria, universalmente accettati come parte integrante del trattamento clinico dei pazienti affetti da patologie respiratorie croniche, che, nonostante il trattamento medico standard, rimangono sintomatici e spesso limitati nelle attività della vita quotidiana. La riabilitazione respiratoria consiste, infatti, in un intervento globale e multidisciplinare basato sull'evidenza dei benefici sui pazienti in base a parametri di efficacia oggettivi e quantificabili, volto a ridurre i sintomi, ottimizzare lo stato funzionale, aumentare la partecipazione e ridurre il consumo di risorse sanitarie attraverso la stabilizzazione o il miglioramento della malattia. Evidenze scientifiche dimostrano la capacità dei programmi di riabilitazione respiratoria di apportare effetti benefici sulla dispnea e di migliorare il controllo di determinate patologie, come la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO).

Obiettivi principali della riabilitazione in questi pazienti sono la prevenzione delle complicanze infettive e la riduzione dei tempi di degenza, favorendo quindi la transizione verso reparti a più basso livello assistenziale. I mezzi con cui si cerca di raggiungere ciò sono i cambiamenti di postura, le manovre di reclutamento alveolare, le tecniche di distruzione bronchiale, l'allenamento dei muscoli respiratori, il ricondizionamento allo sforzo, lo svezzamento dalla ventilazione meccanica.

La complessità delle patologie trattate all'IRCCS San Raffaele Pisana rende necessario un approccio di tipo sistemico che consente di tenere in considerazione e di integrare una molteplicità di fattori. Raramente, infatti, un singolo fattore è implicato come unico predittore dello sviluppo della patologia; piuttosto questa si evolve proprio dall'integrazione di più fattori concomitanti. Di conseguenza, in tali casi, si rivela maggiormente adatta una prospettiva sistemica che permette di prendere in esame una mole di dati notevole, provenienti da diverse fonti, al fine di formulare modelli computazionali che tengono conto di informazioni di diversa natura.

Il progetto consiste nella costruzione di una piattaforma di dati complessi relativi ai pazienti ricoverati dal 2005 con diagnosi di insufficienza respiratoria presso i reparti di Pneumologia Riabilitativa della strutture ospedaliere IRCCS San Raffaele Pisana e dei reparti gemelli dipartimentalizzati, Case di Cura San Raffaele Monte Compatri e Cassino. Lo scopo della piattaforma riabilitativa consiste nell'implementare un archivio unico di informazioni cliniche volto al monitoraggio delle attività dei reparti. La grande disponibilità di dati consente di indagare e migliorare le prestazioni cliniche incentrando l'attenzione sui benefici della riabilitazione in termini di maggiore autonomia e maggiori capacità funzionali dei pazienti.

Le attività di ricovero dei reparti di Pneumologia Riabilitativa delle strutture ospedaliere del San Raffaele accolgono in totale circa 700 pazienti/anno con diagnosi di insufficienza respiratoria che vengono sottoposti a un programma di terapia riabilitativa respiratoria standard della durata di circa 30 giorni. Su tutti i pazienti dimessi si raccolgono, in modo sistematico e automatico, informazioni demografiche, epidemiologiche e cliniche, associate a un registro di dati laboratoristici standard e campioni biologici umani per la ricerca. I dati clinici e di funzionalità respiratoria dei pazienti relativi alla riabilitazione respiratoria, provengono dalla cartella clinica, da strumentazioni (pletismografo,

emogasanalizzatore) e dal Sisweb (Sistema Informativo Sanitario Web su cui si basa l'acquisizione dei dati del sistema informatico del San Raffaele S.p.A.). È, inoltre, previsto il prelievo di un campione di sangue aggiuntivo (15ml) eseguito in fase di ingresso. E' iniziata la raccolta dei dati clinico-epidemiologici e dei campioni biologici dei pazienti. Al momento sono stati reclutati 194 soggetti, raccolti 233 campioni di sangue (plasma, siero linfociti) e 15 campioni di BAL.

E' stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana un Emendamento al protocollo, attraverso il quale si richiede l'autorizzazione a implementare la piattaforma e il Biorepository del Laboratorio di Ricerca con i dati e il materiale biologico umano proveniente da pazienti affetti da cancro del polmone sottoposti a intervento chirurgico, presso la Divisione di Chirurgia Toracica del Policlinico "A. Gemelli" Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma, l'Ospedale Mazzini di Pescara e Centro Oncologico Fiorentino (CFO) di Sesto Fiorentino.

Nel settembre 2013 è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana un nuovo progetto denominato "Piattaforma San Raffaele per le Malattie Non Trasmissibili", che estende la casistica anche pazienti affetti da altre malattie non trasmissibili.

#### LINEA 4

Studio delle disabilità dello sviluppo  
e neuroriabilitazione pediatrica.

## AREA DI RICERCA DISABILITÀ DELLO SVILUPPO

*Dall'analisi del movimento secondo la prospettiva biomeccanica all'analisi e allo studio del movimento "come funzione cognitiva"*

Questo progetto si colloca nella valutazione del movimento al fine di determinare le strategie di controllo motorio che caratterizzano i pazienti con disabilità intellettiva ed in particolare nei pazienti con sindrome di Down (DS).

Al fine di avere dati utili alla spiegazione del controllo motorio sono stati definiti set-up sperimentali ad hoc sviluppati grazie alla collaborazione con il Laboratorio "Luigi Divieti" del Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria, del Politecnico di Milano, testati dapprima su soggetti sani, e poi trasferiti ai soggetti con patologia. L'obiettivo del progetto è principalmente quello di utilizzare l'analisi biomeccanica del movimento per comprendere meglio le strategie di controllo motorio tipiche dei pazienti con disabilità intellettiva e identificare percorsi riabilitativi più adeguati alla loro situazione. Gli scopi specifici dello studio sono i seguenti: (1) definire ed applicare dei set up sperimentali per la valutazione quantitativa dei diversi aspetti di controllo ed esecuzione motoria durante task funzionali in soggetti adulti con DS. (2) A partire dagli output motori, definire alcune ipotesi riguardo alle funzioni cognitive che regolano tali output e riguardo a quale siano i deficit principali nella DS. (3) Indagare un particolare tipo di meccanismo feedforward, le reazioni pre-programmate.

Sono stati analizzati dati relativi a 37 soggetti con Sindrome di Down e a 43 soggetti sani.

Lo svolgimento del lavoro ha richiesto dapprima una revisione della letteratura relativa all'analisi motoria nel paziente con Sindrome di Down e a riguardo della valutazione motoria per la determinazione di strategie legate al controllo motorio.

A seguito di questo, si è evidenziato il tipo di protocollo sperimentale più adatto alla valutazione dei meccanismi di controllo motorio dei pazienti con Sindrome di Down, elemento che conferisce al progetto caratteristica di originalità. Lo studio ha analizzato l'integrazione percettivo-motoria nella DS durante l'esecuzione di due task funzionali (cammino in presenza di un ostacolo e tapping di arto superiore con ostacolo), utilizzando l'analisi quantitativa multifattoriale del movimento. Inoltre, lo studio ha analizzato le reazioni pre-programmate in presenza di una perturbazione dell'arto superiore mediante elettromiografia.

I risultati dei primi due esperimenti hanno evidenziato che: (1) mentre le persone con DS sembrano utilizzare correttamente l'informazione sensoriale, tale informazione non è utilizzata in maniera pre-programmata per pianificare il movimento in anticipo; (2) il movimento delle persone con DS è altamente dipendente da meccanismi feedback, mentre i soggetti di controllo fanno più affidamento a meccanismi di tipo feedforward. Comunque i soggetti con DS sono in grado di completare i task sebbene con minor efficienza nel movimento.

Questi risultati evidenziano alcuni importanti quesiti clinici:

- Il maggior affidamento su meccanismi feedback è dovuto ad una difficoltà nell'utilizzare la programmazione feedforward oppure è una scelta "strategica" per assicurare una maggior sicurezza nella riuscita del task, sebbene al prezzo di una minore efficienza?
- I soggetti con DS sarebbero in grado di utilizzare i meccanismi feedforward se adeguatamente allenati o la riabilitazione dovrebbe focalizzarsi più sul miglioramento delle abilità nell'uso dei meccanismi feedback?



- Quanto è importante il contributo dei deficit decisionali nella programmazione motoria dei soggetti con DS?

Rispondere a queste domande è di notevole importanza per lo sviluppo di strategie riabilitative mirate. Una parziale risposta a queste domande è fornita dai dati relativi all'analisi elettromiografica delle reazioni pre-programmate. Queste reazioni avvengono senza controllo volontario e sono quindi meno affette da problemi di decision-making. Per questo motivo tali reazioni permettono di studiare un particolare tipo di meccanismo feedforward riducendo l'effetto dei deficit decisionali. Inoltre, queste reazioni sono alcune tra le più "primitive" reazioni feedforward e permettono quindi di investigare il funzionamento dei meccanismi feedforward che si sono sviluppati nelle prime fasi di vita. I risultati aiuteranno a capire meglio il ruolo del feedforward nei DS, e permetteranno di definire alcune linee guida per una riabilitazione più focalizzata al trattamento dei deficit motori nella DS.

*Studio delle anomalie bioelettriche nei bambini con disturbi specifici dell'apprendimento e/o con disabilità intellettiva durante l'esecuzione di test per lo studio delle prassie grafo-motorie*

Nella valutazione delle abilità cognitive e motorie vengono comunemente utilizzati dei test nei quali viene chiesto ai soggetti di scrivere un testo o disegnare alcune semplici figure. Questi gesti grafo-motori vengono denominati movimenti fini e prevedono la coordinazione di piccoli movimenti muscolari a livello delle dita e della mano, rappresentano quindi l'integrazione tra task motorio e task cognitivo. Tali movimenti possono caratterizzare la natura di molteplici patologie che comportano disturbi a livello cognitivo e a livello motorio, dando un valido aiuto in fase decisionale per la scelta di una riabilitazione adeguata. Queste analisi, inoltre, permettono ai clinici di misurare il livello della maturazione percettivo-motoria in quanto un gesto grafico poco accurato si può considerare come la manifestazione di un disturbo mentale e comportamentale. Attualmente, nella pratica clinica, la maggior parte di queste valutazioni si basa sull'osservazione del risultato del gesto grafico e quindi su criteri qualitativi, oppure sull'utilizzo di una tavoletta grafica, che permette solamente l'analisi della traccia e non della postura del soggetto durante il gesto grafico. Questo lavoro è nato dall'esigenza di analizzare con una valutazione quantitativa ed esaustiva l'esecuzione di un task motorio che coinvolge sia aspetti cognitivi sia aspetti motori dei bambini con sindrome di Down per poi estendere tale valutazione anche ad altre patologie. La sindrome di Down è considerata una delle più importanti cause di disabilità mentale, e determina un ritardo nello sviluppo motorio, in particolare un ritardo nell'acquisizione del controllo del tronco, della postura eretta e della deambulazione, che può essere attribuito all'ipotonìa, al deficit nei meccanismi dell'equilibrio e alla lassità legamentosa che, a loro volta, sarebbero legati alla presenza dell'ipoplasia cerebellare. Il deficit peculiare a livello motorio nei bambini con sindrome di Down è la lentezza dei movimenti, deficit che permane anche in età adulta. In generale, anche se i bambini con sindrome di Down imparano a camminare, a raggiungere e a prendere gli oggetti, i loro movimenti mancano di precisione, di coordinazione e sono meno efficienti dei movimenti dei bambini che hanno avuto un normale sviluppo. Inoltre, queste persone presentano un atteggiamento "goffo" ed uno scarso controllo nella programmazione di molteplici movimenti che coinvolgono le diverse articolazioni.

In questo studio, sono stati analizzati 22 soggetti con sindrome di Down di età compresa tra i 7 e i 25 anni, tali soggetti sono stati confrontati con 13 bambini con un normale

sviluppo mentale e motorio di età compresa tra i 6 e i 12 anni. Nel set-up sperimentale è stata chiesta ai soggetti l'esecuzione di tre tipologie di task differenti che riguardavano il disegno di tre semplici figure geometriche: un cerchio, una croce ed un quadrato. La scelta del tipo di test è stata determinata dai test clinici che normalmente vengono proposti. Per l'acquisizione del movimento del soggetto è stato utilizzato un sistema optoelettronico (SMART D BTS, IT). Tale sistema ha permesso l'acquisizione delle coordinate tridimensionali dei marker posizionati in particolari punti di repere del soggetto e sulla penna, questo ha consentito di rilevare il loro movimento, così da ricostruire la traccia del disegno ed anche il movimento dell'arto superiore e del capo del soggetto durante il gesto grafico. Ogni prova è composta da due fasi: un'acquisizione statica ed un'acquisizione dinamica. Nella prima fase sono stati acquisiti i marker posti secondo un determinato modello sulla penna e sul foglio. Durante questa fase viene determinata la posizione della punta della penna rispetto al sistema di riferimento locale della penna stessa, costruito mediante i marker posti sul suo cappuccio. Nella seconda fase i marker sono stati posizionati sulla testa, sulle spalle e sul braccio dominante del soggetto, in modo tale da acquisire il suo movimento durante il gesto ed è stata ricostruita la traccia del disegno mediante le informazioni provenienti dalla prima fase sulla posizione della punta della penna. Le acquisizioni della statica e della dinamica sono state caricate in un software dedicato, SMART Analyzer (BTS IT), insieme alle informazioni personali del paziente. Mediante questo software è stato sviluppato un protocollo ad hoc per ognuno dei tre task motori, al fine di caratterizzare le grandezze specifiche di interesse relative al controllo motorio nei soggetti e di calcolare parametri di interesse relativi alla figura considerata. Il risultato ottenuto per ogni task motorio è contenuto in un report composto da tre pagine, nelle quali vengono indicate le caratteristiche dimensionali, identificate per caratterizzare le diverse strategie impiegate nel disegno e per valutare la correttezza esecutiva, le caratteristiche cinematiche, che sono state valutate per caratterizzare il meccanismo di controllo durante il movimento, e i parametri del movimento della testa e dell'arto superiore dominante. Per correlare la traccia del disegno ottenuto e la strategia posturale utilizzata, è stata realizzata l'analisi dei movimenti del braccio superiore per valutare le possibili differenze negli angoli articolari tra i due gruppi in analisi. Inoltre, per caratterizzare il livello di attenzione del soggetto durante l'esecuzione della prova è stata effettuata l'analisi del movimento della testa rispetto al foglio e rispetto alle spalle. Per verificare la significatività e l'attendibilità dei risultati ottenuti e per individuare eventuali differenze significative nei parametri analizzati tra i due gruppi, sono stati effettuati vari test statistici. Generalmente, nei movimenti più ampi, come ad esempio il cammino, la caratteristica peculiare dei soggetti con sindrome di Down è la lentezza esecutiva. Durante il movimento analizzato in questo lavoro, il comportamento dei bambini con sindrome di Down è totalmente diverso, infatti essi si muovono più velocemente rispetto al gruppo di controllo. Questa maggiore velocità porta ad un risultato finale meno accurato e preciso. Si ipotizza quindi che, per questo gesto grafico, il disturbo coinvolga aspetti cognitivi, come ad esempio la minor attenzione nel movimento stesso, il deficit di memoria, oppure il minor interesse al raggiungimento di un risultato corretto, e non sembra causato da disturbi a livello biomeccanico e motorio, come la lassità legamentosa e l'ipotonia, che sono tipicamente presenti in questi soggetti. Concludendo, il metodo di analisi utilizzato ha permesso di valutare e caratterizzare quantitativamente i disturbi della sindrome di Down nel gesto grafico in modo più completo. In futuro, questa metodologia potrebbe dare un valido aiuto nella caratterizzazione dei movimenti fini di altre patologie che comportano disturbi cognitivi e motori.

## AREA DI RICERCA DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

### *Studio dell'effetto Simon e del trasferimento di apprendimento su soggetti normodotati in Risonanza Magnetica Funzionale*

Durante le attività quotidiane ci si trova davanti ad una moltitudine di stimoli ambientali, molti dei quali sono irrilevanti per l'attività che si sta svolgendo. Per poter emettere delle risposte adeguate sono necessari un coordinamento ed un monitoraggio costante al fine di selezionare e limitare l'elaborazione alle informazioni pertinenti. Tale capacità, definita controllo cognitivo, fa parte delle funzioni esecutive di controllo, intese come quell'insieme di processi necessari per pianificare, organizzare, e regolare il funzionamento della attività mentale di ciascuno ed il comportamento. Questi processi, che nel loro insieme permettono di raggiungere un particolare scopo in maniera articolata e flessibile, raggiungono la completa maturazione solo nella tarda adolescenza.

Un compito comunemente usato per studiare questi meccanismi di controllo è il compito di Simon (Simon & Ruddel, 1976; Proctor & Vu, 2006 per una rassegna). Nella situazione sperimentale tipica, il soggetto deve rispondere ad una caratteristica non spaziale dello stimolo premendo uno fra due pulsanti situati generalmente a destra e a sinistra rispetto alla linea mediana del corpo. Ad esempio, si richiede di premere il pulsante di sinistra alla comparsa di un quadrato rosso e il pulsante di destra alla comparsa di un quadrato verde. Lo stimolo appare in modo casuale a destra o a sinistra rispetto ad un punto di fissazione centrale. Nella situazione corrispondente (stimolo e risposta omolaterali) il tempo di reazione (TR) risulta essere più veloce e l'accuratezza delle risposte maggiore rispetto alla situazione non corrispondente (stimolo e risposta controlaterali). L'effetto Simon, inteso come il vantaggio delle risposte corrispondenti rispetto alle risposte non corrispondenti, dimostra quindi che una caratteristica non rilevante dello stimolo (la sua posizione) influenza la rapidità e l'accuratezza della risposta fornita in base alla caratteristica rilevante (il colore).

Secondo le spiegazioni teoriche più accreditate, il vantaggio per le prove corrispondenti, definito effetto Simon, è dovuto ad un conflitto a livello dello stadio di selezione della risposta (e.g., Rubichi, Nicoletti, Umiltà, & Zorzi, 2000; Rubichi & Pellicano, 2004) tra due risposte, una generata sulla base delle istruzioni, l'altra attivata automaticamente sulla base di associazioni stimolo-risposta pre-esistenti che associano lo stimolo alla risposta corrispondente dal punto di vista spaziale (e.g., De Jong, Liang, & Lauber 1994). Nella situazione corrispondente le due risposte coincidono, quindi non si verifica alcuna competizione. Nella situazione non corrispondente, invece, le due risposte differiscono ed il conflitto deve essere risolto prima dell'emissione della risposta corretta, causando un allungamento dei tempi di risposta ed una maggiore probabilità di commettere errori.

Diversi studi hanno dimostrato che se si analizza l'effetto Simon nella prova N in funzione del livello di corrispondenza nella prova precedente (N-1), si vede che l'effetto risulta ridotto, assente o invertito quando la prova N è preceduta da una prova non corrispondente, mentre l'effetto è significativo quando la prova N è preceduta da una prova corrispondente (e.g., Stürmer, Leuthold, Soetens, Schröter, & Sommer, 2002; Hommel, Proctor & Vu, 2004; Iani, Gherri, Rubichi, & Nicoletti, 2009; Wendt, Kluwe, & Peters, 2006). Si ritiene che il conflitto esperito in una prova porti ad una serie di aggiustamenti volti ad impedire il ripresentarsi dello stesso conflitto nella prova successiva. Si tratta di una forma di controllo "automatico", inconsapevole, che permette di regolare il comportamento tenendo conto dell'esperienza immediatamente precedente. Una delle

aree cerebrali deputate a tale controllo è il cingolato anteriore (ACC), localizzato nella parte mediale del lobo prefrontale. Tale area sembra sia implicata nella rilevazione del conflitto (e.g., Di Pellegrino, Ciaramelli, & Làdavas, 2007). Una volta rilevato il conflitto, le informazioni vengono inviate ad altre aree cerebrali deputate alla risoluzione del conflitto, quali ad esempio la corteccia prefrontale dorso-laterale (DLPFC) (e.g., Botvinick, Braver, Barch, Carter, & Cohen, 2001).

Inoltre, il compito di Simon si è rivelato essere uno strumento utile per studiare l'apprendimento implicito. Usando il paradigma del Trasferimento dell'Apprendimento, sviluppato originariamente da Proctor e Lu (1999), è stato dimostrato che quando i partecipanti eseguono un compito di compatibilità spaziale in cui gli viene richiesto di rispondere alla posizione dello stimolo emettendo una risposta spazialmente incompatibile (i.e., rispondere allo stimolo di sinistra con il tasto di destra e viceversa) e successivamente devono eseguire un compito di Simon, l'effetto Simon si riduce, risulta assente oppure si inverte (i tempi di reazione per le risposte non-corrispondenti risultano più veloci di quelli delle risposte corrispondenti) (e.g., Iani et al., 2009; Proctor & Lu, 1999). Si pensa che ciò si verifichi perché rispondere per un certo numero di prove con un mapping spazialmente incompatibile rafforza l'associazione non-corrispondente tra lo stimolo e la risposta. Questa associazione, appresa in modo implicito, involontario, durante l'esecuzione del compito di compatibilità spaziale viene trasferita, sempre implicitamente, al successivo compito di Simon.

Lo scopo di questo progetto è di indagare attraverso la risonanza magnetica funzionale i meccanismi neurali alla base delle modulazioni dell'effetto Simon descritte sopra.

Ai partecipanti allo studio vengono somministrati una serie di test, in due sessioni separate. Durante la prima sessione vengono somministrati test utili a valutare parametri psicofisiologici, morfo-voluntari e cognitivi. I punteggi e dati ottenuti in tali test vengono correlati con la prestazione ai test somministrati durante la seconda sessione. Durante la seconda sessione vengono somministrati i compiti volti a valutare il controllo cognitivo e l'apprendimento implicito.

### **Prima sessione**

Tale sessione ha una durata di circa 50-60 minuti e viene svolta in Risonanza Magnetica funzionale

1. Compito di Simon (Compito di BASELINE), 148 prove – circa 20 minuti con pratica: rispondere al colore di uno stimolo (rosso/blu) premendo il tasto del colore corrispondente ed ignorando la posizione di comparsa.
2. Compito di compatibilità spaziale (Compito di PRATICA), 200 prove – circa 15-20 minuti con istruzioni): rispondere alla posizione di comparsa di uno stimolo bianco premendo il tasto omolaterale (condizione con mapping stimolo-risposta compatibile) oppure il tasto contralaterale (condizione con mapping S-R incompatibile).
3. Compito di Simon (Compito di TRASFERIMENTO), 148 prove – circa 20 minuti con pratica: rispondere al colore di uno stimolo (rosso/blu) premendo il tasto del colore corrispondente ed ignorando la posizione di comparsa.

I compiti 2 e 3 devono essere separati da un intervallo massimo di 5-10 minuti.

I pazienti vengono sottoposti a risonanza Magnetica per 2 MPRAGE volumetriche una sequenza Flair e una sequenza DTI per la trattografia.

I dati vengono poi analizzati e correlati con i dati non radiologici attraverso programmi di ricostruzione analisi FREESURFER v5.2 , FSL v4.02, AFNI, VBM v8.0, SPM.

Sono poi analizzati statisticamente con SPSS 12.

Nel corso del 2013 sono state effettuate le risonanze magnetiche per 24 soggetti ed è in corso l'elaborazione dei dati.

Nell'arco del 2014 verranno svolte 36 risonanze magnetiche per verificare altre condizioni sperimentali (uso inverso delle mani, e degli stimoli)

Interpretazione dei risultati comportamentali:

- Compito di Baseline: la differenza globale nei tempi di risposta (TR) e nell'accuratezza tra prove corrispondenti e non-corrispondenti (effetto Simon) permetterà di valutare l'effetto dell'informazione interferente sulla prestazione. La modulazione di tale differenza da parte della prova precedente (effetti sequenziali) permetterà di valutare la funzionalità dei meccanismi di controllo, ritenuti essere automatici ed inconsapevoli, che permettono di regolare il comportamento tenendo conto dell'esperienza immediatamente precedente.

- Compito di trasferimento: l'analisi della differenza globale tra prove corrispondenti e non-corrispondenti in seguito al compito di pratica spaziale permetterà di valutare l'apprendimento motorio implicito: se c'è apprendimento l'effetto Simon dovrebbe risultare assente o ridotto dopo un compito di compatibilità spaziale con mapping incompatibili.

- Interpretazione dei risultati derivanti dalla risonanza magnetica funzionale

L'analisi dei dati derivanti dalla risonanza magnetica funzionale permetterà di valutare quali aree sono implicate nel controllo cognitivo e nei processi di apprendimento implicito. Sarà inoltre possibile valutare se differenze nei parametri derivanti da una valutazione quantitativa morfo-volumetrica cerebrale possono rendere conto delle differenze individuali nella prestazione comportamentale

#### *Valutazione quantitativa multimodale in risonanza magnetica nelle eredo-atassie e nelle paraparesi spastiche ereditarie*

Le eredo-atassie e le paraparesi spastiche ereditarie sono un gruppo vasto ed eterogeneo di patologie neurodegenerative geneticamente determinate. L'atassia di Friedreich è l'atassia a trasmissione autosomica recessiva più frequente nell'etnia caucasica, mentre la SPG4 (spastic paraplegia type 4) è la forma di paraparesi spastica ereditaria più frequente in assoluto nella popolazione generale. Pur essendo patologie note da lungo tempo, pochi sono i dati presenti in letteratura riguardanti la caratterizzazione morfologica e funzionale acquisita attraverso tecniche di neuroimaging. Sia per l'atassia di Friedreich, che per la SPG4, che per tutte le forme di eredo-atassie e paraparesi spastiche ereditarie, è nota un'ampia variabilità fenotipica in termini di età di esordio, manifestazioni cliniche, progressione e prognosi, solo parzialmente correlata con i dati di genetica molecolare. Le tecniche di analisi multimodale quantitativa in risonanza magnetica rappresentano uno strumento in grado di fornire parametri quantitativi oltre che qualitativi sulle alterazioni riscontrabili in tali pazienti e, oltre che fornire dati descrittivi dettagliati sinora assenti nel panorama della letteratura scientifica internazionale, offrono la possibilità di operare correlazioni clinico-morfologiche tra specifici sub-set di pazienti e dati quantitativi ottenuti. L'ampia variabilità fenotipica in termini di onset, manifestazioni cliniche, prognosi *quod valitudinem* e *quod vitam* propria dei pazienti affetti da eredo-atassie e paraparesi spastiche ereditarie è solo parzialmente correlata con i dati di genetica molecolare. In letteratura, i dati sulla caratterizzazione morfologica dettagliata e sulle correlazioni clinico-morfofunzionali di tali patologie sono scarsi e, dunque, avendo a disposizione un'ampia casistica di pazienti affetti, concreta è la possibilità di apportare dati innovativi in questo specifico campo.

Gli obiettivi del presente studio prevedono l'arruolamento di circa 50 pazienti con diagnosi di eredo-atassia o paraparesi spastica ereditaria geneticamente confermata che

verranno sottoposti a studio quantitativo multimodale in risonanza magnetica.

I pazienti vengono sottoposti a risonanza Magnetica per 2 MPRAGE volumetriche una sequenza Flair e una sequenza DTI per la trattografia.

I dati vengono poi analizzati e correlati con i dati non radiologici attraverso programmi di ricostruzione analisi FREESURFER v5.2 , FSL v4.02, AFNI, VBM v8.0, SPM.

Verranno poi analizzati statisticamente con SPSS 12.

Sono state eseguite 20 risonanze magnetiche su soggetti con SPG4. I dati trattografici e volumetrici sono in fase di analisi, nel 2013 sono state eseguite correlazioni con dati clinici e confronti con gruppo di controllo sani. Nel corso del 2014 verrà aumentato il campione di soggetti patologici.

I dati ottenuti da tale studio possono essere utilizzati ai fini di:

- migliore caratterizzazione clinico-morfologica, approfondimento delle conoscenze inerente la correlazione genotipo-fenotipo nelle diverse classi di eventi mutazionali associati alle malattie suddette;
- elaborazione di criteri prognostici basati su criteri morfologici adozione di misure terapeutico-riabilitative mirate basate sulla migliore definizione prognostico-morfologica.

### *Riconoscimento e caratterizzazione di aree funzionali fMRI in individui con dislessia durante la lettura e la discriminazione di liste di parole e non parole*

Recentemente diversi autori hanno evidenziato, nei bambini con disturbi specifici di apprendimento (DSA), anomalie EEG di aspetto epilettiforme, anche in assenza di crisi "manifeste" (Caplan et al. 2008). La verifica di questi elementi appare molto importante per la spiegazione di alcune manifestazioni legate ai DSA e in particolare nella dislessia, se si considera l'influenza disorganizzante su diverse funzioni superiori di crisi frequenti e/o prolungate, accompagnate ad alterazioni EEG. Le anomalie funzionali rilevabili con test neuropsicologici vengono descritte come disturbi cognitivi transitori (TCI) e messe in relazione con anomalie dell'attività elettrica. Diversi autori hanno discusso i potenziali vantaggi di una terapia anti epilettica a livello cognitivo, anche in assenza di crisi cliniche (Sirén A, et al. 2007, Dubois CM et al. 2004).

In precedenti studi EEG, i dislessici hanno mostrato anomalie degli ERD per quanto riguarda la componente Alpha durante la lettura di parole e non-parole (Klimesh et al., 2001), come Teta Anormali e ERS Beta (Rumsey et al.1989; Ackerman et al.1994, 1998; Klimesh et al. 2001; Spironelli et al. 2006). Durante la prova di lettura, i già menzionati ERD/ERS mettono in evidenza nei dislessici un povero processamento delle informazioni fonologiche in area occipitale/temporale dell'emisfero temporale destro, insieme a un processamento di informazioni troppo intenso nelle aree frontali (Rumsey et al. 1989; Ackerman et al. 1994, 1998; Klimesch et al. 2001; Spironelli et al. 2006).

Scopo di questo progetto è quello di verificare, in pazienti con diagnosi di dislessia, l'eventuale presenza di anomalie bioelettriche come anche di caratterizzare pattern EEG-grafici caratteristici della popolazione studiata, durante l'attività di lettura e discriminazione di parole e non parole e di verificare l'eventuale coincidenza tra gli errori che i bambini compiono durante l'attività e la presenza di anomalie nel tracciato.

Rispetto agli studi precedenti del gruppo proponente, questo progetto intende registrare i dati EEG in condizioni sperimentali "event-related" in modo da poter analizzare il fine timing temporale della risposta corticale EEG durante la lettura di parole. Questo approccio consentirà di poter conoscere per ogni parola o pseudo-parola gli istanti in cui una parola viene visualizzata e il tempo di ritardo della fonazione del bambino. Si

potrebbero formare i potenziali evento correlati e studiare con precisione del millisecondo la variazione dei ritmi alpha (alpha event-related desynchronization) e dei relativi potenziali evento-correlati. L'obiettivo ultimo è quello di stabilire una relazione ancora più precisa tra le possibili anomalie dei ritmi alpha durante la lettura con il ritmo alpha a riposo e correlarle con neuroimaging funzionale per definire ancora meglio le aree interessate da questa disarmonia evolutiva.

Gli individui sottoposti a sperimentazione vengono reclutati tenendo in considerazione i seguenti parametri:

- Gruppo Sperimentale: 20 soggetti con diagnosi di dislessia confermata con almeno due deviazioni standard sotto in due dei sei indici significativi. Età superiore a 10 anni. QIT valutato con prova WISC-3 superiore a 90 Pti con differenza massima tra QIV e QIP di 15 Pti.
- Gruppo Controllo: 20 soggetti sani per età e sesso comparabili al gruppo sperimentale. QIT valutato con prova WISC-3 superiore a 90 Pti con differenza massima tra QIV e QIP di 15 Pti.

I soggetti dislessici sono selezionati presso l'IRCCS San Raffaele Pisana. I criteri di esclusione sono di seguito elencati: qualsiasi disabilità neurologica, sintomi psichiatrici o storia di epilessia (come rivelato dalla routine clinica e strumentale), e l'uso di farmaci psicoattivi al momento delle registrazioni EEG e MRI. I criteri d'inclusione dei soggetti dislessici comprenderanno: punteggio di lettura (velocità e / o la precisione) di due deviazioni standard al di sotto della media della popolazione di pari età in almeno due prove tra la lettura di parole, lettura di pseudo-parole (Sartori et al, 1995. Brambati et al, 2006) o prove di lettura di brani (Cornoldi e Colpo, 1981), intelligenza normale, valutata mediante due deviazioni standard dal punteggio alle matrici della Raven (Raven, 1981) e l'intelligenza misurata dalla Wechsler Intelligence Scale for Children-Revised (WISC-R) (Wechsler, 1986).

Sono stati selezionati e eseguiti i test cognitivi su 15 soggetti. Nel corso del 2014 verranno svolte le risonanze magnetiche.

Considerando i dati precedenti descritti è possibile ipotizzare che la dislessia possa non essere soltanto un meccanismo acquisito dovuto a una disfunzione della attività di modulazione oscillatoria cerebrale durante la prova di lettura, ma anche una disfunzione della sincronizzazione neuronale alla base del ritmo EEG di riposo. Nei dislessici, la anomala sorgente del ritmo di riposo Alpha, nella corteccia posteriore potrebbe rivelare un problema nello sviluppo dei disturbi specifici nei loops della regione corticale inferiore della corteccia basale, talamo corticale, e cortico corticale che modulano la fluttuazioni di questi ritmi di default (Klimesch, 1999; Pfurtscheller and Lopes da Silva, 1999).

Tali fluttuazioni potranno essere verificate e confermate con le prove in FMRI, portando così a una migliore conoscenza del disturbo in una ottica di intervento mirato.

### *Down syndrome*

Da sempre la sindrome di Down è al centro dell'attenzione medica al fine di indagare ed interpretare la disabilità, i disturbi cognitivi ed organici che la contraddistinguono.

La letteratura scientifica è ricca di pubblicazioni e di studi che hanno approfondito e cercato di interpretare questo disturbo dello sviluppo, sotto ogni punto di vista.

In campo neuroradiologico, la ricerca sta cercando di interpretare quali sono quei fattori che portano alla disabilità motoria ed intellettiva, fenomeni tipici della malattia.

Grazie alle nuove metodiche strumentali, come la risonanza magnetica (RM), ed a sof-

ture dedicati, gli studi scientifici più recenti hanno cercato di evidenziare e valutare le anomalie strutturali corticali o sottocorticali e le performance cognitive, al fine di identificare dei pattern diagnostici caratteristici.

Sicuramente sono emersi due aspetti degli individui con sindrome di DOWN: lo sviluppo cerebrale è completo dal punto di vista organico ma è presente un disturbo funzionale e un decadimento cognitivo significativo legato ad un invecchiamento precoce cerebrale. Non a caso questo aspetto di "precoce" demenza è stato utilizzato spesso in letteratura come un prototipo di demenza di Alzheimer ai primi stadi.

Molti studi scientifici, anche autoptici, hanno cercato di evidenziare le cause di questo invecchiamento precoce.

Tecniche di Morfometria Cerebrale, come la VBM (Voxel-Based-Morphometry) sono in grado di "calcolare" il volume di materia grigia di un soggetto e soprattutto le differenze, quando queste esistono in quanto statisticamente significative, tra due o più gruppi di soggetti che si distinguono ad esempio per la presenza o meno di una determinata patologia.

Recenti studi di morfometria con tecniche ROI-Based e con tecniche VBM hanno documentato un pattern tipico di atrofia cerebrale, simile a quella dei primi stadi di malattia di Alzheimer, con un coinvolgimento corticale prettamente frontale e temporale.

Tra le ipotesi che possono giustificare questo pattern di atrofia precoce, emerge un aumento del deposito di proteine amiloidi nel contesto dei tessuti cerebrali, legato all'iper-espressione del gene del precursore proteico localizzato sul cromosoma 21. Questo iper-accumulo proteico precoce potrebbe essere alla base di una precoce destrutturazione dei tessuti nervosi che porterebbe all'atrofia cerebrale.

Analoghi studi hanno verificato una diretta correlazione tra l'atrofia corticale e l'avanzare dell'età. In particolare, il lobo parietale, la porzione posteriore del lobo frontale e la superiore del lobo temporale rappresentano le sedi di atrofia più tipiche. Questo aspetto sarebbe da ricondurre ad un coinvolgimento delle radiazioni di sostanza bianca del terzo posteriore del corpo calloso, coinvolto anch'esso da un'involuzione strutturale, che provocherebbero una deafferentazione con la corteccia cerebrale sovrastante.

La tecnica RM del Tensore di Diffusione (DTI dall'inglese Diffusion Tensor Imaging) permette di evidenziare anomalie strutturali, tramite la realizzazione di mappe parametriche che le evidenziano. In particolare, le mappe di Fractional Anisotropy (FA) permettono di quantificare il danno micro strutturale a carico dei fasci di materia bianca e differenziare ad esempio due popolazioni (patologica e non) sulla base dello stesso.

Gli obiettivi della ricerca sono:

- verificare i pattern di atrofia cerebrale degli individui con sindrome di Down rispetto ai soggetti sani ed in relazione all'avanzare dell'età mediante le tecniche Voxel-based Morphometry e Free-Surfer;
- verificare l'effettiva destrutturazione della sostanza bianca posteriore mediante la tecnica del tensore di Diffusione ed analizzare le eventuali alterazioni dei parametri FA e ADC in corrispondenza delle radiazioni della porzione posteriore del corpo calloso.

Il progetto è diviso in una fase di acquisizione dati ed una di analisi degli stessi.

Le acquisizioni avvengono presso l'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma dove è presente un Tomografo Siemens Magnetom Aera (1.5 T). Il protocollo di acquisizione è il seguente:

- MPRAGE volumetrica
- DTI (30 direzioni nello spazio)
- Flair

Il campione è costituito da un gruppo di almeno 50 soggetti con Sindrome di Down, il



più eterogeneo possibile per quanto riguarda l'età, ed un gruppo comparabile di soggetti sani. Di pari passo con le acquisizioni RM i soggetti vengono sottoposti a specifici test clinici per valutare il livello cognitivo.

I dati RM sono elaborati per mezzo di diversi software di analisi tra cui Matlab (<http://www.mathworks.it/products/matlab/>), SPM (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm/doc/>), FSL (<http://fsl.fmrib.ox.ac.uk/fsl/fslwiki/>), FreeSurfer (<https://surfer.nmr.mgh.harvard.edu/>) e software "home made".

In particolare, i volumi pesati in T1 sono analizzati per mezzo di due software principali FreeSurfer per quantificare le variazioni dello spessore corticale per ciascun soggetto i volumi.

VBM per quantificare le variazioni del volume corticale.

Per ciascun soggetto dal volume pesato in T1 vengono prodotti i volumi modulati di materia grigia (GM), bianca (WM) e fluido cerebro spinale (CSF) nello spazio comune dell'atlante MNI del Montreal Neurological Institute; tali volumi vengono convoluti con un kernel gaussiano per migliorare il rapporto segnale rumore e mitigare gli effetti di volume parziale. I volumi pesati in diffusione saranno invece analizzati per mezzo di TBSS (Tract-Based Spatial Statistic) ed FSL. Per ciascun soggetto le immagini pesate in diffusione vengono riallineate al volume non pesato, per la correzione degli artefatti dovuti alle eddy currents; in seguito viene ricavato il tensore di diffusione e da questo le mappe parametriche di Mean Diffusivity (MD) e Fractional Anisotropy (FA); le mappe FA vengono riallineate in uno spazio comune e viene creata la mappa di FA media tra i soggetti da cui viene ricavato lo "scheletro" della materia bianca che rappresenta il centro dei tratti comuni a tutti i soggetti; su tale scheletro vengono riportati i fasci di ciascun soggetto per la successiva analisi statistica. Per ciascuna procedura i dati vengono sottoposti a diversi test statistici di confronto tra gruppi (T test, Anova, ecc) e correlazione con parametri clinici. Sono state eseguite risonanze magnetiche su 40 soggetti con Sindrome di Down. Le analisi volumetriche eseguite hanno portato alla scrittura di due articoli in fase di revisione da parte della rivista: il primo sulla flessione estensione, il secondo riguardo la correlazione tra dati dello spessore corticale e l'età dei soggetti. Sono attualmente in corso le analisi dei dati trattografici e scrittura di articoli sulle differenze fra Maschi e Femmine, correlazioni tra volumi e età, variazioni ippocampali.

Dalle analisi FreeSurfer e VBM di correlazione con diversi parametri (età e test clinici) è attesa una correlazione negativa tra l'età e lo spessore e l'età ed il volume corticale; una correlazione positiva tra lo spessore e/o il volume ed i risultati dei test clinici che misurano le capacità cognitive. Nel confronto tra gruppi è attesa una differenza statisticamente significativa tra soggetti con sindrome di down e soggetti sani di controllo (a favore di questi ultimi) e soggetti con sindrome di down di età inferiore e superiore ai 25 anni circa, sia per lo spessore, sia per il volume corticale.

In particolare, è atteso, da letteratura precedente, un coinvolgimento del lobo parietale e della porzione posteriore del lobo frontale e superiore del lobo temporale.

E' attesa la conferma di questo dato di atrofia anche della materia bianca del corpo calloso, che si traduce in una diminuzione della FA dei soggetti con sindrome di down rispetto ai soggetti sani di pari età.

## LINEA 5

Identificazione di nuovi modelli organizzativi e gestionali per ottimizzare la risposta riabilitativa nel paziente disabile.

## AREA DI RICERCA APPROCCI DI SISTEMA E MALATTIE NON TRASMISSIBILI

*Ricerca e validazione di indicatori in grado di migliorare la prescrizione farmacologica e la qualità della presa in carico delle persone in età geriatrica*

Con il progressivo invecchiamento della popolazione si assiste ad un cambiamento degli obiettivi delle cure mediche in età geriatrica. La valutazione della qualità delle cure e la misurazione di indicatori di sicurezza ed efficacia è sempre più riconosciuta fra gli strumenti prioritari di pianificazione sanitaria e ottimizzazione assistenziale. L'attenzione crescente per questo approccio ha portato alla sperimentazione di vari modelli organizzativi e alla ricerca di strumenti mirati ad ottenere cure adeguate per i pazienti in età geriatrica.

La popolazione anziana è infatti caratterizzata da una specifica eterogeneità dovuta alla multimorbilità (spesso con carattere di cronicità), alla disabilità, alle problematiche socio-assistenziali. Ciò richiede l'utilizzo di strumenti in grado di valutare l'anziano nella sua globalità e complessità, oltre alla personalizzazione dell'intervento al fine di dare un'adeguata risposta ai bisogni clinico-assistenziali del singolo individuo.

La valutazione multidimensionale, oltre ad evidenziare i problemi prioritari, clinici e assistenziali, del paziente in età geriatrica, è uno strumento fondamentale nella valutazione della terapia farmacologica con l'obiettivo di far emergere, riconoscere e prevenire potenziali problemi farmaco-correlati, come le reazioni avverse e le interazioni tra farmaci, riducendo i rischi legati all'uso inappropriato dei farmaci e di conseguenza gli eventi negativi.

L'IRCCS San Raffaele Pisana è impegnato in diversi progetti di ricerca che, in modo complementare, permetteranno di validare indici di appropriatezza delle cure e di qualità della vita. La validazione di questi indici ne permetterà l'applicazione nella pratica clinica in diversi setting assistenziali, di tipo territoriale, ospedaliero e residenziale.

Il Gruppo di Epidemiologia Clinica e Molecolare del IRCCS San Raffaele Pisana è stato coinvolto in quattro studi aventi come obiettivo il miglioramento della qualità di vita e della qualità di cura nei pazienti anziani di età superiore-uguale ai 65 anni. Tale obiettivo è da raggiungersi attraverso l'implementazione di una strategia basata sull'utilizzo di strumenti di valutazione multidimensionale e attraverso la ricerca e validazione di indicatori di qualità di cura in grado di ridurre gli eventi avversi (rischio di ospedalizzazione, la disabilità e la mortalità).

Per quanto riguarda il progetto RSA, denominato Scar@beo, acronimo di Studio sulla Complessità dell'Anziano in RSA: Creazione di un DataBasE traslaziOnale, il progetto è stato avviato in tutto il gruppo San Raffaele. Sono stati inseriti nel database circa 800 ospiti (prime valutazioni), con valutazione multidimensionale ripetuta ogni sei mesi.

Lo studio AIFA svolto in collaborazione con l'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma sulla efficacia di un intervento di formazione alla valutazione multidimensionale ed alla appropriatezza prescrittiva è stato concluso nel corso del 2013. Un primo lavoro è in fase di stampa su una rivista scientifica con impact factor e sono in fase di scrittura sia la relazione conclusiva che ulteriori prodotti scientifici. Lo studio è stato condotto in collaborazione con la Società Italiana di Geriatria Ospedale e Territorio (SIGOT) su un intervento integrato di e-learning in collaborazione con l'Istituto Mario Negri.

Lo studio CCM su Assistenza residenziale per gli anziani: costruzione e validazione di un sistema di sorveglianza "quality e equity oriented" che ha interessato 17 RSA presenti in 2 regioni del Centro e Sud Italia è stato concluso nel corso dell'anno 2013 e sono stati validati indicatori quality e equity oriented in RSA ed il set integrato di indicatori

di struttura, di processo e di esito ad elevata fattibilità di rilevazione e trasferibilità di sistema.

Si intende pertanto provvedere a:

- Implementare il sistema Scar@beo di valutazione multidimensionale e di indicatori di qualità di assistenza in grado di ridurre gli eventi avversi
- Migliorare la prescrizione farmacologica nei pazienti anziani
- Migliorare la qualità di vita dei pazienti in età geriatrica.
- Pubblicare i risultati degli studi conclusi.

RICERCA FINALIZZATA E GIOVANI RICERCATORI

## AREA DI RICERCA CARDIOVASCOLARE

### Ministero della Salute – Bando di Ricerca Finalizzata

#### *Adattamento del ventricolo destro nell'ipertensione arteriosa polmonare: iterazione tra forma e danno miocardio*

L'ipertensione arteriosa polmonare (IAP) è la forma più severa di ipertensione polmonare (IP): i pazienti solitamente hanno una pressione media in arteria polmonare (PAPm) 4/5 volte superiore rispetto ai soggetti normali, e questo drammatico incremento di sovraccarico causa scompenso ventricolare destro, che porta il paziente al decesso.

In questo studio ci si vuole indirizzare verso le seguenti lacune di conoscenza:

- Studiare l'adattamento del ventricolo destro (VD) all'incremento di sovraccarico attraverso le modifiche morfo-funzionali del VD. In particolare, valutare il ruolo del rapporto massa/volume del VD (M/VVD) alla risonanza magnetica e il suo impatto sulla sopravvivenza o il peggioramento clinico durante terapia specifica.
- Accertare se l'infiammazione possa avere un ruolo nella IAP (differente attivazione di citochine infiammatorie in particolari sottogruppi di IAP - HIV, connettivopatie vs IAP idiopatica).
- Studiare le caratteristiche istopatologiche dell'ipertrofia del VD (presenza di apoptosi, miocardite focale, fibrosi interstiziale).
- Studiare l'espressione genica nei miociti, e la presenza di genoma o proteine virali.
- Valutare l'impatto degli aspetti precedenti sulla risposta alla terapia e sulla sopravvivenza.

I risultati di questo studio potrebbero spiegare l'adattamento del VD nell'IP severa, e fornire importanti informazioni su come approcciare la IAP sulla base del pattern morfo-funzionale del VD, dell'attivazione di vie infiammatorie e del coinvolgimento virale del miocardio.

Sono state analizzate 15 biopsie endomiocardiche eseguite in pazienti dal 2011-2013 affetti da ipertensione arteriosa polmonare HIV-HCV correlata.

Durante il periodo 05/12/2011-04/06/2013 di svolgimento del progetto sono stati reclutati quindici pazienti (10 Maschi, 5 Femmine, età media  $46,26 \pm 5,76$ ), con ipertensione polmonare ed infezione da HIV/HCV. Dal Giugno 2013 non sono stati più arruolati pazienti della sottocategoria arruolabile per eseguire biopsia endomiocardica.

Tutti i pazienti del sottogruppo HIV/HCV, sono stati sottoposti ad esami cardiologici non invasivi (ECG; ecocardiogramma 2-D e Risonanza Magnetica Cardiaca) e ad esami invasivi includenti cateterismo cardiaco, angiografia coronarica e ventricolare e biopsia endomiocardica biventricolare.

Per ogni paziente è stata effettuata una analisi istologica e immunoistochimica sui 3-4 frammenti prelevati da entrambi i ventricoli allo scopo di evidenziare la presenza di cellule infiammatorie e dell'antigene del core dell' HCV (TordJI- 22). E' stata inoltre effettuata la ricerca dei seguenti genomi virali nel miocardio: HIV, HCV, HHV6, HHV8, HHS1/2, EBV, AV, CMV, EV, virus dell'influenza A/B, parvovirus B19 tramite metodica di PCR.

I pazienti erano tutti affetti da scompenso cardiaco (classe NYHA media  $2.4 \pm 0.5$ ). La pressione arteriosa sistolica media in arteria polmonare era  $49,93 \pm 10,15$  mmHg. La risonanza magnetica cardiaca ha documentato significativo aumento del volume telediastolico ( $228,08 \pm 93,58$  ml) e del volume telesistolico del ventricolo destro ( $159,67 \pm 45,52$  ml) con una frazione di eiezione del ventricolo destro di  $29,2 \pm 8,7\%$ . Il volume telediastolico del ventricolo sinistro era di  $115,6 \pm 25,14$  ml, il volume telesistolico di

52,0 ± 16,58 ml e la frazione di eiezione di 55,3 ± 5,6%. L'analisi istologica ha evidenziato una miocardite linfocitica attiva in 12 pazienti, con microvasculite in 4 pazienti e positività dei cardiomiociti e delle cellule endoteliali microvascolari per TordJI-22 in 4 pazienti. La PCR è risultata positiva in 6 pazienti (4 per HCV e 2 per AV).

Questi dati preliminari, che mostrano presenza di miocardite con infiammazione microvascolare in pazienti con ipertensione polmonare e infezione da HIV/HCV, necessitano di essere confermati in un numero più elevato di pazienti: 3 nuovi pazienti sono stati arruolati e 12 pazienti sono in corso di arruolamento.

E' stata inoltre finalizzata la banca dati contenente i parametri che sono stati comunicati in sede di approvazione del comitato etico.

A seguito di un emendamento riguardante l'arruolamento dei pazienti, è stata effettuata una modifica sul criterio di esclusione che permette di includere nel protocollo i pazienti che sono già in trattamento presso i centri. Tali pazienti, anche se in trattamento, già eseguono gli esami previsti per il protocollo per comune pratica clinica (ad eccezione dei biomarkers per la quale sono stati stoccati i sieri dei pazienti). Al mese di Dicembre 2013 risultano essere arruolati 45 pazienti rispondenti ai criteri di inclusione ed esclusione.

Di questi 45 pazienti, 33 hanno già eseguito tutti gli esami di base previsti dal protocollo; di questi 33 pazienti, 18 hanno anche eseguito i controlli a 6 mesi come previsto. Gli altri 15 completa il tutto entro i 60 giorni successivi.

Tutti i prelievi sono stati eseguiti dalle arterie polmonare e femorale e dalla vena brachiale. I campioni sono stati centrifugati ed il siero ottenuto è stato stoccato in un frigorifero a - 80° C in attesa di essere analizzati.

*Anno 2009. Right ventricular adaptation in pulmonary arterial hypertension: the interplay between shape and myocardial injury*

*Anno 2010. Modulation of metabolic mechanisms in muscle loss disorders: involvement of autophagy and apoptosis*

*Anno 2010. New nanotechnology and biomedical approaches to improve postoperative pain treatment reducing risks related to opioids*

### **Bando Giovani Ricercatori**

*Si riportano i titoli dei progetti di ricerca della sezione Giovani Ricercatori del Bando Ricerca Finalizzata con i nominativi dei ricercatori che hanno scelto l'IRCCS San Raffaele Pisana quale Destinatario Istituzionale:*

*The role of vascular smooth muscle cell mineralocorticoid receptors in vascular function and disease.*

*A new cardiopulmonary by-pass system that minimizes haemodilution, haemolysis and systemic inflammation: effects on organ damage and surgical outcome. Giuseppe Nasso*

*Meccanismi molecolari coinvolti nella rigenerazione e nella distrofia muscolare.*

*The role of endothelial mineralocorticoid receptors in vascular inflammation and atherosclerosis.*

Studi effettuati dal laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare hanno dimostrato che il recettore mineralocorticoide (MR) è espresso nell'endotelio e che l'attivazione di tale recettore porta ad una aumentata espressione della molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1), nota per essere implicata nello sviluppo della lesione aterosclerotica. Da questi dati emerge l'idea che l'attivazione di MR e il conseguente aumento d'espressione di ICAM-1 possano avere un ruolo nello sviluppo dell'aterosclerosi. L'analisi della regolazione trascrizionale del gene ICAM-1 effettuata su colture di cellule endoteliali umane ha indicato chiaramente che il fattore nucleare kappaB (NFkB) ha un ruolo chiave nel mediare l'azione di MR sulla trascrizione di ICAM-1. Per lo studio in vivo della regolazione di ICAM-1 da parte di MR è stato generato un modello di topo transgenico mancante sia del gene dell'apolipoproteina E (ApoE), la cui assenza conferisce una forte predisposizione a sviluppare aterosclerosi, sia del gene ICAM-1. Tale modello transgenico, non disponibile in commercio né presente in altri laboratori, è stato ottenuto incrociando topi knock-out per ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) con topi knock-out per ICAM-1 (ICAM-1<sup>-/-</sup>). I topi ApoE<sup>+/-</sup>-ICAM-1<sup>+/-</sup> risultanti dall'incrocio sono stati poi accoppiati tra loro e la progenie risultante (più di 100 topi) è stata genotipizzata e sono stati individuati topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>+/-</sup> che adesso formano coppie di riproduttori che hanno generato e genereranno topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>-/-</sup> e topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>+/+</sup> (topi di controllo) da impiegare negli esperimenti.

Per approfondire il meccanismo di modulazione dell'espressione di ICAM-1 da parte di MR, è stato intrapreso lo studio dei meccanismi molecolari che mediano l'azione di MR e che governano la trascrizione del gene ICAM-1. Lo studio dell'attività trascrizionale del promotore del gene ICAM-1 è stato effettuato tramite metodiche di biologia molecolare generando delezioni di differente ampiezza del promotore del gene ICAM-1, promotore che è stato fornito dall'unità americana. Le delezioni del promotore sono state clonate in un plasmide che esprime il gene luciferasi e l'attività di tali delezioni è stata analizzata mediante trasfezioni transienti in colture di cellule endoteliali umane e successivi saggi di attività luciferasica. Questi esperimenti hanno permesso l'individuazione della regione di promotore, tra il nucleotide -1141 e -872, necessaria e sufficiente all'attivazione trascrizionale dipendente da MR. L'analisi bioinformatica di questa regione ha evidenziato la presenza di due potenziali siti di legame per i fattori trascrizionali Nuclear Factor Kappa B (NFkB) e Activator Protein 1 (AP1). L'utilizzo di due costrutti virali dominanti negativi per i due fattori trascrizionali ha confermato l'importanza del ruolo di NFkB nel mediare l'azione di MR sia sulla trascrizione del promotore ricombinante, che guida l'espressione del gene della luciferasi nei costrutti trasfettati, che sulla trascrizione del promotore endogeno di ICAM-1. Per lo studio in vivo della regolazione di ICAM-1 da parte di MR è stato inoltre generato un modello di topo transgenico mancante sia del gene dell'apolipoproteina E (ApoE), la cui assenza conferisce una forte predisposizione a sviluppare aterosclerosi, sia del gene ICAM-1. Tale modello transgenico, non disponibile in commercio né presente in altri laboratori, è stato ottenuto incrociando topi knock-out per ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) con topi knock-out per ICAM-1 (ICAM-1<sup>-/-</sup>) che sono stati forniti dall'unità americana. I topi ApoE<sup>+/-</sup>-ICAM-1<sup>+/-</sup> risultanti dall'incrocio sono stati poi accoppiati tra loro e la progenie risultante (più di 100 topi) è stata genotipizzata e sono stati individuati topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>+/-</sup> che adesso formano coppie di riproduttori che hanno generato e genereranno topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>-/-</sup> e topi ApoE<sup>-/-</sup>-ICAM-1<sup>+/+</sup> (topi di controllo) da impiegare negli esperimenti.



## AREA DI RICERCA NEUROMOTORIA

*Anno 2009. Capofila del progetto: Determination if variability in cardiac r-r interval on ekg is an early feature of Parkinson's disease and predicts the development of the parkinsonism classic motor features*

La Malattia di Parkinson (PD) è un disordine neurodegenerativo caratterizzato dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici nella sostanza nera compatta (SNc) associata a inclusioni proteiche intracellulari o Lewy bodies. Si è notato che i corpi di Lewy sono più generalmente diffusi in tutto il sistema nervoso centrale e coinvolgono le vie olfattive, gli emisferi cerebrali, il tronco encefalico, il midollo spinale, il sistema nervoso autonomo periferico. Inoltre, studi neuropatologici suggeriscono che la degenerazione del sistema nervoso autonomo periferico che coinvolge il cuore sia antecedente alla degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNc. Disfunzioni del sistema autonomo e, in maniera specifica, denervazione dopaminergica cardiaca sono state descritte virtualmente in tutti i pazienti con Malattia di Parkinson. È stato stabilito che una ridotta variabilità nella frequenza cardiaca all'ECG è un fattore di rischio o addirittura una precoce manifestazione della Malattia di Parkinson e potrebbe rappresentare un semplice economico strumento di screening applicato alla popolazione generale per determinare un eventuale rischio di sviluppare la Malattia di Parkinson.

In questo studio, viene effettuato un elettrocardiogramma di routine con misurazione della variabilità dell'intervallo R-R su un gruppo di familiari di primo grado (fratelli/sorelle o figli/e) di pazienti con PD e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso. E' possibile così verificare:

- Se i familiari di primo grado dei pazienti con PD (che hanno un più alto rischio di sviluppare la malattia) hanno una ridotta variabilità dell'intervallo R-R rispetto al gruppo di controllo.
- Se la variabilità della frequenza cardiaca è ridotta nei familiari di un sottogruppo di pazienti con PD affetti anche da anosmia e REM Behaviour sleep disorders.

Si possono individuare coorti di: familiari di primo grado aventi una ridotta variabilità della frequenza cardiaca; familiari di primo grado aventi una normale variabilità della frequenza cardiaca e gruppi di controllo correlati per sesso ed età.

Queste tre coorti sono utilizzate per successivi studi a lungo termine per determinare se vi è un maggiore rischio di sviluppare le classiche manifestazioni motorie del PD in coloro che presentino una variabilità nulla o ridotta nell'intervallo R-R.

Questo tipo di ricerca può rivoluzionare il modo di diagnosticare e trattare i pazienti con PD, nonché portare ad una prevenzione secondaria qualora diventino disponibili farmaci in grado di modificare il decorso di malattia.

In questo progetto, si effettua un elettrocardiogramma di routine con misurazione della variabilità dell'intervallo R-R su un gruppo familiari di primo grado di pazienti con PD e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso.

Tutti i partecipanti, oltre all'esecuzione dell'elettrocardiogramma di routine, sono sottoposti al "Smell Olfaction Test", test di screening per l'eventuale riscontro di iposmia, e successivamente alla compilazione di una scheda raccolta dati per l'eventuale riscontro di altri segni o sintomi "premonitori" di Malattia di Parkinson.

Nel corso dei primi 18 mesi di studio sono state finalizzate le modalità di esecuzione, si è definito il protocollo clinico definitivo, condiviso con le Unità operative coinvolte nel progetto, ed è stato ottenuto il parere positivo dal Comitato etico.

In particolare, i criteri di inclusione nei "Casi" prevedono:

- parenti di primo grado di pazienti con diagnosi di Malattia di Parkinson idiopatica
- rilascio di consenso informato firmato

I criteri di inclusione "Controlli":

- appaiati per sesso ed età ( $\pm 5$  anni)
- selezionati fra gli afferenti al centro riabilitativo San Raffaele Pisana per prestazioni non legate a patologie di tipo neurodegenerativo
- rilascio di consenso informato firmato

Per la raccolta dei dati è stata sviluppata una scheda raccolta dati specifica.

Contestualmente all'esecuzione dell'ECG viene indagata, attraverso la compilazione da parte del personale autorizzato di una scheda raccolta dati, la presenza di altri segni o sintomi "premonitori" di PD (iposmia, disturbi del sonno, stipsi, ecc).

Sono stati arruolati complessivamente 130 partecipanti previa firma del consenso informato, e si sono raccolti dati ed ECG fra casi e controlli.

Tutti i partecipanti, oltre all'esecuzione dell'elettrocardiogramma di routine, sono stati sottoposti al "Smell Olfaction Test", test di screening per l'eventuale riscontro di iposmia, e successivamente alla compilazione di una scheda raccolta dati per l'eventuale riscontro di altri segni o sintomi "premonitori" di PD (iposmia, disturbi del sonno, stipsi, ecc).

Inoltre, sono stati screenati 168 soggetti presso l'Unità operativa del San Raffaele Cassino, che sono stati studiati e trattati secondo il programma dello studio a partire dal mese di settembre 2013.

Sono stati esaminati complessivamente 130 soggetti presso l'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma.

Nello specifico, sono stati esaminati 101 familiari di primo grado (72 di sesso femminile e 29 di sesso maschile) così suddivisi:

- 65 figli di pazienti
- 23 fratelli/sorelle di pazienti
- 3 genitori di pazienti
- 10 con doppia relazione (sia figli che fratelli/sorelle)

Essendo la maggior parte dei familiari esaminati "figli", l'età media riscontrata è di 56 anni. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a "Smell Olfaction Test", che in 8 soggetti è risultato nei limiti inferiori alla norma (punteggio 6/8). Non sono stati riscontrati segni clinici di patologia neurologica di tipo parkinsoniano.

I controlli "sani" esaminati sono stati 34 (23 di sesso femminile e 11 di sesso maschile), con l'età media di 65 anni. Nessuno dei soggetti sani esaminati ha avuto punteggio 6 al "Smell Olfaction Test", ma tutti si sono inseriti nella normalità.

L'analisi dei tracciati ECG registrati può essere effettuata soltanto alla fine della raccolta dei dati, quindi non è possibile avere risultati ad interim.

E' stata messa a punto una campagna di sensibilizzazione sulla ricerca in corso con incontri e modalità appropriati per sensibilizzare una maggiore adesione al protocollo da parte dei familiari dei pazienti.

In questo studio è prevista l'esecuzione di un elettrocardiogramma di routine con misurazione della variabilità dell'intervallo R-R su un gruppo di familiari di primo grado di pazienti con PD e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso. Sono stati eseguiti gli ECG dei soggetti arruolati presso il Centro Parkinson dell'IRCCS San Raffaele Pisana. Presso il San Raffaele Cassino sono state effettuate riunioni finalizzate a stabilire le modalità di esecuzione dello studio. Si è definito il protocollo clinico definitivo e la modalità di raccolta dati.

E' stata effettuata divulgazione informativa del protocollo e delle sue procedure duran-

te gli incontri tenuti per la Giornata Nazionale del Parkinson.

Sono stati selezionati in prescreening 168 familiari di pazienti parkinsoniani. E' stata prevista l'esecuzione dell'ECG-Smell Olfaction test.

L'Unità di Epidemiologia clinica e molecolare ha collaborato alla stesura del protocollo finale e l'analisi dei dati sarà effettuata soltanto a fine studio.

*Anno 2009. Capofila del sottoprogetto: Valutazione e trattamento finalizzato al reinserimento lavorativo del disabile neurologico in età lavorativa in fase post- acuta*

Le persone con esiti di cerebrolesioni da cause vascolari o post chirurgiche possono presentare importanti limitazioni nello svolgimento delle attività di vita quotidiana - con conseguente perdita dell'efficacia e partecipazione - sia per quanto riguarda i ruoli nell'ambito della famiglia e delle aree sociali, sia relativamente all'occupazione.

Studi presenti in letteratura indicano come il reinserimento lavorativo di una persona affetta da una disabilità acquisita, sia una condizione altamente correlabile con il livello di qualità di vita, in quanto strumento fondamentale per la costruzione dell'identità personale e sociale.

Una adeguata riabilitazione dovrebbe consentire alla persona di ritornare a lavorare; dovrebbe comprendere un intervento e una formazione sul posto di lavoro, la partecipazione della persona in tutte le fasi e i gli aspetti del reinserimento lavorativo con una figura professionale che tuteli e sostenga, sul posto di lavoro, la persona stessa.

Lo studio si prefiggeva di individuare quante delle persone con esiti di cerebrolesioni, ricoverate presso l'IRCCS San Raffaele-Pisana di Roma, in età lavorativa che risultavano al lavoro al momento del ricovero, avessero effettivamente ripreso il lavoro dopo la dimissione.

Ulteriore obiettivo aera costituito dall'individuazione dei fattori ricorrenti che impedivano il ritorno al lavoro. Nel periodo compreso tra Novembre 2010 ed Ottobre 2012 sono state incluse nello studio tutte le persone (di sesso sia maschile che femminile) che al momento dell'accettazione all'IRCCS San Raffaele Pisana, avevano un'età compresa tra 18 e 65 anni e svolgevano un'attività lavorativa prima dell'evento patologico. Il danno e la conseguente limitazione funzionale dovevano essere causati da cerebro-lesione dipendente da problematiche vascolari o esiti di trauma cranico o forme espansive cerebrali di natura benigna.

Sono state somministrate le seguenti scale: Cumulative Illness Rating Scale (CIRS), Mini Mental State Examination (MMSE), Trunk Control Test (TCT), Motricity Index (MI), Indice di Barthel (BI), Misura di Indipendenza Funzionale (FIM), Scala di Rankin.

Si è preso in considerazione, come indicatore del ritorno al lavoro o meno, anche il Montebello Rating Factor Score (MRFS) che rappresenta il guadagnato alla dimissione rispetto al massimo guadagnabile della Functional Independence Measure (FIM).

E' stato sottoposto ai pazienti un questionario con l'obiettivo di raccogliere dati di tipo anagrafico e psico-sociale del paziente. Le valutazioni sono state eseguite all'ingresso (T0), alla dimissione (T1 ed al Follow Up (T2) a distanza di 6 mesi dalla dimissione.

Sono stati reclutati 90 pazienti, 21 dei quali sono stati esclusi dallo studio. Pertanto le analisi sono state effettuate su 69 persone, che avevano concluso il follow-up a Maggio 2013. Per quanto riguarda l'eziologia, la causa principale delle lesioni cerebrali era l'ictus ischemico (59.4%), seguito dall'ictus emorragico (20.3%). 27 persone (39.1%) sono ritornate al lavoro dopo la dimissione. All'analisi statistica univariata si è evidenziato che il MMSE ( $p= 0.004$ ), il TCT ( $p= 0.040$ ), il MI del lato destro ( $p= 0.039$ ), la FIM ( $p < 0.0001$ ) all'ingresso avevano un ruolo significativo nell'influenzare il ritorno al lavoro, nel

caso in cui evidenziassero limitazioni minori dell'altro gruppo. Si è visto anche come il maggior guadagno ottenuto rispetto il massimo guadagnabile (MRFS) aveva un ruolo importante ( $p=0.001$ ). Tra tutti gli item anagrafico-psico-sociali indagati solo quello relativo all'aver svolto un lavoro autonomo prima dell'evento lesivo, giocava un ruolo significativo nel consentire il ritorno al lavoro dopo la dimissione ( $p=0.043$ ).

L'analisi multivariata spiega più del 93% della predittività. Da questa analisi emerge che il MMSE all'ingresso ed il MRFS hanno una significatività importante nel predire il rientro al lavoro: chi ha una buona cognitività e guadagna di più rispetto a quanto può realmente guadagnare, ha maggiori probabilità di riprendere il lavoro.

Questo studio aveva lo scopo di individuare, attraverso l'indagine dei pazienti che non riprendevano a lavorare, quali sono, in fase post-acuta, i fattori ricorrenti che impediscono o rallentano il ritorno al lavoro e individuare percorsi professionalizzanti e mirati al reinserimento lavorativo.

Dai dati è possibile ricavare i "fattori" modificabili sui quali mettere in atto un programma specifico e mirato al reinserimento/inserimento lavorativo.

L'individuazione di questi indicatori predittivi permetterebbe di effettuare degli interventi più specifici per un rientro lavorativo subito dopo il danno cerebrale. Avere un buono stato cognitivo valutato con l' MMSE e soprattutto avere un buon recupero di capacità funzionali (MRFS) consente più facilmente un reinserimento lavorativo. E' pertanto fondamentale il lavoro di Terapia Occupazionale al fine di potenziare al massimo l'indipendenza della persona.

Anno 2009. Ricerca Finalizzata. Transcranial stimulation for inducing sleep: effectiveness of tdcS and TMS stimulation.

### **Bando Giovani Ricercatori**

*Si riportano i titoli dei progetti di ricerca della sezione Giovani Ricercatori del Bando Ricerca Finalizzata con i nominativi dei ricercatori:*

*Anno 2009. Neural basis of social intelligence: a lesion-based multicenter study on stroke patients.*

*Anno 2009. Neurocontrolled mechatronic prosthesis (NEMESIS).*

*Anno 2010. Modulation of calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI-1) and Stromal interaction molecule 1 (STIM1) activity as a new therapeutic strategy in stroke*

## **AREA DI RICERCA NEUROFISIOLOGIA**

### **Bando Giovani Ricercatori**

*Anno 2008: Does rehabilitation with a 10-Hz sensory stimulation improve brain rhythms and cognitive-motor performance in neurological patients? Towards Internet-based clinical applications at subjects' home*

### Laboratorio di Patologia Molecolare e Cellulare Giovani Ricercatori 2010

*U.O. Ruolo dello stato redox della proteina HMGB1 nella rigenerazione del tessuto cardiaco e nell'attività della cellula progenitrice cardiaca. F. Limana*

*U.O. Perivascular adipose tissue miRNAs: links between insulin resistance in type 2 diabetes and vascular disease.*

### Laboratorio di Biochimica dell' Invecchiamento Bando Giovani ricercatori 2010

*Study of the role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in neuronal homeostasis and its implication in Parkinson's disease etiopathogenesis*

L'S-nitrosilazione è una modificazione post-traduzionale che si basa sull'attacco dell'ossido nitrico (NO) a un gruppo tiolico (SH) di una cisteina presente in molecole a basso peso molecolare (amminoacidi e peptidi) o alto peso molecolare (proteine) producendo S-nitrosotoli (SNOs). In vivo, la quantità di SNOs dipende dalla produzione di ossido NO da parte delle NO sintasi (NOS) e dall'azione delle denitrosilasi, enzimi che catalizzano il distacco dell'NO dagli SNOs. L'equilibrio SH/SNOs è in gran parte mantenuto dall'enzima denitrosilante S-nitrosoglutathione reductasi (GSNOR).

Il progetto si prefigge i seguenti obiettivi:

1. Caratterizzare il ruolo dell'enzima GSNO reductasi (GSNOR) nell'omeostasi neuronale e nelle malattie neurodegenerative e neuromuscolari, quali il morbo di Parkinson (PD).
2. Identificare gli eventi di S-nitrosilazione quali processi determinanti nel modulare la perdita di popolazioni neuronali attraverso meccanismi di morte, con particolare riguardo a quelli mediati da autofagia.
3. Analizzare possibili correlazioni genotipo GSNOR/fenotipo PD attraverso screening genetici di pazienti PD.

Gli studi del gruppo di ricercatori, condotti su sistemi cellulari e animali che non esprimono GSNOR (GSNOR-KO), hanno contribuito a chiarire il ruolo di GSNOR nell'omeostasi neuronale e le implicazioni fisiopatologiche dello stress nitrosativo derivante dalla sua ablazione. In particolare si è evidenziato che sistemi GSNOR-KO possiedono mitocondri danneggiati e inefficienti in cui si assiste ad un riarrangiamento metabolico che si manifesta con l'aumento del consumo di ossigeno ascrivibile al solo complesso II per supplire la diminuzione di attività osservata per gli altri complessi. Dato che il complesso II non funge da pompa protonica, l'aumento della sua attività riesce in parte a mantenere i livelli di ATP, ma non garantisce la polarizzazione dei mitocondri.

L'abbassamento del potenziale transmembrana è un segnale che inizialmente induce la fissione del mitocondrio e l'allontanamento della porzione danneggiata dell'organello e, successivamente, la sua rimozione attraverso autofagia. I risultati ottenuti in questi anni hanno dimostrato che sistemi GSNOR-KO mostrano un aumento significativo dei livelli di S-nitrosilazione sia di Drp1 sia di Parkin, proteine che sottendono rispettivamente la frammentazione e l'autofagia selettiva dei mitocondri (mitofagia), determinando una condizione

in cui i mitocondri danneggiati vanno incontro a frammentazione ma si accumulano perché non sono rimossi attraverso mitofagia.

Questa condizione ricapitola, per molti aspetti, quella visibile in cellule senescenti o nei tessuti (specialmente nel sistema nervoso) durante in vecchiaia, indicando che la mancanza di GSNOR causa un invecchiamento precoce. Si è contribuito ad ampliare le evidenze sperimentali che potessero sostenere questa ipotesi conducendo analisi istologiche, molecolari e comportamentali su topi GSNOR-KO. In particolare, è stato identificato un aumento insolito di aggregati proteici ubiquitina e alfa-sinucleina positivi, sia nella corteccia che nel corpo striato di cervelli di topi GSNOR-KO a soli 2 mesi di vita. Questa condizione si associa ad una compromissione generale del controllo motorio, suggerendo che i topi GSNOR-KO presentano segni precoci ma distintivi di invecchiamento cerebrale. Inoltre, analisi metaboliche hanno dimostrato che topi GSNOR-KO giovani mostrano aumentati livelli di glucosio ematico e una significativa diminuzione del glicogeno epatico, tipici marcatori di una insulino-resistenza associata alla vecchiaia. La riduzione significativa del peso corporeo, associata a diminuita endurance e tono muscolare depongono inoltre a favore della presenza di uno stato di cachessia generale del genotipo GSNOR-KO, potenzialmente associabile a invecchiamento precoce. In dettaglio, è stato dimostrato che topi GSNOR-KO manifestano un fenotipo neuromuscolare (miopatia e neuropatia diffusa associata a deficit rigenerativo) tipico delle malattie correlate all'età (ad esempio neurodegenerazioni).

Al fine di verificare se GSNOR fosse modulata durante l'invecchiamento, sono stati analizzati i suoi livelli (proteici, di mRNA e attività) in cervelli e macrofagi di topo (e su macrofagi umani estratti da sangue periferico), dimostrando che l'enzima diminuisce con il tempo a causa di un silenziamento genico mediato da processi di metilazione sul suo promotore. In particolare, i dati ottenuti depongono a favore del fatto che gli enzimi TET che catalizzano la "demetilazione" della metilcitosina (meC) a idrossimetil citosina (hmeC) - e precisamente la sola TET1 - sono inibiti in associazione all'aumento di acido fumarico riscontrato nel topo GSNOR-KO in maniera età-dipendente. Il fumarato, intermedio del ciclo degli acidi tricarbossilici, è stato recentemente dimostrato agire da inibitore selettivo delle TETs, suggerendo quindi una possibile regolazione metabolica dell'espressione di GSNOR. Analisi in silico hanno messo in evidenza la presenza di isole CpG sul promotore GSNOR, e i dati ottenuti attraverso real time PCR hanno dimostrato che il rapporto meC:hmeC aumenta non solo in cervelli e macrofagi di topo, ma anche su macrofagi umani prelevati da individui di diversa età, in maniera proporzionale alla diminuzione di GSNOR. A conferma che solo l'attività demetilasi di TET1 regola l'espressione di GSNOR, sono state ottenute evidenze che indicano come la down-regolazione della proteina determina la frammentazione del reticolo mitocondriale mentre la sola espressione del suo domino catalitico è in grado di ripristinarne la corretta morfologia. Dato che il fenotipo molecolare e cellulare caratterizzato in questo studio ricapitola molte delle evidenze sperimentali che caratterizzano il PD, si è voluto in ultimo verificare l'esistenza di una eventuale correlazione genotipo/fenotipo tra il gene GSNOR e insorgenza del morbo di Parkinson (PD) analizzando, su pazienti affetti da PD, e controparte sana, alcune varianti alleliche di GSNOR. L'analisi comparativa non ha rivelato associazione significativa, ma, seppur preliminare, ha messo in luce un trend per le singole sostituzioni nucleotidiche (SNPs) rs1154404, rs1154412 e rs28730619, che necessita di essere confermato dall'aumento di casi sperimentali.

Complessivamente, i risultati ottenuti supportano l'idea che GSNOR potrebbe rappresentare un gene prototipo anti-invecchiamento che influisce sull'omeostasi mitocondriale, agendo sulla loro capacità dinamica e sulla corretta mitofagia, e la cui espressione, fisiologicamente, è regolata da intermedi del metabolismo energetico, come il fumarato, che sembra accumularsi durante l'età.

ALTRA TIPOLOGIA DI RICERCA

## AREA DI RICERCA NEUROMOTORIA

*Capofila del progetto: Studio clinico e farmacocinetico per valutare l'equivalenza terapeutica e la bioequivalenza del generico Levodopa-Benserazide (Teva Italia) verso l'originator (Madopar)*

Lo studio di fase IV di farmaco-epidemiologia è condotto su pazienti affetti da malattia di Parkinson da almeno 5 anni, in terapia stabile con levodopa. Non esistono studi di bioequivalenza ed equivalenza terapeutica con prodotti generici di levodopa commercializzati in Italia. Un prodotto con diversa biodisponibilità o con caratteristiche farmacocinetiche diverse dall' "originator" (il Madopar) risulterebbe nella comparsa di fenomeni "OFF" imprevedibili o nell'aggravamento delle discinesie nei pazienti con Malattia di Parkinson.

Non esiste uno studio di questo tipo su pazienti parkinsoniani. E' fondamentale conoscere le caratteristiche farmacocinetiche e di risposta clinica del prodotto utilizzato per ottimizzarne l'uso. La mancanza di questi dati fa sì che oggi il generico della levodopa sia scarsamente apprezzato dagli specialisti e spesso rifiutato dai pazienti.

I risultati di questo studio potranno, se positivi, infondere fiducia nei medici e nei pazienti sull'uso del generico in terapia, aumentarne le conoscenze e quindi migliorarne l'utilizzo.

L'obiettivo primario è quello di valutare l'equivalenza terapeutica, mediante scala Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) parte motoria (III), e la bioequivalenza, mediante studio del parametro farmacocinetico AUC, del generico della levodopa-benserazide (Teva Italia) confrontandolo con l'originator (Madopar®) nei pazienti con malattia di Parkinson. L'obiettivo primario dello studio è raggiunto se è ottenuta una non inferiorità alla scala UPDRS (valutazione clinica) e una bioequivalenza nel parametro primario di farmacocinetica (AUC).

Obiettivo secondario è quello di valutare con un questionario (CGI) l'indice di gradimento da parte dei pazienti. Obiettivo secondario di farmacocinetica consiste nel valutare la bioequivalenza nei seguenti end points secondari: concentrazione minima (Cmin), la concentrazione massima (Cmax), l'area sotto la curva (AUC), il tempo per raggiungere la concentrazione massima (Tmax) e l'emivita plasmatica dopo l'ultima dose (t1/2).

Nel corso dello studio è stato necessario apportare una modifica sostanziale al protocollo. La versione 2 del protocollo ha sostituito la precedente versione (in risposta al Parere Unico Sospensivo del Comitato Etico del 21/05/2012) apportando modifiche al farmaco oggetto di studio, in considerazione che:

- il prodotto Originator Sinemet (levodopa-carbidopa) 100+25 è di difficile reperibilità sul territorio nazionale;
- gran parte dei pazienti con Malattia di Parkinson oggi assume levodopa sotto forma dell'Originator Madopar (levodopa+benzerazide);
- al momento della stesura del protocollo non era ancora presente il prodotto generico di levodopa + benzerazide, che è invece attualmente disponibile;
- il generico della levodopa-carbidopa (Hexal) è di difficile mascheramento;
- i prodotti succitati, Originator e generici, hanno un costo equivalente.

E' stata messa a punto la scheda della raccolta dei dati dei pazienti (CRF, cartacea), e del consenso informato. Si tratta di uno studio a carattere bi-centrico (IRCCS San Raffaele Pisana, centro promotore e coordinatore e Centro neurologico dell'Università G. D'Annunzio di Chieti) per il quale quindi è stato programmato un incontro di start-up con gli investigators nel mese di ottobre 2013, per dare avvio alle procedure.



I farmaci oggetto dello studio - Levodopa benserazide (Teva italia) e Madopar - sono entrambi in commercio.

Utilizzando i dati di altri trials clinici con la levodopa (Fahn S, N Eng J Med 2004; 351: 2498-2508) e considerando la struttura bi-centrica dello studio, si è stimato che 60 pazienti debbano essere reclutati per osservare una differenza tra i 2 trattamenti inferiore a 3 punti della UPDRS motoria. I pazienti sono randomizzati ai due gruppi di trattamento, secondo un rapporto di 1:1. Un ulteriore campione è stato calcolato per lo studio della PK. Data la variabilità della levodopa si è ritenuto opportuno fissare a 16 il numero di questi pazienti. L'arruolamento è competitivo tra i due centri, e limitato al raggiungimento del target dei pazienti previsti.

Si stima il completamento dell'arruolamento dei pazienti in 12 mesi a partire dal 01/2014.

## **Bando CCM 2010**

*Unità Operativa del progetto: Nuove conoscenze e problematiche assistenziali nell'ictus cerebrale: un programma strategico di ricerca e sviluppo.*

*La presa in carico delle persone con ictus cerebrale: implementazione dei percorsi di cura integrati e degli strumenti di gestione. Obiettivo 2 dal titolo: Il percorso riabilitativo dopo ictus cerebri: sperimentazione ragionata della continuità terapeutica*  
*Progetto coordinato dalla Regione Emilia Romagna*

Lo studio prevede un'indagine epidemiologica sui percorsi delle persone colpite da ictus cerebrale al primo evento, dalla fase acuta (ingresso in ospedale per acuti) al passaggio - laddove indicato - alle strutture di riabilitazione intensiva ed in fine alla dimissione e al follow-up a sei mesi dalla dall'episodio acuto.

Gli obiettivi primari si prefiggono di: evidenziare le criticità in questi percorsi, analizzare le caratteristiche clinico-assistenziali proposte, individuare i fattori predittivi all'ingresso in fase acuta di un outcome positivo e la messa a punto delle procedure corrette per l'organizzazione del percorso assistenziale in queste persone.

Hanno partecipato al progetto 178 strutture, di cui 28 ospedali per acuti, mentre le restanti 150 sono strutture di riabilitazione ospedaliera e/o territoriale.

Relativamente alla raccolta dei dati clinici delle persone colpite da ictus cerebrale, sono stati inseriti nel database on line 1202 pazienti distribuiti su 7 delle 8 regioni partecipanti (la Basilicata inserirà i pazienti in studio successivamente): 861 pazienti in fase acuta, 341 in fase riabilitativa, 258 in fase riabilitativa ospedaliera e 83 in fase riabilitativa post-ospedaliera.

La fase di raccolta dati relativa al follow up è stata completata, nel corso del 2013, per 770 pazienti.

L'età media nazionale dei pazienti colpiti da ictus cerebrale è di 72,9 anni (l'età media per regione varia da 68,2 anni relativi alla Campania a di 76,6 anni per i pazienti dell'Umbria). La distribuzione per sesso è di 627 pazienti maschi (52%) e 575 pazienti femmine (la percentuale più alta a livello regionale per i pazienti maschi è del 56% in Toscana, mentre quella più bassa è del 43% in Sicilia). Per quanto riguarda il titolo di studio, a livello nazionale, la quota più rilevante è quella dei pazienti che hanno una licenza elementare (39,4%), seguita da quella di chi è in possesso di una licenza media inferiore (17,2%) e di chi è in possesso del diploma di scuola media superiore (14,7%); solo il 5,7% dei pazienti è laureato mentre il 7,2% non possiede alcun titolo di studio. Per quanto riguarda l'occupazione dei pazienti prima dell'Ictus, a livello nazionale emer-

ge che, data evidentemente l'età prevalente dei pazienti, il 69,5% di essi è in pensione mentre il 16,8% risulta occupato; il 5,2% risulta costituito da casalinghe mentre solo l'1,7% risulta disoccupato.

Fase Acuta:

I dati sui pazienti per reparto di rilevazione in fase acuta, a livello nazionale, indicano che il 50,38% dei pazienti è stato rilevato in Stroke Unit, il 23,6% in reparti di Neurologia e l'11,8% in reparti di Medicina interna; solo il 6,36% dei pazienti risulta rilevato in reparti di Geriatria, mentre l'1,84% in Rianimazione e l'1,51% in Neurochirurgia.

Per quanto riguarda il tasso di mortalità dei pazienti, a livello nazionale, il numero largamente prevalente dei pazienti rilevati, pari al 93%, risulta vivente, mentre il 7% risulta deceduto.

Sul totale dei pazienti rilevati, lo screening per disfagia ha avuto esito positivo per il 24%, esito negativo per il 57% di essi; al 9% di essi non è stato effettuato lo screening mentre per il 10% il dato è mancante.

I pazienti che sono stati alzati rapidamente dal letto risultano essere il 71% sul totale, mentre il 22% non risultava in grado. Per il 5% il dato risulta mancante, per il 2% non noto.

Relativamente alla terapia a cui sono stati sottoposti i pazienti in fase acuta, a livello nazionale, risulta che al 59% dei pazienti sono stati somministrati antiaggreganti, al 9% anticoagulanti orali, al 2% ipocolesterolizzanti. I pazienti con trattamento insulinico costituivano il 2%; quelli sottoposti a trombolisi intravenosa erano il 3% e quelli sottoposti a trombolisi intraarteriosa l'1%; non risultavano pazienti sottoposti né ad endoarteriectomia carotidea né ad angioplastica o stenting carotideo. Per il 24% dei pazienti non veniva segnalata alcuna terapia.

Relativamente alle complicanze va sottolineato che i dati sono mancanti per il 69% dei pazienti; per l'11% dei pazienti esse consistevano in iperpiressia, per il 5% in incontinenza urinaria, per il 4% in infezioni urinarie, per il 3% in iperglicemia, per il 3% in broncopolmonite, per l'1% in trombosi venosa, per l'1% in ritenzione urinaria, per l'1% in decubiti, per l'1% in crisi epilettiche. Il 55% dei pazienti effettuava una riabilitazione in fase acuta, mentre il 43% no; per l'1% dei pazienti il dato sulla riabilitazione non è stato raccolto, mentre per un altro 1% il dato non si può evincere dalla documentazione.

Relativamente alla diagnosi clinica finale, per il 44% dei pazienti risultava una diagnosi di Total Anterior Circulation Ischemia (TACI), per il 17% di POsterior Circulation Ischemia (POCI), per il 21% di Partial Anterior Circulation Ischemia (PACI), per il 12% di Lacunar Infarct (LACI), per il 2% di emorragia intracerebrale e per il 2% di emorragia subaracnoidea. Nel 2% il dato è mancante.

Come destinazione alla dimissione dalla fase acuta, risulta che il 50% dei pazienti sarebbe rimasto a casa con altri familiari, il 29% sarebbe andato in una struttura riabilitativa, il 4% a casa da solo, il 3% in casa di riposo, RSA o strutture analoghe mentre l'1% avrebbe avuto un'altra destinazione; nel 7% dei casi il dato non è noto; il 6% dei pazienti risultava deceduto.

Fase Riabilitazione Ospedaliera (solo per Emilia-Romagna, Toscana, Umbria, Lazio):

Per quanto riguarda il reparto di riabilitazione ospedaliera, il 74% dei pazienti veniva ricoverato in codice 56, il 18% in codice 60, il 2% in codice 75; l'1% ricoverato in altri reparti mentre per il 5% dei pazienti il dato è mancante.

I dati sull'incontinenza indicavano che nel 40% dei pazienti si tratta di incontinenza fecale e nel 21% di incontinenza urinaria; per il 39% dei pazienti il dato è mancante.

Follow-up:

Nella fase del follow up a sei mesi, i dati sulla condizione indicano che i pazienti risulta-

vano per l'90% viventi mentre il 10% risultava deceduto.

Per quanto riguarda la condizione abitativa dei pazienti al momento del follow-up, risultava che il 72% visse a casa con altri mentre il 9% a casa da solo; il 4% era già ricoverato in casa di riposo, RSA o strutture analoghe e il 2% in altre strutture; per il 13% dei pazienti rilevati il dato risultava mancante. Sull'occupazione dei pazienti al momento del follow up emergeva che il 65% di essi era in pensione mentre il 13% risultava occupato; il 4% risultava costituito da casalinghe, mentre il 3% risulta vadisoccupato; il dato risultava non noto per il 2% dei pazienti e mancante per il 13% di essi. Nell'85% dei casi non risultava essere sopraggiunta recidiva dopo l'ictus mentre nel 3% dei casi sì; per l'11% dei pazienti il dato era mancante, per l'1% non noto. Il 32% dei pazienti al momento del follow-up risultava essere ancora o essere stato sottoposto a fisioterapia. Il 7% dei pazienti al momento del follow-up risultava essere ancora o essere stato sottoposto a logoterapia, mentre l'85% dei pazienti momento del follow-up risultava essere ancora o essere stato sottoposto a terapia occupazionale.

## **Filas (Finanziaria Laziale di Sviluppo) 2010**

*Protesi di arto superiore attiva a controllo neurale bidirezionale. Progetto coordinato da Ortopedia in collaborazione con Università Campus Biomedico e IRCCS San Raffaele Pisana.*

## **Progetti Unione Europea**

*SCRIPT: Supervised Care & Rehabilitation Involving Personal Tele-robotics.*

Tale progetto prevede la collaborazione con le seguenti Università:

- University of Hertfordshire Higher Education Corporation, England
- R.U.Robots Limited of PO Box 248, Manchester, UK
- University of Sheffield
- Universiteit Twente, Enschede, The Netherlands.
- Roessingh Research and Development BV
- MOOG BV, Nieuw Vennep, The Netherlands
- User Interface Design GmbH, Ludwigsburg Germany

*eWall for Active Long Living - e-Wall*

Tale progetto prevede la collaborazione con le seguenti Università:

- Aalborg Universitet
- Hewlett Packard Italiana Srl
- Ericsson Nikola Tesla D.D.
- Roessingh Research And Development Bv
- Cure Centrum Fur Die Untersuchung Und Realisierung Endbenutzerorientierter Interaktiver Systeme
- Research And Education Laboratory In Information Technologies
- Universitatea Politehnica Din Bucuresti
- Ss. Cyril And Methodius University In Skopje
- Javna Ustanova Univerzitet Crne Gore Podgorica

- Technical University Of Sofia
- Sveuciliste U Zagrebu Fakultet Elektrotehnike I Racunarstva
- Stelar Security Technology Law Research Ug

## AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO

### Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL)- Bando 2010

#### *Studio del ruolo dell'ambiente lavorativo nella patogenesi del Morbo di Parkinson*

Nella maggior parte dei casi le cause della Malattia di Parkinson (MdP) restano sconosciute, e modelli di tipo monogenico non sembrano molto verosimili. Probabilmente ci si trova di fronte a complesse interazioni di molti fattori di tipo genetico e non-genetico. La MdP tende a ricorrere nella stessa famiglia più frequentemente di quanto possa avvenire per effetto del caso. Questo fenomeno viene ormai confermato in modo molto consistente dagli studi epidemiologici. Circa il 15-25% dei pazienti riferisce infatti la presenza di familiarità positiva. La ricorrenza familiare di una malattia non è sinonimo di ereditarietà; esistono infatti molti altri fattori, come esposizioni ambientali, occupazionali, ecc. che tendono a ricorrere nelle famiglie, e potrebbero svolgere un ruolo nel determinare la aggregazione familiare di malattia.

La potenziale multifattorialità dell'eziologia della MdP, combinata alla presenza di un quadro di debole suscettibilità genetica sostiene un modello di interazione gene-ambiente come modello eziologico preferenziale. In associazione con l'identificazione dei fattori di suscettibilità genetica la letteratura ha riportato alterazioni nella distribuzione in casi e controlli di alcuni fattori fenotipici, fra cui l'instabilità genetica ed il danno al DNA.

A completamento delle variabili considerate nella definizione del modello eziopatologico della MdP, una serie di variabili ambientali sono state investigate in studi di tipo clinico ed epidemiologico. Fra queste, vari aspetti dello stile di vita, la dieta, l'occupazione, la residenza. Anche parametri di funzionalità fisiologica sono stati in varie occasioni considerati come predittori dello sviluppo di malattia. Attualmente le sostanze chimiche accreditate per un possibile ruolo neurotossico sono: solventi organici, fumi esausti, monossido di carbonio, metalli pesanti, erbicidi e pesticidi. È stato evidenziato un accumulo di pesticidi in reperti autoptici di soggetti affetti da MdP, proprio a livello della sostanza nigra. E' possibile che questo meccanismo possa attivare a livello della sostanza nigra, con produzione locale di radicali liberi. In soggetti non esposti l'età di esordio della MdP è intorno ai 61 anni mentre nei soggetti invece che presentano una storia positiva di esposizione professionale a solventi e metalli è stato evidenziato un anticipo dell'esordio della malattia. Tra i metalli coinvolti vi sono: mercurio, rame e manganese, composti di piombo, ferro e rame zinco ed alluminio. Nonostante questi dati, per la maggior parte aneddotici, non esistono dati che indicano che alcuni ambienti lavorativi possano essere una concausa per l'insorgenza della malattia di Parkinson. Questo progetto vuole studiare l'incidenza e la prevalenza della MdP con uno studio caso controllo ed eventuali associazioni a determinate professioni o ambienti lavorativi. Si studia quindi l'incidenza della malattia in una popolazione generale di pazienti investigando l'ambiente lavorativo ed esposizione a tossici ambientali. Si studia inoltre una popolazione potenzialmente esposta a tossici ambientali e si valuta la prevalenza della malattia in questa popolazione.

Obiettivo di questo studio osservazionale di tipo caso controllo è il calcolo dell'Odds Ratio per i singoli fattori di rischio, di tipo genetico Single-nucleotide polymorphism (SNP), ambientale (Occupazione, stile di vita, etc.), clinici (stipsi, etc.). Ulteriori endpoints riguardano: i) la valutazione dell'interazione gene-ambiente fra le SNPs valutate nei gruppi in studio con i fattori di rischio della malattia; ii) validazione dei principali meccanismi connessi con le fasi precoci della malattia; iii) creazione di un biorepository per lo studio dei fattori di rischio della MdP.

La popolazione dei casi è rappresentata dai soggetti con diagnosi confermata di MdP afferenti agli ambulatori del servizio di neuroriabilitazione dell'IRCCS San Raffaele Pisana e San Raffaele Cassino. I controlli, appaiati per sesso ed età ( $\pm 5$  anni) sono selezionati fra gli afferenti al centro riabilitativo San Raffaele Pisana e San Raffaele Cassino per prestazioni non legate a patologie di tipo neurodegenerative.

A tutti i soggetti che hanno dato il consenso a partecipare allo studio è somministrato un questionario da personale addestrato. L'intervista, proposta prima degli accertamenti clinici di routine dura circa 15 minuti.

La dimensione dello studio è stata valutata con il software dedicato Power 3.0. I parametri inseriti sono stati scelti sulla base della prevalenza della familiarità con pazienti affetti dalla MdP nella popolazione generale. Pertanto, dato  $p1 = .20$ ; Ratio Case to Controls 1:1;  $\alpha = 0.05$ ;  $1-b = .80$ , per trovare significativo un OR di 1.5 saranno necessario 448 casi di MdP ed altrettanti controlli (circa 1000 soggetti in complessivo).

Il questionario predisposto per il progetto di ricerca dal titolo "Studio del ruolo dell'ambiente lavorativo nella patogenesi del morbo di Parkinson" è stato somministrato a 610 soggetti ed ha rilevato la presenza per la maggior parte di pazienti classificati come CASI (65.9%) vs CONTROLLI (34.1%).

**Tab.1**

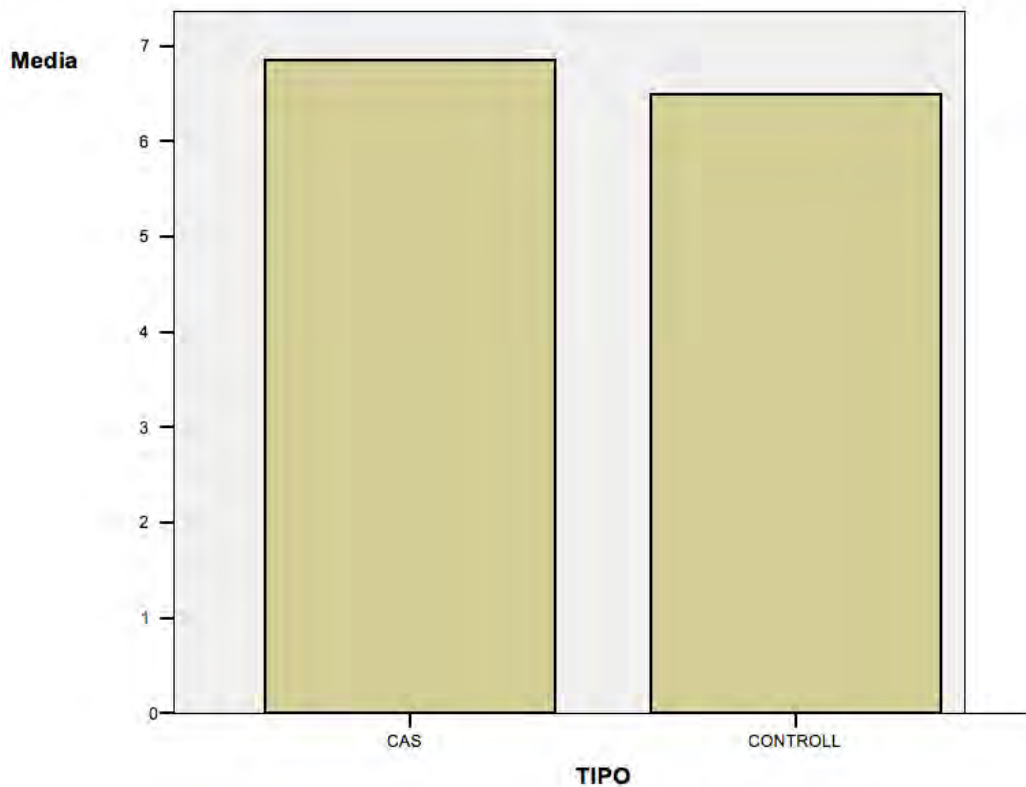
	TIPO PAZIENTE			
	Frequenza	%	% valida	% cumulata
<b>CASO</b>	402	65,9	65,9	65,9
<b>CONTROLLO</b>	208	34,1	34,1	100,0
<b>Totale</b>	610	100,0	100,0	

La rilevazione dei soggetti intervistati mostra che il campione sia rispetto alla variabile sesso (vedi tab.2) e sia rispetto al tipo paziente per età media (vedi grafico 1) è ugualmente rappresentato; il livello di istruzione è medio alto (i diplomati sono il 38.9% e i laureati 22.5%); l'età media è di 67 anni con deviazione standard 9.65, il peso medio è di 72.36 con dev standard 14.41 e altezza media di 167.11 con dev standard 9.15.

**Tab.2**

	SESSO			
	Frequenza	%	% valida	% cumulata
<b>FEMMINA</b>	307	50,3	50,3	50,3
<b>MASCHIO</b>	303	49,7	49,7	100,0
<b>Totale</b>	610	100,0	100,0	

## Grafico 1



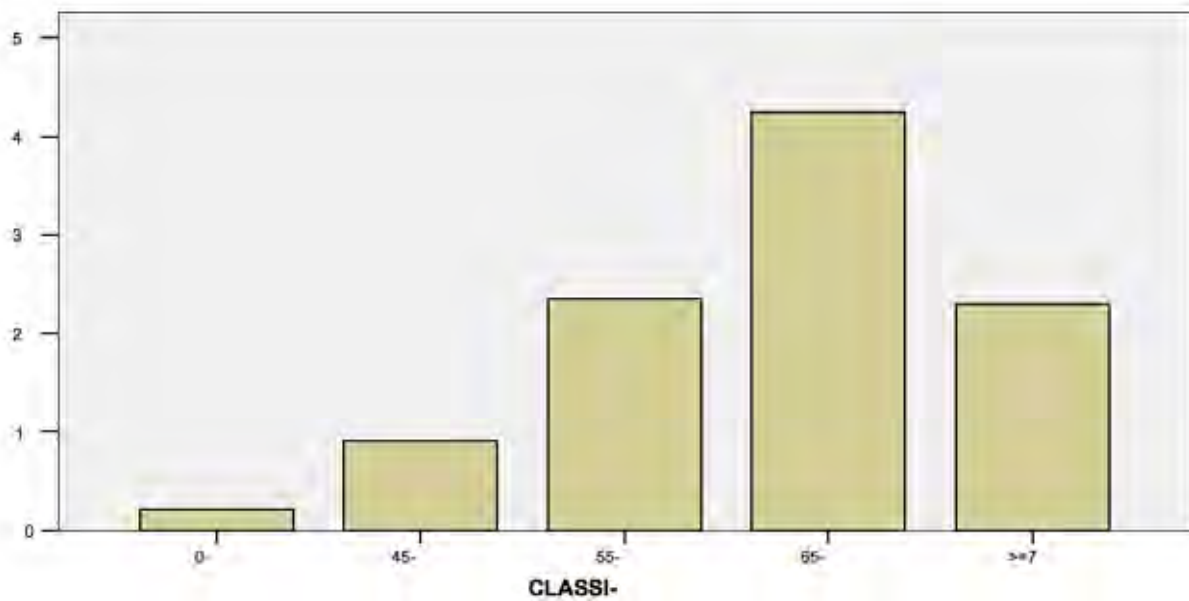
Tab. 3

Classi di età	Frequenza	CLASSI-ETA'		
		%	% valida	% cumulata
0_44	13	2,1	2,1	2,1
45_54	55	9,0	9,0	11,1
55_64	143	23,4	23,4	34,6
65_74	259	42,5	42,5	77,0
>=75	140	23,0	23,0	100,0
<b>Totale</b>	<b>610</b>	<b>100,0</b>	<b>100,0</b>	

I soggetti sono per lo più concentrati nella penultima classe (42.5%) nella quale ricadono tendenzialmente persone con età in cui si inizia ad andare in pensione; altro aspetto da notare è la quasi uguaglianza delle due classi 55-64 (non ancora età del tutto pensionabile) e 75+ anni (sicuramente età pensionabile). Tali considerazioni si evincono meglio dal grafico 2.

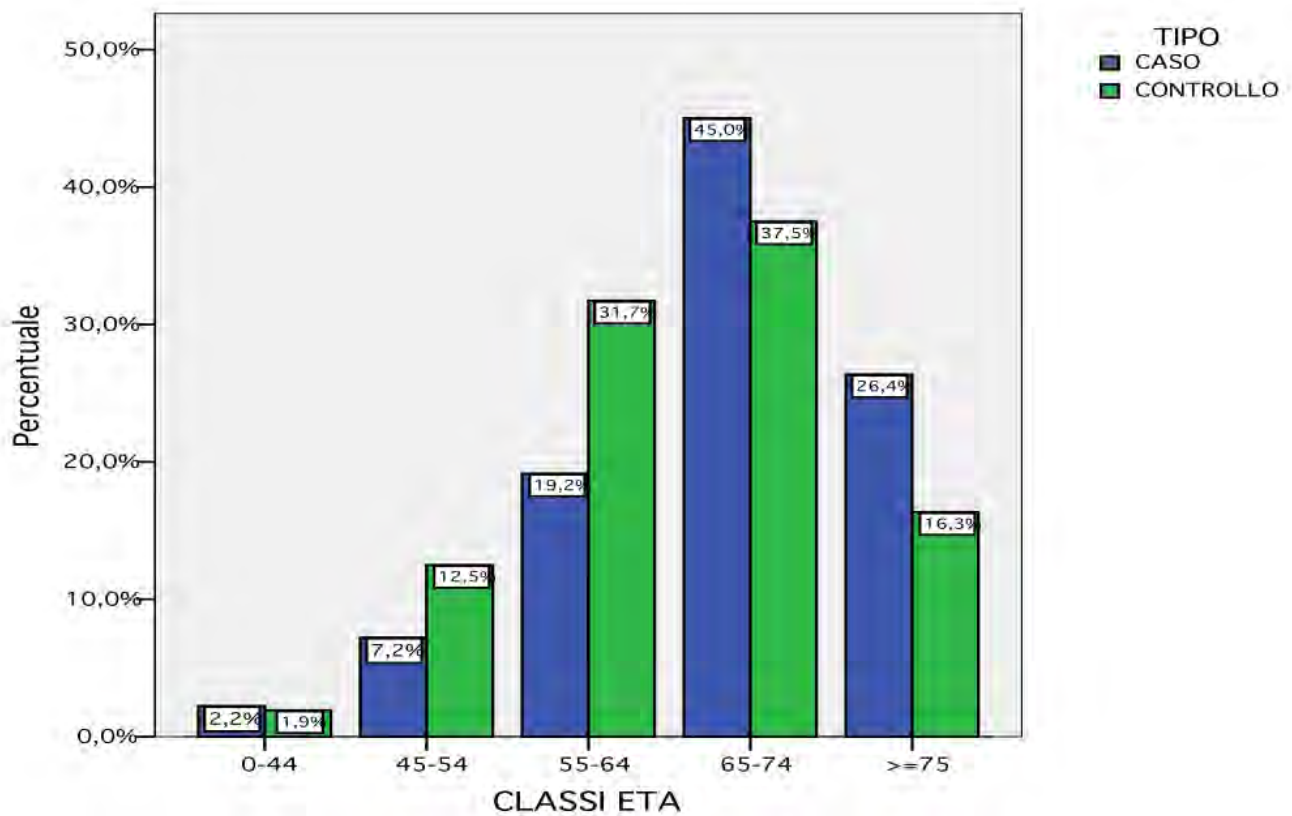
## Grafico 2

Percentuale



Dal grafico 3 si evince che nella classe di età 66-74 anni le percentuali CASO vs CONTROLLO sono le più alte rispettivamente 45% e 37.5%.

## Grafico 3



L'analisi eseguita distinguendo i gruppi per sesso mostra che nel sottogruppo femminile le percentuali di CASO vs CONTROLLO sono invertite rispetto al sottogruppo maschile: infatti i casi femminili sono il 40.5% mentre i casi maschili sono il 59.5% (vedi grafico 4). In base alla significatività del Chi –quadrato di Pearson è possibile affermare che il sesso e la tipologia paziente sono effettivamente correlati (al livello del 5%) come riporta la tabella 4.

Tab. 4

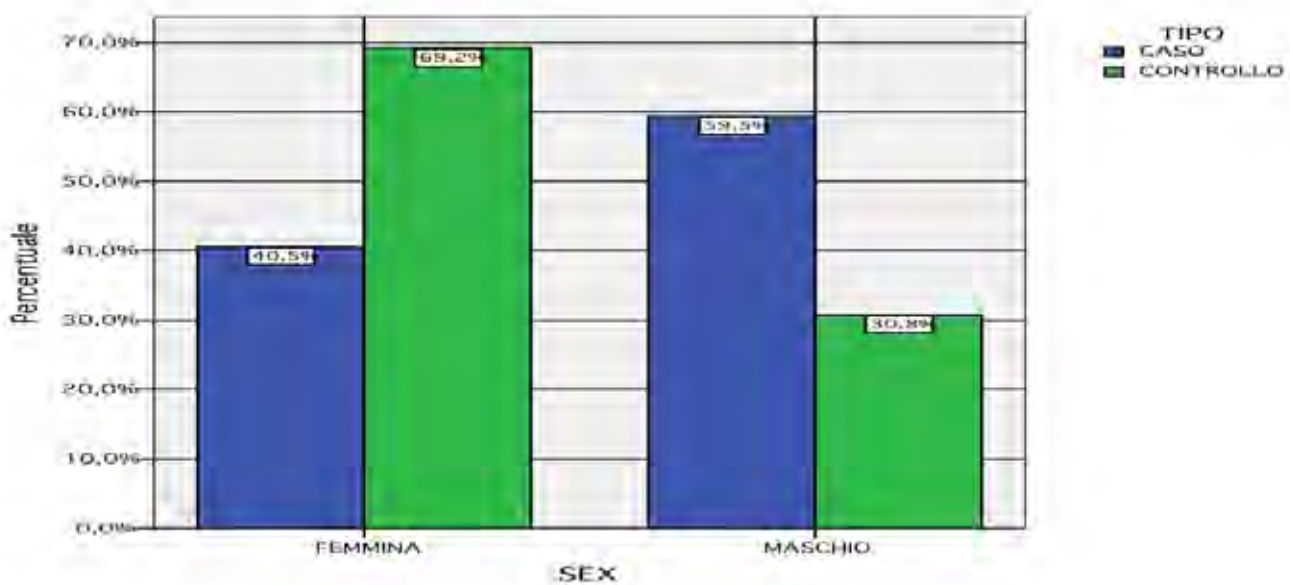
		TIPO PAZIENTE	
		CASO Conteggio	CONTROLLO Conteggio
SEX	FEMMINA	163	144
	MASCHIO	239	64

Test Chi-quadrato di Pearson

SEX	TIPO	Chi-quadrato	df	Sig.
		45,113	1	,000(*)

La statistica Chi-quadrato è significativa al livello 0.05.

Grafico 4



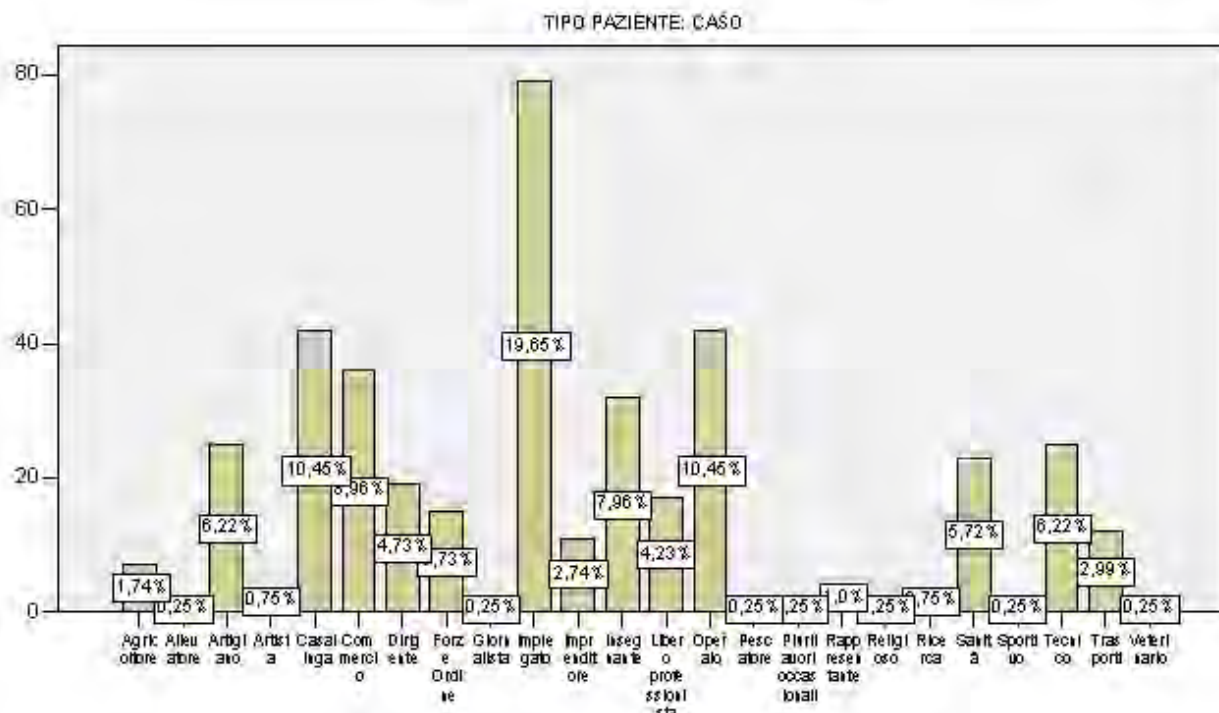
Essendo il progetto volto allo studio dell'incidenza dell'ambiente lavorativo all'origine della malattia di Parkinson il sottogruppo CASI della tipologia paziente mostra che la prima attività lavorativa svolta è stata l'impiegato (19.65%) seguita dall'operaio e dalla casalinga con uguale valore (10.45%) come mostra il grafico 5.

Analizzando le classi di durata della prima attività lavorativa notiamo che la classe 20-29 anni e quella 40-49 anni hanno la stessa percentuale 13.5% e che la prima (1-9 anni) e la quarta classe (30-39 anni) sono quasi uguali 23.1% e 24.6%.



Grafico 5

PRIMA ATTIVITA' LAVORATIVA



AREA DI RICERCA CEFALEA E DOLORE NEUROPATICO

*L'impatto della cefalea cronica per la sanità pubblica*

Secondo le recenti stime dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, i pazienti affetti da emicrania nel mondo sono 1.012.944.000 (Lim et al 2012). L'emicrania è quindi la terza malattia più frequente del genere umano e si conferma la malattia neurologica più disabilitante (2.6 volte più della Sclerosi Multipla, 3.3 volte più dell'Alzheimer, 40.6 volte più del Parkinson).

L'emicrania cronica (EC), cioè una cefalea presente >15 giorni al mese, deriva dall'evoluzione progressiva di un'emicrania in forma episodica (EE). Si calcola che ogni anno approssimativamente il 2.5% dei soggetti affetti da EE presenti una trasformazione in forma cronica (Manack AN et al 2011) tale che può raggiungere il 14% se rilevata in centri specialistici (Katsarava et al 2004). La prevalenza della EC nella popolazione generale varia considerevolmente in rapporto all'area geografica ed anche in relazione ai diversi criteri classificativi. Essa oscilla dal 0.5% al 5.1%, con una prevalenza media del 1.4%-2.2%, simile a quella della epilessia (Natoli JL et al 2010).

Esistono dei fattori di rischio riconosciuti per la trasformazione dell'emicrania episodica (EE) in EC: sesso femminile, età, basso livello socioeconomico, separazione o divorzio, eventi stressanti, obesità, russamento, patologie dolorose concomitanti, traumi cranici o cervicali, abuso di caffeina, iperuso di farmaci, ansia, depressione, presenza di allodinia durante l'attacco emicranico ed una frequenza degli attacchi emicranici > 6/mese (Lipton RB et al 2009).

E' dimostrato che i soggetti con EC, rispetto a quelli con EE, hanno maggiori comorbidità psichiatriche, cardiocerebrovascolari, respiratorie, dolori cronici, osteoartrosi e obe-

sità (Buse et 2010; Bigal et al 2008) e imponenti costi economici diretti (spese mediche, farmaci, ospedalizzazione) ed indiretti (mancata produttività, assenteismo); costa infatti in Italia circa 3.5 miliardi di euro all'anno (Bloudek LM et al 2012).

L'EC è una patologia ad alto impatto economico sia per il soggetto sia per il sistema sanitario.

Lo studio longitudinale americano AMPP (American Migraine Prevalence and Prevention) ha stimato una media di costi annuali per persona, includendo i costi diretti e quelli indiretti, circa 4.4 volte maggiori per i soggetti affetti da EC rispetto a quelli con EE (7.750\$ vs 1.757\$) (Munakata et al 2009). Le spese mediche, l'accesso al pronto soccorso, le visite mediche generali o specialistiche sono significativamente maggiori nei soggetti con EC rispetto a quelli con EE con costi totali diretti per individuo oltre 10 volte superiori e quasi 50 volte maggiori rispetto a soggetti con altre forme di cefalea episodica (Lantéri-Minet M et al 2003).

I soggetti affetti da EC hanno maggiore disabilità (scala MIDAS: 63.4 EC vs 10 EE) (Lipton 2010), significativa riduzione della qualità della vita (Lantéri-Minet M et al 2011), minore produttività, e minor probabilità di avere impieghi full time (37.8% EC vs EE 52,3%) e circa il doppio di probabilità di essere disoccupati (20% EC vs EE 11.1%) (Buse et al 2010; Blumfeld et al 2011). Più della metà dei pazienti con EC (57.4%) ha riportato una perdita di 5 gg di lavoro o scuola in più nei precedenti 3 mesi rispetto a quelli affetti da EE (24.3%) ed il 58.1 % una ridotta produttività in confronto al 18.2% nella EE (Buse et al 2012).

Malgrado l'alta prevalenza e la disabilità della EC, solo il 6.6% dei soggetti con EC assume un farmaco preventivo antiemcranico, i restanti 84,6% solo farmaci analgesici per l'attacco, in prevalenza antinfiammatori, che per altro risultano efficaci solo nella metà dei casi (Lantéri-Minet M et al 2003). Non stupisce come la metà dei soggetti con EC vada incontro alla medication overuse headache (MOH) con un rischio globale che si aggira tra 31.1%-69.2% (Prencipe M et al 2001; Zwart et al 2004; Castillo et al 1999). Solo ¼ dei pazienti con EC ritorna a forma episodica in un periodo di 2 anni, quelli che continuano ad essere cronici malgrado la profilassi hanno un aumento della disabilità correlato alla cefalea (Manack A et al 2010). L'utilizzo di esami diagnostici e strumentali nei soggetti con CDH è molto alto. Nel lavoro di Lantéri-Minet (Lantéri-Minet M et al 2003) si è stimato che il 53,8% dei soggetti avesse effettuato esami strumentali per la cefalea.

Da queste osservazioni, sotto l'egida dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), l'IRCCS San Raffaele Pisana insieme a l'IRCCS Istituto Neurologico Carlo Besta – Milano; l'IRCCS – Istituto Neurologico delle Scienze Neurologiche di Bologna – Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM) – Alma Mater Studiorum – Università di Bologna; Centro Cefalee, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Parma, Parma; hanno creato un registro per l'emigrania cronica, per meglio caratterizzare ed affrontarla.

Il registro si prefigge diversi obiettivi:

- Clinico-assistenziali: garantire identificazione, visibilità ed accesso alle cure per la popolazione affetta da EC.
- Economici: consentire la riduzione dell'enorme aggravio economico per il SSN e per la società rappresentato da tali pazienti in termini di costi diretti (visite mediche, procedure diagnostiche o terapeutiche inutili/inadeguate, accessi al pronto soccorso o ospedalizzazioni) ed indiretti (riduzione della produttività, assenteismo), mediante il controllo del grado di appropriatezza diagnostico-terapeutica dei diversi centri/ospedali, promuovendo l'applicazione delle vigenti linee guida AGENAS

([www.agenas.it/agenas\\_pdf/Cefalea%20nell'adulto%20.pdf](http://www.agenas.it/agenas_pdf/Cefalea%20nell'adulto%20.pdf)). Regolamentare l'accesso dei pazienti alle moderne procedure terapeutiche ad alto costo (impianto di neurostimolatori, tossina botulinica ecc).

- Medico-legali: definire i criteri di farmacoresistenza nella EC allo scopo di ottenere l'estensione a tutto il territorio nazionale di quanto previsto dalla Circolare Regionale della Lombardia n° 30 del 14/12/06 pubblicata sul BUR regionale il 15/1/07 in tema di invalidità civile per le cefalee croniche farmacoresistenti.
- Scientifici: creare il primo database al mondo sulla EC. Al database clinico-epidemiologico sarà associato un database biologico che consentirà lo sviluppo di studi di correlazione fenotipo-biotipo (biobanca, system-medicine).

Riferimento del registro saranno i medici operanti nei centri cefalee ospedalieri, universitari e territoriali italiani selezionati.

Sono stati coinvolti: neuroepidemiologo, biostatistico, neurologi dei centri selezionati, data manager, biologo.

I dati demografici, epidemiologici e clinici dei pazienti vengono raccolti mediante una apposita scheda su un portale web creato ad hoc.

Sono identificati 2 neurologi di riferimento disponibili a fornire per via telefonica, web o fax informazioni dettagliate su procedure ecc.

## **AREA DI RICERCA CARDIOVASCOLARE**

### **Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie (Ccm) - Bando 2010**

*Il monitoraggio della qualità dell'assistenza in RSA: valutazione di un set integrato e multidimensionale di indicatori quality ed equity oriented ad elevata fattibilità di rilevazione e trasferibilità di sistema*

### **Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie (Ccm) - Bando 2012**

*Piattaforma Italiana per lo studio delle polimorbidità:scenario epidemiologico, aspetti clinici e farmacologici, prospettiva di genere e contesto farmaco-economico.*

Ente responsabile: Istituto Superiore di Sanità

Istituti coinvolti: IRCCS San Raffaele Pisana e Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari (AGENAS).

L'invecchiamento generale della popolazione del nostro Paese, frutto delle migliorate condizioni di vita e degli interventi preventivi e terapeutici del nostro Sistema Sanitario Nazionale, è di per sé un fatto positivo, anche se determina inevitabilmente un'aumentata prevalenza di malattie croniche, che in alcuni casi coesistono.

I dati ISTAT più recenti indicano che gli anziani di età superiore a 75 anni sono in genere affetti contemporaneamente da più di una patologia cronica (principalmente a carico dell'apparato cardiovascolare e di quello respiratorio).

Queste patologie, interagendo fra di loro, si presentano spesso in maniera atipica, rendendo più difficile la formulazione di una diagnosi precisa sulla patologia prevalente, con necessità di ripetuti ricoveri ospedalieri. Il paziente con polimorbidità utilizza, infatti, una proporzione rilevante delle risorse sanitarie. Un altro fattore di rischio per un alto numero di ricoveri è rappresentato, oltre che dall'età, da condizioni socio-economiche

svantaggiate.

Un'altra conseguenza della polimorbidity in questi pazienti è l'assunzione contemporanea di più farmaci (politerapia) che spesso hanno complesse interazioni fra di loro. La politerapia nel paziente "complesso" è di per sé causa di patologie iatrogene, dovute alle inevitabili interazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche. Purtroppo, le malattie iatrogene sono responsabili di oltre il 10% delle ospedalizzazioni tra i pazienti anziani (e almeno del 20% degli ultra-ottantenni). I farmaci maggiormente coinvolti nel causare patologie iatrogene sono i farmaci cardiovascolari, i neurolettici ed i FANS.

La complessità delle patologie croniche dipende quindi non soltanto dal numero di patologie che si presentano contemporaneamente nello stesso individuo ma anche e soprattutto dalla severità di ciascuna di esse e dalle interazioni tra i farmaci utilizzati per il trattamento di ciascuna patologia.

Tra l'altro, i dati di efficacia e sicurezza sull'uso dei farmaci negli anziani sono scarsi e derivano maggiormente da dati di farmacovigilanza che da evidenze cliniche (la gran parte dei trial clinici hanno escluso per molto tempo i soggetti anziani con polimorbidity e in politerapia).

Le differenze di genere rivestono un ruolo importante nel determinare differenti risposte farmacodinamiche e farmacocinetiche e nel determinismo delle patologie iatrogene nei pazienti con polimorbidity.

Il progetto ha lo scopo di effettuare una "mappatura" dell'impatto assistenziale delle polimorbidity nel nostro Paese, attraverso l'analisi incrociata di imponenti basi di dati disponibili presso l'Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari (AGENAS) e presso il Consorzio Pubblico Interuniversitario (CINECA).

Il progetto si propone di valutare le problematiche cliniche specifiche delle polimorbidity e le conseguenze che portano alla "polifarmacologia" connessa a questo crescente problema.

Il progetto ha come obiettivo, inoltre, di valutare se esistano differenze di genere nell'occorrenza delle polimorbidity e nella polimedicalizzazione ad essa correlata, e differenze collegate allo stato socioeconomico dei pazienti e alla regione di residenza. Inoltre il progetto si propone di individuare percorsi diagnostico-terapeutici specifici, inizialmente indirizzati alle polimorbidity con prevalente impegno respiratorio e cardiovascolare.

Il progetto comprende:

1. la mappatura della prevalenza, distribuzione, tipologia e impatto assistenziale delle polimorbidity nel nostro Paese. La mappatura è effettuata attraverso l'analisi incrociata di tre banche dati: le schede di dimissione ospedaliera (SDO) presenti presso l'AGENAS, il database prospettico disegnato specificatamente per la valutazione delle polimorbidity e della polifarmacologia ed implementato dall'IRCCS San Raffaele presso strutture sanitarie residenziali operanti prevalentemente nella Regione Lazio e nella Regione Puglia e il database ARNO per la valutazione delle conseguenze della polifarmacologia e degli eventi avversi implementato dal Consorzio Interuniversitario CINECA;
2. un'analisi specifica dei dati per sesso, per età e per Regione - con la possibilità di valutare l'impatto delle diverse patologie, del ricorso al ricovero (per le stesse situazioni cliniche) e sui costi- delle condizioni socioeconomiche e organizzative locali;
3. lo sviluppo di un sistema decisionale diagnostico-terapeutico delle polimorbidity rivolto agli operatori sanitari e basato su un sistema web-based accessibile, previa registrazione gratuita.

Il progetto proposto permetterà di effettuare una mappatura delle polimorbidity e di

valutare la loro incidenza sui ricoveri ospedalieri nel nostro Paese e sull'uso dei farmaci. La mappatura verrà resa possibile grazie alla disponibilità del database delle SDO di tutte le strutture ospedaliere operanti nel territorio Nazionale, disponibile presso l'AGENAS che è partner del presente progetto.

Infine, l'impiego del data base ARNO coordinato dal Consorzio CINECA, permetterà di valutare l'impatto e le caratteristiche delle politerapie, caratteristiche dei pazienti con polimorbidity. Gli altri partner del progetto, potranno valutare e approfondire gli aspetti specifici delle principali patologie presenti nei pazienti con polimorbidity, ad esempio quelle cardiovascolari/dismetaboliche e quelle respiratorie.

Partendo dall'iniziale mappatura dell'impatto assistenziale delle polimorbidity nel nostro Paese, attraverso il progetto si prefigge dunque di effettuare: l'analisi dei dati di tutte le SDO italiane disponibili presso l'AGENAS; l'analisi dei dati dell'Osservatorio ARNO (CINECA) che contiene i flussi integrati (farmaceutica, schede di dimissione ospedaliera e prestazioni specialistiche) delle prestazioni sanitarie SSN erogate ad ogni singolo paziente in un network di 32 ASL di 8 Regioni; l'analisi dei dati del database prospettico disegnato specificatamente per la valutazione delle polimorbidity e della polifarmacologia ed implementato dall'IRCCS San Raffaele presso strutture sanitarie residenziali operanti prevalentemente nella Regione Lazio e nella Regione Puglia.

Il progetto si propone di valutare, su base nazionale e regionale, anche le problematiche cliniche specifiche e le conseguenze "polifarmacologiche" connesse a questo crescente fenomeno, di valutare l'impatto delle differenze di genere, di individuare percorsi diagnostico-terapeutici specifici, in particolare per le patologie respiratorie e cardiovascolari, e infine valutare gli aspetti farmaco-economici, con l'obiettivo di migliorare la gestione clinica e terapeutica dei pazienti con polimorbidity all'interno del Servizio Sanitario Nazionale.

Inoltre il progetto si prefigge di sviluppare un algoritmo basato sul web, strutturato per punti nodali, per la diagnosi dei pazienti anziani con polimorbidity (cardiometaboliche e respiratorie) e per l'uso terapeutico di farmaci che agiscono sui sistemi cardiometabolico e respiratorio. Questo algoritmo si basa su un software proprietario basato sulle reti neurali in cui verranno inseriti i dati di ciascun farmaco ed integrati con quelli dei farmaci con cui interagisce direttamente o indirettamente. Il sistema sarà basato su una piattaforma gratuita educativa accessibile previa registrazione.

Ci si prefigge anche di individuare in un'ottica di genere e di determinanti socio-economici -i percorsi diagnostico-terapeutici nella gestione intra ed extra-ospedaliera di pazienti con patologie respiratorie e cardiovascolari.

Ultimo obiettivo dello studio è costituito dalla individuazione di un sistema educativo web-based per la diagnosi e la terapia dei pazienti complessi con polipatologie a prevalente interessamento cardiometabolico e respiratorio.

## **Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie (Ccm) - Bando 2010**

*La Telesorveglianza nella gestione dello scompenso cardiaco cronico sul territorio*

Unità operative partecipanti: IRCCS Fondazione Salvatore Maugeri Clinica del Lavoro e della Riabilitazione, Dipartimento di Cardiologia Riabilitativa; Regione Lombardia D.G. Sanità Governo della Prevenzione, tutela sanitaria, piano sicurezza luoghi di lavoro e emergenze sanitarie; IRCCS San Raffaele Pisana.

Lo Scompenso cardiaco è una condizione clinica che sta assumendo dimensioni epidemiche e di conseguenza assorbe un numero sempre maggiore di risorse. Essa presenta un'incidenza nella popolazione generale tra lo 0.5-1.5%, ma tuttavia nella popolazione sopra i 70 anni di età la prevalenza sale al 5-10%. Il tutto è gravato inoltre da elevata mortalità, compresa fra il 5 ed il 60% annuo, sulla base della gravità dei sintomi.

Lo scompenso cardiaco risulta inoltre essere responsabile di un elevato tasso di ospedalizzazioni: si conta che circa il 5% delle ospedalizzazioni nei soggetti sopra i 65 anni di età sia dovuto a scompenso cardiaco.

Il modello tradizionale di cura, caratterizzato da brevi ospedalizzazioni in occasione di episodi acuti o di instabilizzazioni cliniche, di fatto, contribuisce a frequenti riospedalizzazioni perché spesso non permette di ottimizzare la terapia o di controllare i fattori causali delle ospedalizzazioni e le frequenti comorbidità.

In questo ambito, numerosi studi hanno documentato l'efficacia di interventi multidimensionali integrati per la cura e la continuità assistenziale, soprattutto attraverso programmi strutturati di riabilitazione. Tali programmi sono fortemente orientati alla stabilizzazione clinica, al controllo delle comorbidità, alla gestione delle disabilità e alla prevenzione delle riospedalizzazioni.

Sulla base delle evidenze, le soluzioni proponibili potrebbero essere:

- implementare sul territorio regionale le positive esperienze del modello di intervento multifattoriale integrato della Riabilitazione Cardiologica per il paziente con scompenso cardiaco cronico, con particolare riferimento ai pazienti più vulnerabili quali: gli anziani, i pazienti portatori di defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD), di assistenza ventricolare meccanica, pazienti candidati al trapianto e i pazienti trapiantati;
- sviluppare un approccio multifattoriale flessibile di continuità assistenziale attraverso un collegamento organizzato ed efficiente tra ospedali, strutture di riabilitazione e servizi territoriali con interventi, percorsi e controlli programmati basati sull'utilizzo di sistemi avanzati di telesorveglianza/teleassistenza domiciliare, diversificati sui bisogni e complessità clinica del singolo paziente.

Il progetto intende implementare e dare continuità alle esperienze positive di interventi integrati multidimensionali già realizzati in Regione Lombardia e sviluppare una strategia globale di cura e continuità assistenziale per il paziente con scompenso cardiaco cronico, basata su una rete di servizi telematici differenziati (telemonitoraggio cardiorespiratorio domiciliare, telenursing, telecounselling, teletraining ecc.).

Dopo una prima fase di ottimizzazione della terapia farmacologica ed impostazione del training fisico in regime ospedaliero, sono stati arruolati 50 pazienti. I pazienti arruolati seguivano al domicilio, un programma strutturato di monitoraggio clinico, counselling e di riallenamento all'esercizio fisico, attraverso training con pedaliera ed esercizi calistenici. Ciascun paziente era dotato, per il periodo dello studio, di una pedaliera a carico variabile ed un ECG recorder monotraccia (cCard gGuard) o di una stazione di monitoraggio (Call4Care).

Sono stati registrati gli eventi cardiovascolari e non cardiovascolari verificatisi durante il percorso

#### Tabella eventi

<b>Numero di ospedalizzazioni CV durante il percorso</b>	<b>5</b>
a causa di:	
- impianti PM	1
- Instabilizzazione clinica	3
<b>Instabilizzazione senza ricovero</b>	<b>1</b>
<b>Accessi al Pronto Soccorso:</b>	
- per cause cardiovascolari	0
- per cause non cardiovascolari	2

Al termine del percorso sono stati rilevati i seguenti risultati, indicanti il miglioramento della tolleranza allo sforzo in modo oggettivo, e il miglioramento dei sintomi.

#### Tabella risultati

	<b>A 12 mesi</b>	<b>Variazione rispetto al basale</b>
<b>BMI</b>	24.7 ± 4.3	- 2.1
<b>Classe NYHA</b>		
- II (n. pazienti)	36	+ 10
- III (n. pazienti)	13	- 10
<b>LVEF (%)</b>	36 ± 7	+ 2
<b>Walking test (metri)</b>	372 ± 24	+ 21
<b>Picco di VO<sub>2</sub> (ml/Kg/min)</b>	15.6 ± 4.8	+ 4.4
<b>Ve/VCO<sub>2</sub></b>	30 ± 3	- 4
<b>WATT</b>	80 ± 10	+ 10
<b>PAS (mm Hg)</b>	134 ± 16	- 2
<b>PAD (mm Hg)</b>	80 ± 6	- 1

I pazienti hanno compilato il questionario sulla qualità di vita SF36 all'inizio e alla fine del percorso domiciliare. Il questionario SF-36 è uno strumento che permette di valutare lo stato di salute in generale attraverso 36 domande. Il risultato ricavato è rappresentato da 8 punteggi/scale, ciascuno dei quali rappresenta una quantificazione di un aspetto specifico dello stato di salute e da 2 indici che sintetizzano le valutazioni complessive rispetto alla salute fisica e mentale. Più il punteggio è alto, migliore è il livello di salute percepita. I primi tre valori riflettono la salute fisica (attività fisica, limitazioni delle attività specifiche del ruolo dovute a problemi fisici, dolore fisico), quelli intermedi riflettono la salute in generale (salute in generale, vitalità), gli ultimi 3 misurano aspetti della salute psicologico-emotiva (limitazioni nella attività di tipo sociale, limitazioni delle attività specifiche del ruolo dovute a problemi emotivi, salute mentale). Una valutazione più precisa dei risultati è data da due indici sintetici, uno relativo alla Salute Fisica (ISF) e il secondo relativo a quella mentale (ISM). Questi indici sono ricavati dalle 8 scale e permettono di sintetizzare in soli due numeri i risultati di tutte le scale. Anche in questo caso più è alto il punteggio, migliore è il livello di salute percepita.

## Tabella Qualità di vita

	Fine studio	Fine studio	diff
<b>SF 36:</b>			
- Attività fisica	72 ± 36	79 ± 52	+7 *
- Limitazioni ruolo fisico	54 ± 64	61 ± 36	+7 *
- Dolore fisico	72 ± 66	80 ± 26	+8 *
- Salute generale	41 ± 36	44 ± 38	+ 3
- Vitalità	72 ± 24	72 ± 35	0
- Attività sociali	83 ± 23	83 ± 32	0
- Limitazioni ruolo emotivo	70 ± 45	71 ± 52	+1
- Salute mentale	73 ± 24	74 ± 9	+ 1
<b>ISF</b>	42 ± 18	49 ± 26	+7 *
<b>ISM</b>	50 ± 8	50 ± 11	0

(\*p<0.05)

Tutti i parametri valutati dal questionario sono migliorati alla fine del percorso di 12 mesi, anche se solo quelli relativi all'attività fisica e alle limitazioni al ruolo fisico sono statisticamente significativi. Una valutazione più precisa dei risultati è data da due indici sintetici: la gestione delle attività quotidiane non era compromessa in questi pazienti e si manteneva ottimale anche dopo i dodici mesi di percorso.

La qualità di vita dei pazienti mostrava un miglioramento significativo nell'indice sintetico relativo alla salute fisica ma non in quello relativo alla salute mentale, che rimane comunque invariato. I dati riportati sulla salute mentale sono senz'altro influenzati da una maggiore conoscenza e coscienza della propria malattia dopo il percorso effettuato.

## Centro nazionale per la prevenzione e il controllo delle malattie – CCM 2011

*Modelli innovativi di gestione integrata tele-gestita ospedale-territorio del malato cronico a fenotipo complesso: studio di implementazione, validazione ed impatto*

Centro coordinatore: Fondazione Salvatore Maugeri Lumezzane  
IRCCS San Raffaele Pisana, Unità Operativa 2

La broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) è comune nei pazienti con scompenso cardiaco (SCC) ed è predittiva di mortalità in modo indipendente; la stessa cosa vale per lo SCC che è, a sua volta, comune nei soggetti affetti da BPCO, nei quali si riuniscono molteplici fattori di rischio cardiovascolare. Si tratta quindi di un malato complesso, multimorbido, spesso fragile che mostra un altissimo rischio di re-ospedalizzazioni e che necessita di una cura integrata con un approccio personalizzato e multidisciplinare. Il programma proposto vuole intervenire sui molteplici problemi medico-infermieristici e gestionali che il paziente con patologia cronica deve affrontare alla dimissione. L'équipe che dimette il paziente ha la funzione di coordinare e favorire l'apprendimento delle tecniche di autogestione della malattia, che permettono al paziente l'identificazione delle condizioni sub-critiche prevenendo il più possibile le riacutizzazioni.

Il programma proposto vuole intervenire sui molteplici problemi medico-infermieristici e gestionali che il paziente con patologia cronica deve affrontare alla dimissione. L'équipe che dimette il paziente ha la funzione di coordinare e favorire l'apprendimento delle tecniche di autogestione della malattia, che permettono al paziente l'identificazione delle condizioni sub-critiche prevenendo il più possibile le riacutizzazioni. Il piano educativo che coinvolge i familiari riveste un ruolo cruciale per la riuscita del pro-



gramma e costituisce una componente preponderante nella fase ospedaliera preparatoria alla dimissione. L'infermiere ed il fisioterapista assumono un ruolo centrale in tutti gli interventi domiciliari di continuità di cura ed diventano un'interfaccia essenziale nel dialogo tra paziente e specialista. L'infermiere e il fisioterapista, ognuno per le proprie competenze, hanno il compito di raccogliere informazioni riguardanti anamnesi e sintomi, svolgono attività di educazione sanitaria, di training, di verifica dell'aderenza alle prescrizioni, di valutazione del benessere generale, del grado di assistenza fornito dal caregiver, di aggiornamento della scheda clinica. Se necessario inoltre attivano l'intervento dello specialista per il consulto o la second-opinion telefonica.

Il presente studio è randomizzato, controllato, prospettico della durata di 4 mesi più ulteriori 4 mesi di follow-up. Sono arruolati nei quattro centri coinvolti 120 pazienti con fenotipo complesso (Scopenso Cardiaco Congestizio –SCC- e Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva –BPCO- accertate e documentate) con almeno una ospedalizzazione per una delle due cause nei 6 mesi precedenti. Nel gruppo di trattamento i pazienti sono seguiti al domicilio tramite un percorso di telesorveglianza e riallenamento domiciliare all'esercizio fisico. I pazienti del gruppo controllo sono seguiti tramite l'assistenza usuale fornita a questa tipologia di pazienti. Vengono eseguite visite di controllo a 4 mesi ed 8 mesi in cui vengono eseguiti esami clinici, questionari e scale di valutazione. Obiettivo principale del programma è la valutazione della fattibilità ed efficacia di un modello organizzativo di gestione integrata di continuità di cure ospedale-territorio, basato su una piattaforma innovativa di tele-gestione, monitoraggio e tele riabilitazione nel paziente affetto da malattia cronica a fenotipo complesso (modellizzato sul cluster Scopenso Cardiaco/BPCO).

L'obiettivo primario dello studio consiste nella riduzione delle ospedalizzazioni per tutte le cause.

Gli obiettivi secondari consistono nella riduzione delle ospedalizzazioni cardiovascolari e/o respiratorie, miglioramento della tolleranza allo sforzo (test del cammino), miglioramento della qualità della vita, riduzione delle instabilizzazioni senza ricovero, riduzione della disabilità, incremento della capacità funzionale, esecuzione di almeno il 70% delle sedute riabilitative proposte e valutazione economica organizzativa.

## **Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) – Bando 2009**

*Trattamento farmacologico nell'anziano con patologia cardiovascolare associata a malattie croniche: inappropriata prescrizione e valutazione di esito nella popolazione istituzionalizzata e residente in comunità*

Centro Coordinatore: Dipartimento di Farmacologia Clinica e Preclinica, Università di Firenze

Unità 1: IRCCS San Raffaele Pisana, in collaborazione con le Regioni Lazio e Puglia

Il presente studio è volto a identificare:

- i principali indicatori di prescrizione inappropriata (PI) tra pazienti anziani, istituzionalizzati e residenti in comunità, affetti da malattie cardiovascolari (ovvero insufficienza cardiaca, aritmia cardiaca, malattia coronarica, ictus ischemico ed emorragico) e altre comorbidità croniche;
- la relazione tra gli indicatori di PI identificati e end-point "hard" nelle suddette coorti di pazienti anziani.

Nel progetto è prevista la valutazione delle cartelle cliniche/database di pazienti in tre

differenti setting: ricoveri ospedalieri (setting A), database di medicina generale (setting B) e residenze comunitarie o case di cura (setting C).

Il Dipartimento di Scienze Internistiche dell'IRCSS San Raffaele Pisana di Roma si occupa dell'analisi retrospettiva dei dati tratti dalle cartelle cliniche delle Residenze Sanitarie Assistenziali (RSA) relative alle regioni Lazio e Puglia.

Nell'anno 2013 è stato effettuato un emendamento sostanziale al progetto, relativo alla modificazione del periodo di revisione dei dati clinici relativi al setting C (RSA). Tale emendamento è stato richiesto in seguito alla pubblicazione nel 2012 di nuovi criteri di PI che avrebbero potuto influenzare l'approccio prescrittivo da parte del personale medico.

Per quanto riguarda la costruzione dei database delle RSA, poiché la numerosità campionaria della popolazione sarebbe potuta non essere sufficiente (qualora si fossero identificati i soli soggetti con diagnosi "incidente" di patologia cardiovascolare al baseline), è stato deciso di utilizzare i soggetti con patologia cardiovascolare "prevalente", riservandosi di valutare la numerosità dei soggetti "incidenti" per eventuali analisi di sensibilità.

Per la costruzione del database dei dati amministrativi, le dimensioni hanno permesso di identificare una coorte di soggetti con patologia cardiovascolare incidente (data indice) al baseline. Le patologie concomitanti in studio sono state identificate nel periodo precedente (o concomitante) la data indice.

È stato deciso di considerare ogni categoria farmacologica che, qualora impiegata nel soggetto anziano con patologia cardiovascolare ed altre comorbidità, incrementi il rischio di eventi cardiovascolari acuti, ospedalizzazione e mortalità (esiti primari del protocollo). A tale scopo sono stati esaminati i criteri di inappropriatazza noti (es. Beers) integrati da una revisione della letteratura esistente incentrata sul paziente anziano con patologia cardiovascolare. Gli indicatori sono stati quindi esaminati, in questa fase, senza escludere i farmaci cardiovascolari (o altre categorie farmacoterapeutiche) che, per caratteristiche delle popolazioni in cui sono "validati", avrebbero potuto comportare problematiche di interpretazione dei risultati (i.e., confondimento da indicazione).

È stata creata una query "standard" che identifica ed estrae nei database amministrativi, attraverso il flusso delle dimissioni ospedaliere, i pazienti affetti da patologie cardiovascolari (SDO codificate tramite gli specifici ICD9CM indicati nel protocollo). Tale query verrà successivamente adattata alle strutture dati dei sistemi informativi delle varie unità.

E' attualmente in corso la definizione degli indicatori di PI, mediante due fasi:

- revisione degli indicatori ad oggi noti (i.e. criteri di Beers) assieme ad una valutazione sistematica sia delle linee guida di trattamento delle patologie per le quali i 'farmaci inappropriati' in studio vengono impiegati (i.e., approccio di definizione degli indicatori CRIME) che della letteratura medica;
- valutazione degli indicatori selezionati effettuata in base ad un consenso di esperti tramite il metodo Delphi (i.e., scala "tipo Likert").

Sono stati presi in esame, assieme ai nuovi indicatori, anche i criteri selezionati dal GeriatricWorking Group dell'Agenzia Italiana del Farmaco.

Nel 2014 ci si propone di calcolare la densità di incidenza delle malattie cardiovascolari per i soggetti esposti al farmaco relativo all'indicatore di PI e per i non esposti.

Inoltre, per quanto concerne l'Unità Operativa dell'IRCSS San Raffaele Pisana nell'anno 2013 è stata effettuata una valutazione e pulizia del database.

## NEURON Joint Call 2011: "European Research Projects on Cerebrovascular Diseases".

*Role of danger signals in stroke and therapeutic targeting by nanobodies (NanoStroke)*  
Partner del progetto

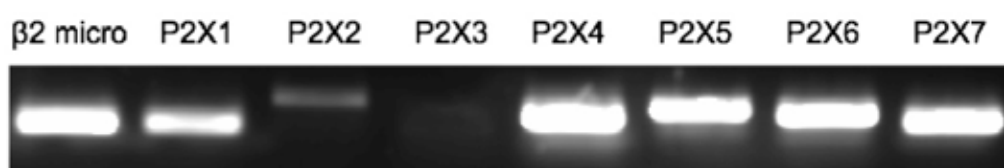
Il progetto è svolto da un team multidisciplinare composto da: Anna Planas, Barcelona (Spagna), Christoph Kleinschnitz and Guido Stoll, Würzburg (Germania) Carlos Matute, Bilbao, (Spagna), Andrea la Sala, Roma (Italia) and Friedrich Koch-Nolte and Tim Magnus, Amburgo, (Germania).

Nell'ictus acuto, la dimensione della lesione cerebrale iniziale può ulteriormente aumentare nelle prime ore e giorni dopo l'evento ischemico. Questa 'crescita dell'infarto' è un problema clinico significativo perché correlato al peggioramento dei deficit neurologici e scarso esito funzionale. Recenti evidenze indicano una stretta relazione tra le risposte infiammatorie e immunitarie locali con la gravità di ictus, danno cerebrale e con la crescita dell'infarto secondario. Quali siano esattamente le conseguenze della risposta infiammatoria e come la reazione immunitaria amplifichi il danno è poco noto. Probabili candidati per l'attivazione immunitaria sono segnali molecolari cosiddetti di "pericolo" come l'adenosina trifosfato (ATP), la nicotinamide adenina dinucleotide (NAD), e la proteina high mobilitygroup box-1, molecole che vengono rilasciate a seguito dal tessuto cerebrale danneggiato dopo l'ictus.

In questo progetto, viene studiato il ruolo fisiopatologico dei segnali di pericolo nell'ictus acuto e subacuto. Utilizzando modelli animali di ictus acuto, viene inoltre valutato l'approccio terapeutico basato di una particolare categoria di anticorpi chiamati nanobodies, specifici per bloccare i recettori dei segnali molecolari di pericolo ed evitare l'immunogenicità e la tossicità caratteristica degli anticorpi classici. Come passo verso una nuova opzione di trattamento per i pazienti, il progetto intende inoltre verificare, mediante studi in vitro e preparazioni cellulari ex vivo, se la soppressione dell'attivazione delle cellule infiammatorie in condizioni ischemiche, da parte dei nanobody può essere estesa al sistema umano.

Nell'ambito del progetto l'obiettivo dell'UO di Roma è la valutazione dell'effetto di pattern molecolari associati a danno tissutale sulla produzione di citochine infiammatorie nel sistema umano. Per il suddetto obiettivo sono state effettuate le seguenti attività: Messa a punto della metodica per lo studio dell'effetto della deprivazione di ossigeno e glucosio su cellule gliali umane. A tal fine è stata allestita la coltura della linea cellulare di glioblastoma A-172, ne è stata caratterizzato il pattern di espressione di recettori purinergici P2 comprendenti le sottofamiglie P2X e P2Y e l'effetto della deprivazione di glucosio ed ossigeno sulla vitalità cellulare.

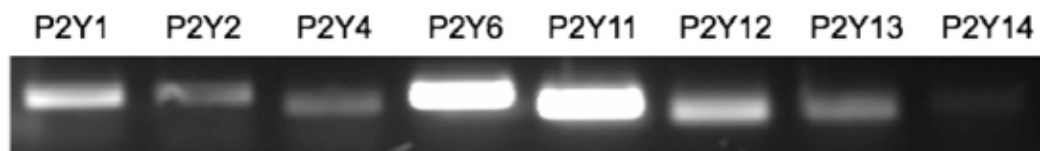
Il profilo di espressione di recettori purinergici P2 appartenenti alla sottofamiglia P2X e P2Y, sono illustrati rispettivamente in figura 1 e figura 2.



**Figura 1. PCR qualitativa per i geni dei recettori purinergici appartenenti alla sottofamiglia P2X.**

L'RNA è stato estratto dalle cellule A-172. Dopo retrotrascrizione il cDNA è stato utilizzato per analizzare l'espressione dei geni P2X. Il gene della  $\beta 2$  microglobulina è stato utilizzato come controllo positivo della

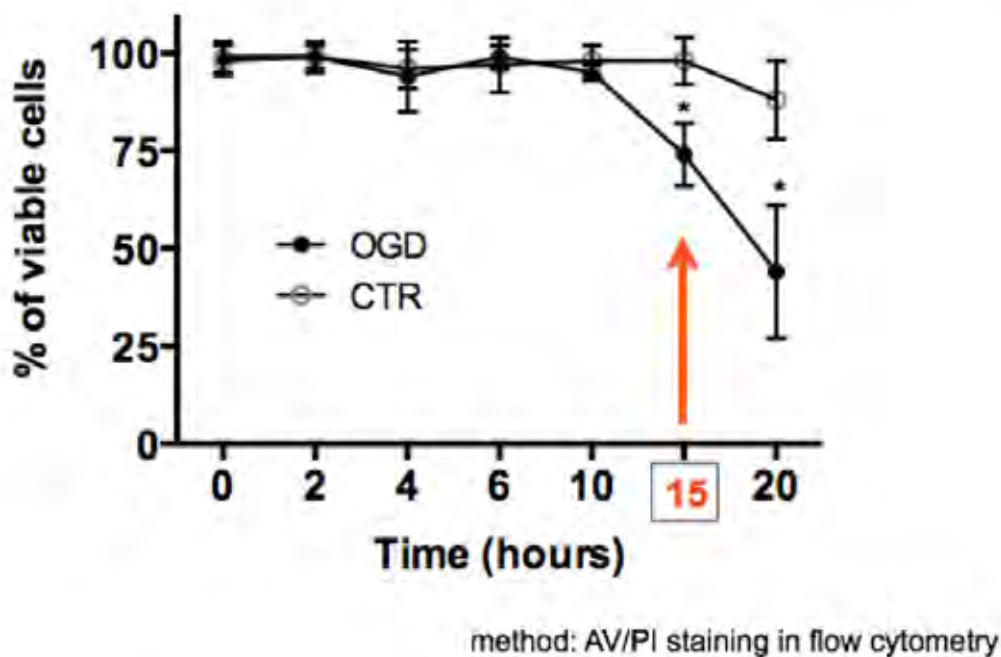
reazione. La figura mostra la corsa elettroforetica su gel di agarosio dei geni amplificati. Solo il gene P2X3 sembra non espresso.



**Figura 2. PCR qualitativa per i geni dei recettori purinergici appartenenti alla sottofamiglia P2Y.** L'RNA è stato estratto dalle cellule A-172. Dopo retrotrascrizione il cDNA è stato utilizzato per analizzare l'espressione dei geni P2Y. La figura mostra la corsa elettroforetica su gel di agarosio dei geni amplificati. Solo il gene P2Y14 sembra non espresso.

La tossicità indotta dalla deprivazione di glucosio ed ossigeno è stata valutata mediante misurazione della vitalità cellulare con mediante colorazione con annessina V coniugata con fluoresceina isotiocianato e ioduro di propidio ed analisi citofluorimetrica. Gli esperimenti effettuati sono stati volti a determinare il time point adeguato per effettuare studi di protezione e per la raccolta di supernatanti contenenti molecole associate a danno rilasciate dalle cellule di glioblastoma danneggiate. A tal fine sono stati effettuati studi di cinetica illustrati in figura 3.

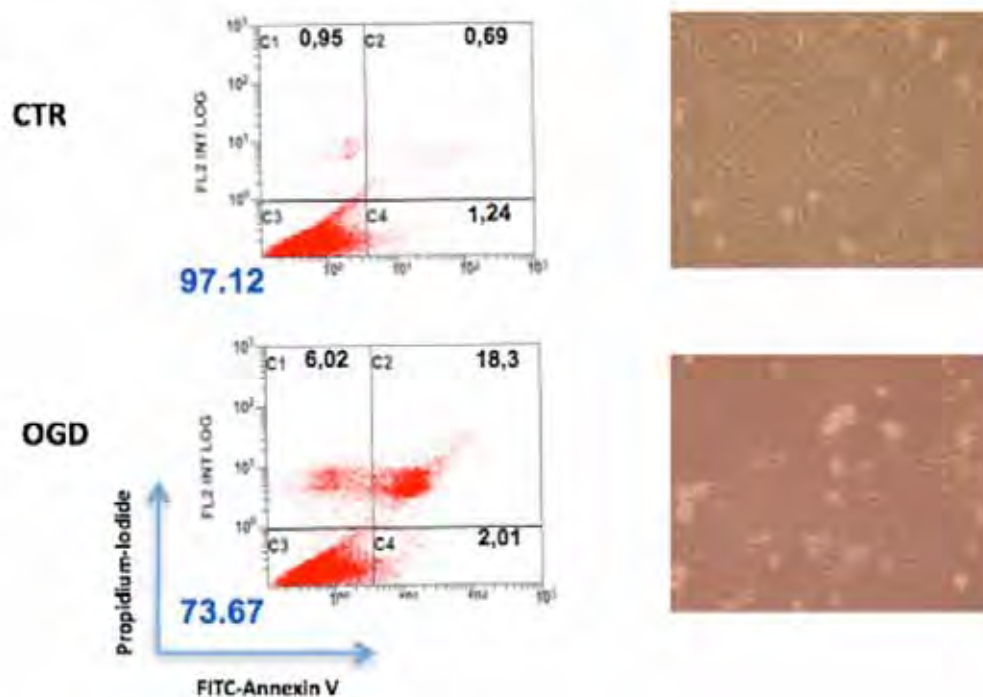
### Oxygen-glucose deprivation toxicity in A-172 cells



**Figura 3. Analisi della vitalità cellulare in seguito a deprivazione di ossigeno e glucosio (OGD).** Le cellule A-172 sono state incubate in una camera ipossica in mezzo privo di glucosio. Le cellule sono state raccolte ed analizzate mediante citofluorimetria ai tempi indicati in figura. Agli stessi tempi sono state analizzate le cellule di controllo, coltivate in mezzo di coltura completo e incubate in presenza di ossigeno.

La figura 4 mostra i risultati di un'analisi citofluorimetrica rappresentativa del time point 15 ore.

### Analysis of cell viability after 15h of oxygen and glucose deprivation

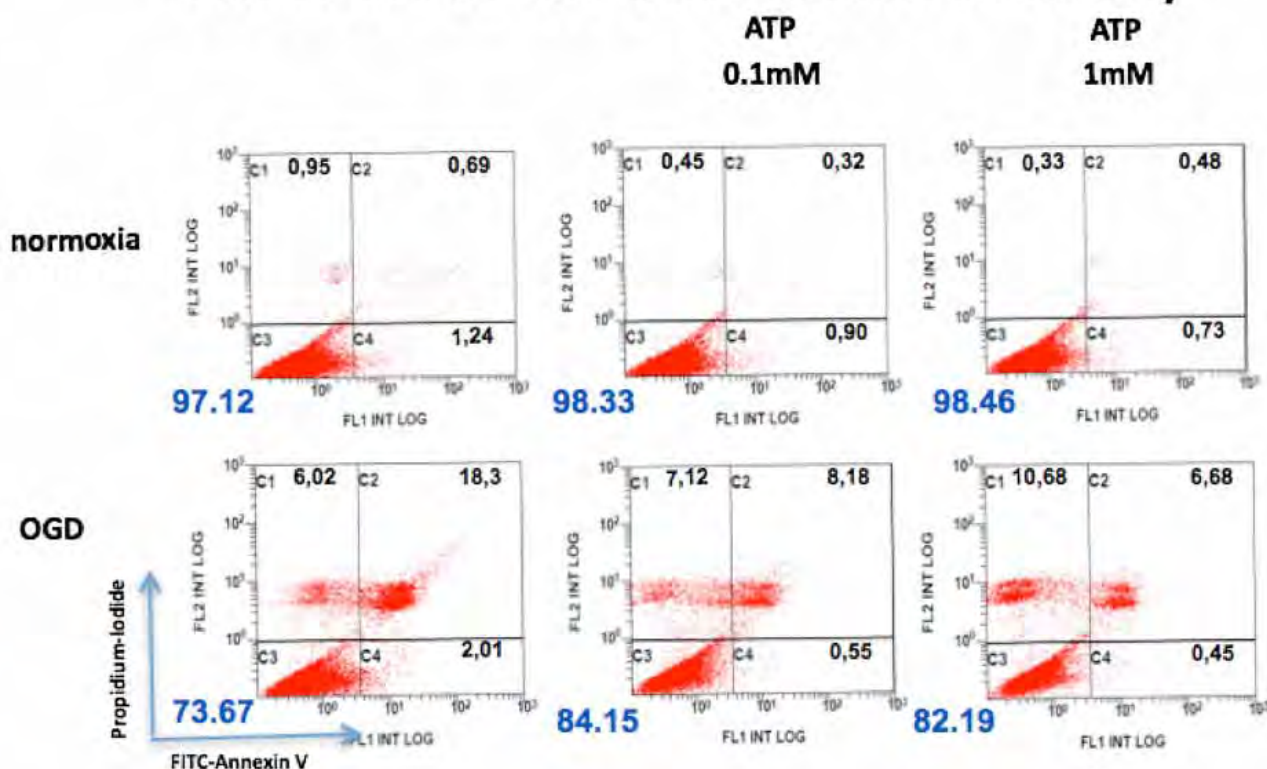


**Figura 4. Analisi della vitalità cellulare dopo 15 ore di OGD.**

A sinistra, i grafici a punti mostrano l'analisi citofluorimetrica della colorazione con Annexina V e Propidio ioduro. Le cellule nel quadrante in basso a sinistra (C3), negative per entrambi i marcatori, sono le cellule vive. A destra, la morfologia delle cellule di controllo in coltura (in alto) e delle cellule sottoposte a OGD per 15 ore (in basso). Le immagini sono rappresentative di 6 esperimenti indipendenti.

Inoltre è stato studiato l'effetto dell'esposizione della linea cellulare A-172 a due diverse concentrazioni di ATP extracellulare sulla mortalità indotta dalla deprivazione di ossigeno e glucosio. I risultati preliminari mostrati in figura 5 indicano una potenziale attività citoprotettiva dell'ATP che dovrà essere confermata da successive repliche sperimentali.

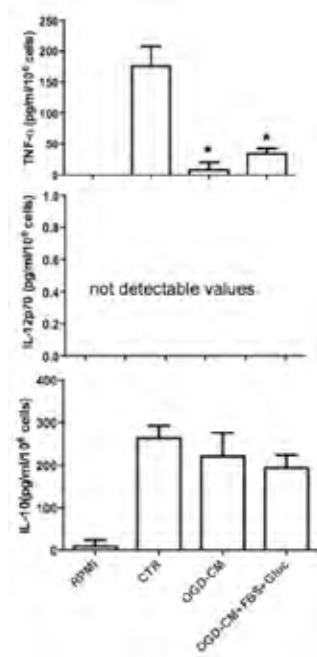
## effect of ATP on OGD-induced toxicity



**Figura 5. Analisi della vitalità cellulare dopo 15 ore di OGD.**

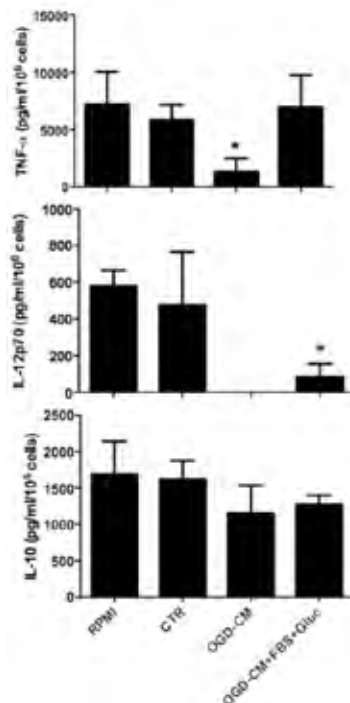
I grafici a punti mostrano l'analisi citofluorimetrica della colorazione con Annessina V e Propidio Ioduro. Le cellule nel quadrante in basso a sinistra (C3), negative per entrambi i marcatori, sono le cellule vive. I grafici centrali e quelli a destra mostrano la vitalità delle cellule sottoposte a OGD (in basso) e in condizioni normali di coltura (in alto) in presenza di ATP 0.1mM e 1mM, rispettivamente. I grafici a sinistra mostrano le cellule di controllo (in alto) e in OGD (in basso). La figura è rappresentativa di 6 esperimenti indipendenti.

Per lo studio dell'effetto di molecole associate a danno rilasciate da cellule gliali danneggiate, sono stati raccolti supernatanti della coltura della linea cellulare A-172 dopo 15 ore di deprivazione di ossigeno e glucosio. Tali supernatanti sono stati utilizzati per stimolare cellule dendritiche umane derivate da monociti immature o mature (maturazione indotta con lipopolisaccaride). Il rilascio delle citochine TNF-alfa, IL-12p70 e IL-10 è stato misurato mediante saggio ELISA sui supernatanti delle cellule dendritiche immature (fig.6) o mature (figura 7).



**Figura 6. Analisi del rilascio di citochine da parte di cellule dendritiche immature in presenza di supernatanti di A-172 dopo OGD.**

I grafici mostrano la concentrazione di TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e IL-10 rilevata mediante saggio ELISA nel mezzo di coltura di cellule dendritiche immature (iDC) esposte ai supernatanti di A-172 dopo OGD. Le condizioni sperimentali riportate in figura sono: iDC coltivate in RPMI (condizione classica di coltura delle DC); iDC esposte al supernatante di cellule A-172 coltivate in condizioni normali (CTR); iDC esposte al supernatante di cellule A-172 in OGD (OGD-CM); iDC esposte al supernatante di cellule A-172 in OGD, al quale sono stati aggiunti FBS e glucosio (OGD-CM +FBS+Gluc). L'esposizione al supernatante OGD-CM riduce la secrezione di TNF- $\alpha$  da parte delle iDC rispetto al controllo. Non ci sono differenze nel rilascio di IL-10 nelle diverse condizioni sperimentali. La produzione di IL-12p70 non è rilevabile in nessuna condizione sperimentale. I grafici si riferiscono a 3 esperimenti indipendenti.



**Figura 7. Analisi del rilascio di citochine da parte di cellule dendritiche mature in presenza di supernatanti di A-172 dopo OGD.**

I grafici mostrano la concentrazione di TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e IL-10 rilevata mediante saggio ELISA nel mezzo di coltura di cellule dendritiche mature (mDC) esposte ai supernatanti di A-172 dopo OGD, e stimolate con lipopolisaccaride (LPS 1  $\mu$ g/ml). Le condizioni sperimentali riportate in figura sono: mDC coltivate in RPMI (condizione classica di coltura delle DC); mDC esposte al supernatante di cellule A-172 coltivate in condizioni normali (CTR); mDC esposte al supernatante di cellule A-172 in OGD (OGD-CM); mDC

esposte al supernatante di cellule A-172 in OGD, al quale sono stati aggiunti FBS e glucosio (OGD-CM +FBS+Gluc). L'esposizione al supernatante OGD-CM riduce la secrezione di TNF $\alpha$  da parte delle mDC rispetto al controllo, e l'aggiunta di FBS ripristina il rilascio di TNF $\alpha$ . La produzione di IL-12p70 non è rilevabile nelle mDC esposte a OGD-CM, e anche in presenza di FBS la produzione di IL-12p70 è comunque ridotta. Non ci sono differenze nel rilascio di IL-10 nelle diverse condizioni sperimentali. I grafici si riferiscono a 3 esperimenti indipendenti.

I risultati fino qui ottenuti indicano una potente attività inibitoria della secrezione di TNF-alfa da parte dei supernatanti di cellule gliali esposte a condizioni OGD. La produzione di IL-12p70 può essere ripristinata dalla presenza nel mezzo di coltura di siero bovino fetale.

## **Unione Europea - "7th Framework Programme"**

*SICA-HF: Studio della valutazione delle co-morbidity determinanti un peggioramento dello Scopenso Cardiaco*

Il progetto prevede la collaborazione con i seguenti Istituti:

- Charité – Universitätsmedizin Berlin, Germany, Applied Cachexia Research, Department of Cardiology and Department of Pharmacology and Toxicology, Center for Cardiovascular Research
- University of Hull, United Kingdom
- Military Hospital Wroclaw, Poland
- Medizinische Hochschule Hannover, Germany
- GABO:mi Gesellschaft für Ablauforganisation :milliarium mbH & Co. KG, Germany
- Universität Rostock, Germany
- V.A. Almazov Federal Center for Heart, Blood & Endocrinology, Russian Federation
- M V Lomonosov Moscow State University, Russian Federation
- Institute of Cardiology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Russian Federation
- Russian Cardiology Research and Production Complex, Russian Federation

Lo scompenso cardiaco cronico (CHF) rappresenta una delle principali cause di morbidità e mortalità. I pazienti affetti da CHF presentano numerose co-morbidity, quali diabete, obesità, ipertensione arteriosa, dislipidemia ed alterazioni del metabolismo glucidico. Inoltre, negli stadi avanzati della malattia i pazienti con CHF possono sviluppare cachessia, che rappresenta un fattore prognostico infausto.

Il progetto SICA-HF, articolato in 16 progetti di ricerca clinici e pre-clinici (WorkPackages [WPs]), intende valutare l'impatto che queste co-morbidity determinano nei pazienti con CHF, a livello clinico, vascolare, cellulare e molecolare.

Lo studio fa parte di un grande progetto collaborativo che coinvolge la Comunità Europea e la Russia (totale 11 centri e il coordinatore) ed ha ricevuto un finanziamento dalla Comunità Europea nell'ambito del "7th Framework Programme".

Lo studio, prospettico, multicentrico, multinazionale, longitudinale, ha come obiettivo il reclutamento di > 1.600 pazienti con scompenso cardiaco, indipendentemente dalla frazione di eiezione ventricolare sinistra, e con o senza comorbidity all'ingresso nello studio. Inoltre, è previsto il reclutamento, come gruppi di controllo, di > 300 pazienti con diabete mellito tipo 2 senza CHF e > 150 soggetti sani. Il progetto prevede che almeno il 50% dei pazienti arruolati siano di sesso femminile e che l'età media dei gruppi



sia omogenea.

I partecipanti sono sistematicamente studiati ad intervalli annuali fino a 48 mesi. Tutti i soggetti vengono caratterizzati al basale, mentre i pazienti con CHF sono valutati ulteriormente dopo 4-6 mesi, 16-18 mesi e, ove applicabile, ogni anno, in base alla durata del progetto.

Ulteriori indagini sono focalizzate sui meccanismi cellulari e subcellulari e sulle cellule progenitrici endoteliali, in sottogruppi selezionati.

Lo scopo di questo progetto consiste nella descrizione dettagliata dei pazienti con CHF e le sopramenzionate co-morbidità al fine di identificare nuove strategie terapeutiche e migliorare gli outcome di morbidità e mortalità di questi pazienti.

La peculiarità di questo progetto consiste nella valutazione pre-clinica e clinica dei pazienti reclutati, dato che campioni ematici e tissutali dei pazienti vengono valutati sia dal punto di vista clinico che mediante analisi in vitro, su modelli cellulari ed animali presso i laboratori di ricerca coinvolti nello studio.

Nel corso dell'anno sono stati reclutati nel complesso 39 pazienti (22 con scompenso cardiaco, 9 con diabete e 7 controlli), sono state effettuate 19 visite di controllo a 4-6 mesi dall'arruolamento, 8 visite di controllo a 16-18 mesi dall'arruolamento e 5 visite di controllo a 28-32 mesi.

Si è proceduto alla stesura dei report per la Comunità Europea e la Russia.

Infine, sono state raccolte 8 biopsie muscolari relative al lavoro del Workpackage 08 (Cellular research-human muscle), di cui l'Italia è responsabile.

### **Sperimentazioni cliniche con sponsor no-profit**

*Atl@nte - Creazione di una Banca Dati Geriatrica volta a promuovere la ricerca e a migliorare le cure in una ampia popolazione di anziani residenti presso un gruppo di Residenze Sanitarie Assistenziali (RSA) distribuite sul territorio Nazionale.*

*Implementazione della banca dati mediante il Sistema Informatico Atl@nte per la gestione della complessità del paziente anziano ricoverato in RSA*

L'invecchiamento della popolazione si associa ad un parallelo incremento della prevalenza di malattie ad andamento cronico, quali le malattie cardiovascolari, il diabete, la demenza, l'insufficienza respiratoria cronica, spesso presenti contemporaneamente nello stesso individuo. La cronicità di queste malattie richiede non solo l'impiego di risorse socio-economiche a lungo termine ma anche la necessità di una organizzazione assistenziale mirata. Lo scopo dell'assistenza all'anziano è, infatti, quello di garantire un piano di intervento ad ampio spettro, nel quale i percorsi assistenziali siano in grado di prendere in carico l'individuo malato nel lungo termine, al fine di garantire sia la continuità assistenziale ospedale-territorio, sia l'integrazione degli interventi socio-sanitari. Risulta, pertanto, indispensabile dotarsi di strumenti valutativi che coprano tutte le diverse dimensioni dell'anziano e che garantiscano un intervento professionale globale ed individualizzato, contemporaneamente preventivo, curativo e riabilitativo. Diversi studi clinici hanno dimostrato che l'impiego di strumenti sistematici, quali la valutazione multidimensionale (VMD) possono avere un impatto significativo sulla salute, sulla qualità dei vita, sulla soddisfazione di pazienti e dei caregiver, sui costi e sulla ottimizzazione delle risorse disponibili.

Parallelamente alla crescita numerica degli anziani si è assistito ad un progressivo incremento della complessità e della instabilità clinica degli anziani ricoverati nelle Residen-

ze Sanitarie Assistenziali (RSA). Quest'ultime, da strutture atte a rispondere principalmente a bisogni sociali, sono sempre più divenute un setting ad elevata componente sanitaria, per poter rispondere alla necessità di assistere anziani non autosufficienti, affetti contemporaneamente da più patologie croniche.

Nel paziente anziano istituzionalizzato all'interno di RSA, la valutazione multidimensionale è la metodologia più idonea per conoscere lo stato di salute del paziente anziano così come per misurare i risultati dell'assistenza ad essi fornita.

La valutazione multidimensionale, infatti, è un approccio globale interdisciplinare multiprofessionale, che prevede la valutazione di molteplici aree (salute fisica, stato funzionale, stato cognitivo, condizioni psico-sociali e ambientali), tramite la quale si ottiene non solo un quadro preciso di tutti i fattori, che nell'anziano concorrono a determinare le condizioni di salute, ma anche una pianificazione personalizzata dell'assistenza, che permette di monitorare il paziente nel tempo e fornire informazioni sulla qualità e l'efficacia dei servizi erogati. I dati che scaturiscono dalla VMD consentono non solo di personalizzare i bisogni clinico-assistenziali del singolo individuo, ma possono fornire anche informazioni di carattere epidemiologico su un'ampia popolazione di pazienti anziani. A tutt'oggi, la mancanza di un utilizzo uniforme degli strumenti della VMD nell'ambito delle RSA, distribuite nel territorio italiano, impedisce l'attivazione di un flusso informativo di dati raccolti in maniera sistematica a livello nazionale. La raccolta di questi dati permetterebbe di costruire indici di case mix assistenziali delle persone assistite, di stimare in maniera precisa il fabbisogno assistenziale degli ospiti e quindi anche i costi dell'assistenza, e non ultimo di fornire una banca dati che possa essere utilizzata per definire le necessità assistenziali presenti e future della comunità di interesse e per migliorare le conoscenze scientifiche degli anziani. Il Resident Assessment Instrument (RAI) è uno strumento di VMD, convalidato in diverse lingue (ed anche in italiano), ed in particolare, la scheda RAI - Long Term Care Facility è lo strumento di VMD globale standardizzato per la valutazione del funzionamento, delle esigenze, dei punti di forza e delle preferenze della persona residente in RSA, volto a migliorare la qualità di vita della persona stessa.

L'impiego, su un'ampia popolazione di pazienti anziani, ricoverati in regime di RSA e distribuiti sul territorio nazionale, di uno strumento informatizzato e validato per la raccolta sistematica di dati, che combini la ricerca sui servizi e che predisponga alla ricerca traslazionale, rappresenta un obiettivo di primaria importanza. L'impiego sistematico della scheda RAI - Long Term Care Facilities (LTCF) può: migliorare gli outcome clinico-funzionali e la qualità di vita degli ospiti; migliorare l'attenzione alla specificità di ogni paziente, realizzando un piano individualizzato di assistenza; verificare l'efficacia e la sicurezza di farmaci; monitorare le modificazioni nel tempo sia dei singoli che della comunità nella sua interezza; ottimizzare la qualità dell'assistenza attraverso il miglioramento dell'utilizzo delle risorse; consentire lo svolgimento di ricerca traslazionale e clinica sulla complessità nell'anziano; creare una banca dati su una ampia popolazione di anziani del "mondo reale".

La popolazione oggetto dello studio include tutti i pazienti con un'età > 65 anni, ricoverati presso le RSA del gruppo San Raffaele S.p.A., che abbiano firmato il consenso informato di adesione alla banca dati. Viene compilata, nel rispetto della normale pratica clinica, la scheda RAI - LTCF, gestita mediante il software Atl@nte. Il software Atl@nte-LTCF è lo strumento informatico che ha la licenza di gestire, in maniera sistematica ed omogenea, la raccolta delle diverse informazioni sullo stato di salute (inteso in senso globale nelle aree funzionale - sanitaria - cognitiva - sociale), rilevate mediante la scheda di VMD RAI- LTCF, nel rispetto alla legge sulla privacy e delle linee guida del Garante.

La scheda RAI - LTCF viene compilata dopo 30 giorni ( + 3 giorni) dall'ingresso nella RSA del paziente, routinariamente a cadenza semestrale nel corso della degenza, e in caso di ricovero ospedaliero o di decesso. In aggiunta, poiché la scheda RAI - LTCF non è strutturata per rilevare in maniera adeguata la comparsa di eventi acuti, ad eccezione di outcome hard, quali ospedalizzazione e/o decesso, è stata creata, mediante il sistema web Atl@nte, una scheda informatizzata delle "acuzie", nella quale il personale dedicato deve inserire le seguenti informazioni: data dell'evento, diagnosi, esito, eventuali modificazioni della terapia. Informazioni aggiuntive relative a long term outcome (cause di morte, SDO, etc.) saranno raccolte anche dopo la dimissione tramite linkage con database sanitari regionali e nazionali.

La banca dati permette di avere un quadro epidemiologico completo e complessivo su un'ampia popolazione di anziani del "mondo reale", residente in un network di RSA, distribuite nel territorio nazionale. I dati possono, oltre che migliorare gli outcome clinico-funzionali e la qualità di vita degli ospiti, dare luogo ad ulteriori approfondimenti su tematiche specifiche, quali: prevenzione, diagnosi precoce di declino cognitivo, trattamenti farmacologici per polipatologie, appropriatezza prescrittiva, prevalenza di effetti collaterali e/o reazioni avverse ai farmaci, elaborazione di percorsi assistenziali personalizzati estesi anche sul territorio.

La banca dati contribuirà alla prevenzione della condizione di fragilità, consentendo di identificare gli anziani più a rischio e attuare così misure preventive e terapeutiche.

Nell'anno 2013 il progetto è stato implementato e consolidato. Il progetto è stato riformulato e presentato al Comitato Etico che ha dato parere positivo.

Nel 2013 sono state compilate circa 700 cartelle LTCF. E' stato, inoltre, effettuato un iniziale lavoro di revisione e di pulizia dei dati delle suddette cartelle. Tale lavoro ha portato alla elaborazione di un manuale pratico per la compilazione delle schede LTCF, che è stato distribuito alle strutture partecipanti al protocollo.

## **Ministero degli Affari Esteri Bando Italia USA**

### *Ruolo del Recettore Mineralcorticoide endoteliale nell'infiammazione vascolare e nell'arterosclerosi*

Numerosi trial clinici, dimostrano che l'antagonismo del recettore mineralcorticoide riduce nell'uomo gli eventi ischemici. Mentre studi precedenti su modelli animali hanno analogamente suggerito che l'aldosterone promuove l'aterosclerosi, poco si conosce circa i meccanismi coinvolti in questo processo.

In una prima fase, si è iniziato con il caratterizzare in vivo la cinetica e la distribuzione dell'aterosclerosi indotta dall'aldosterone utilizzando topi KO per l'apolipoproteina E (ApoE-/-) trattati con pellet sottocutanei contenenti solo veicolo (controllo) o aldosterone, e sottoposti a dieta ad alto contenuto di grassi per quattro o otto settimane.

Questi due tempi sono stati scelti specificatamente per esaminare le fasi precoci dell'aterogenesi. Dopo quattro settimane, gli animali trattati con aldosterone, confrontati con quelli trattati con il veicolo, presentavano un aumento di 1.8 volte ( $p < 0.001$ ) dell'area della placca nella radice dell'aorta e di 4.5 volte ( $p < 0.05$ ) nell'arco aortico.

Come atteso, nei topi sottoposti a dieta ad alto contenuto di grassi per 8 settimane si sono osservate placche di maggiore dimensione rispetto a quelli sottoposti alla dieta per sole quattro settimane.

Ad 8 settimane, confrontando gli animali trattati con il veicolo con quelli infusi con aldosterone, si è osservato che l'area delle placche nell'arco aortico è aumentata di 2.9 volte ( $p < 0.001$ ), mentre a livello della radice aortica non sono state osservate differenze. È interessante notare che in entrambi i punti della cinetica non sono state osservate differenze di area delle placche nell'aorta addominale, una regione a flusso laminare. È importante sottolineare che, ad entrambi i punti di cinetica, saggi RIA effettuati sul siero, indicano che i livelli di aldosterone sono mediamente più elevati (3-5 volte) nel gruppo trattato, mentre non sono state osservate differenze nei tradizionali fattori di rischio cardiovascolare (glucosio, colesterolo, pressione sanguigna).

Per determinare come l'aldosterone influisca sulla composizione della placca sono state effettuate sezioni seriali della radice aortica dai topi ApoE<sup>-/-</sup> trattati con veicolo di controllo o aldosterone per 4 settimane. Le sezioni sono state colorate per il rilevamento di lipidi, cellule infiammatorie attivate, collagene e cellule muscolari lisce.

Sia la regione da studiare che i tempi sono stati scelti in quanto forniscono l'indicazione più attendibile e riproducibile dell'aumento aldosterone-dipendente dell'area della placca.

Inoltre, le placche isolate dagli animali trattati con aldosterone contengono un quantitativo maggiore di lipidi (2.1 volte,  $p < 0.005$ ) e di cellule infiammatorie attivate (2.2 volte,  $p < 0.05$ ). Non sono state osservate differenze significative nel contenuto in collagene delle placche tra i due gruppi.

Per completare gli studi di immunoistochimica che mostrano che l'aldosterone aumenta l'infiammazione delle placche, sono state isolate cellule vascolari dall'arco aortico dei topi ApoE<sup>-/-</sup> trattati con veicolo o aldosterone per 4 settimane. Le cellule infiammatorie in questi campioni sono state quantificate mediante analisi al citofluorimetro.

In accordo con i dati che mostrano un aumento MR-dipendente sia nell'area totale delle placche sia nell'attivazione delle cellule dell'infiammazione, gli animali trattati con aldosterone hanno mostrato sia un aumento nel numero dei linfociti (CD45<sup>+</sup>, 1.8 volte,  $p < 0.05$ ) sia un aumento nel numero delle cellule infiammatorie attivate (107b<sup>+</sup>, 2.0 volte,  $p < 0.05$ ).

In particolare, sono state impiantate minipompe per il rilascio di aldosterone in topi, maschi e femmine, KO per ApoE, andando a paragonare dopo 4 settimane di dieta ad alto contenuto di grassi gli effetti dell'aldosterone sulla dimensione delle placche a livello dell'arco aortico nei topi maschi e femmine. Un dato interessante emerso consiste nell'osservazione che in topi di sesso femminile l'effetto dell'aldosterone nell'incrementare la dimensione delle placche risulti attenuato rispetto a quanto si osserva in topi di sesso maschile e indica una probabile azione protettiva degli estrogeni circolanti nei confronti dell'azione pro-aterosclerotica dell'aldosterone. Questi risultati hanno indicato un effetto "gender-specific" dell'aldosterone.

Al fine di studiare nel contesto dello sviluppo dell'aterosclerosi il ruolo della modulazione di ICAM-1 da parte di MR, già in precedenza descritto in sistemi cellulari in vitro dal gruppo di ricerca, è stato recentemente generato nel laboratorio un modello di topo transgenico doppio knock-out (KO) per ApoE e ICAM-1. Purtroppo non si è riusciti ad ottenere in tempo utile per la chiusura del progetto un numero sufficiente di topi doppi KO per completare lo studio previsto. Ciò a causa del tempo necessario per la procedura di riderivazione del ceppo ICAM<sup>-/-</sup>, resasi necessaria per la contaminazione dei topi ricevuti dal laboratorio di Boston, e della scarsissima fertilità dei topi eterozigoti ApoE<sup>-/-</sup> ICAM<sup>+/-</sup>. La maggior parte di questi accoppiamenti ha generato scarsissima progenie (3-4 topi per accoppiamento, di genotipo quasi mai adatto allo studio).

Al momento si dispone di una coppia doppio KO, attualmente in fase di amplificazione,

mentre vi sono attualmente 11 accoppiamenti in corso di coppie eterozigoti, da cui ci si aspetta, secondo la legge mendeliana, almeno  $\frac{1}{4}$  di genotipi doppio KO.

Per i trattamenti farmacologici con aldosterone sono state impiantate delle minipompe osmotiche (Alzet) con un rilascio di aldosterone (Sigma) pari a  $240 \mu\text{g kg}^{-1} \text{d}^{-1}$  per quattro settimane consecutive. Al termine della prima settimana la concentrazione di NaCl nell'acqua è stata portata dallo 0.9% all'1%.

La concentrazione di aldosterone nel siero è stata rilevata mediante saggio RIA (Diagnostic Products Inc.). Inoltre, sono stati raccolti campioni di urine delle 24 ore e di siero sia dagli animali sottoposti a dieta normale sia da quelli sottoposti a dieta a basso contenuto di sale; si è proceduto alla quantificazione degli elettroliti (IDEXX Preclinical Services) e al calcolo di FENa:  $\text{FENa} = (\text{serumCr} * \text{urineNa}) / (\text{serumNa} * \text{urineCr}) * 100$ . Sono state ottenute sezioni di aorta toracica da campioni inclusi in paraffina prelevati da animali di 3, 9 e 18 mesi di età (3 campioni per età, gruppo e genotipo). Le sezioni sono state colorate mediante Masson's trichrome e il contenuto di collagene è stato quantificato con un'analisi morfometrica computerizzata (image-Pro software) come descritto in precedenza.

Grazie al progetto bilaterale, è stata acquisita notevole esperienza sulle tecniche avanzate per lo studio dell'aterosclerosi in vivo, oltre ad una ottima capacità nella gestione dei modelli murini transgenici. Il modello transgenico necessario allo studio è stato infatti creato negli stabulari italiani ed è pronto per lo studio.

## **AREA DI RICERCA APPROCCI DI SISTEMA E MALATTIE NON TRASMISSIBILI**

### **Bando INAIL – Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro – Anno 2010**

*Valutazione di biomarker di instabilità genetica, danno ossidativo e lesioni precoci in sangue, cellule esfoliate dalla mucosa boccale ed esalato bronchiale di lavoratori a rischio-amianto*

Il progetto è incentrato sulla comparazione di una batteria di biomarcatori in personale addetto alla bonifica di amianto, in soggetti non esposti ad amianto e in soggetti sottoposti a esposizione intensa ad amianto nel passato. A seguito di alcune criticità il progetto ha richiesto una modifica del disegno dello studio e della tempistica concordato, direttamente con INAIL. Il progetto avviato nel corso del 2011 ha completato nel 2013 il reclutamento dei soggetti ex-esposti ad amianto e dei controlli. E' in corso il reclutamento dei soggetti correntemente esposti. Contestualmente è stata avviata e in parte completata la realizzazione dei saggi previsti di laboratorio.

### **Fondazione Umberto Veronesi**

*Micronucleus frequency in exfoliated buccal cells as a biomarker of DNA aging and risk for age-related diseases*

La misurazione del micronucleo (MN) è uno dei biomarcatori più popolari di instabilità genetica. La frequenza di MN tende ad aumentare con l'aumentare dell'età per via dell'effetto cumulativo delle esposizioni che si verificano nel corso della vita, per cui è possibile che alcuni soggetti esposti ad agenti genotossici possano subire maggiori

danni rispetto ai soggetti di pari età non esposti a tali agenti.

Pertanto, MN può essere utilizzata come “indicatore di invecchiamento” del genoma indipendentemente dall’età cronologica. MN è un buon predittore di invecchiamento, e viene proposta come un indicatore di rischio precoce per le malattie legate all’età.

Gli obiettivi di questo progetto sono:

1. determinare se MN in cellule buccali esfoliate possa essere utilizzato come valido marcatore dell’età del DNA;
2. Studiare la relazione tra l’instabilità genomica e il rischio di sviluppare una malattia associata all’invecchiamento.

Lo studio è suddiviso in:

- Raccolta dei dati. I dati vengono estratti dal progetto di collaborazione internazionale HUMNxl, un database che memorizza i dati su MN da oltre 30 laboratori in tutto il mondo.
- Follow-up dei soggetti. Per ogni soggetto viene accertato lo stato vitale. Per i defunti, la causa della morte è raccolta e codificata secondo i criteri di ICD-X. Nelle aree coperte dai Registri del Cancro, viene raccolta anche l’incidenza del cancro.
- Analisi statistiche. La relazione tra MN ed età è stimata adattando un modello binomiale negativo alla frequenza MN di ciascun soggetto. Nel modello è incluso un effetto casuale per tener conto della eterogeneità tra laboratori. L’effetto di MN sulla probabilità di invecchiamento libero da malattia alla fine del follow-up è valutato mediante modello di rischio proporzionale di Cox.

La disponibilità di un indicatore convalidato di malattie legate all’età permette una diagnosi precoce dei gruppi ad alto rischio da includere nelle strategie di monitoraggio e di prevenzione volte a ridurre l’impatto di queste malattie sulla salute pubblica.

## **Fondazione per la Ricerca Scientifica Termale (FORST)**

### *Effectiveness of thermal water nasal inhalation and irrigation in rhinopharyngitis and sinusitis*

Rinofaringite e sinusite sono un problema di salute comune. Alcuni effetti benefici di cure inalatorie con acque termali sono stati dimostrati in termini di sintomi, funzionalità nasale, citologia e microbiologia. Tali effetti potrebbero dipendere dalla regolazione dell’espressione di diverse componenti del sistema immunitario innato nelle cellule dell’epitelio nasale.

La ricerca intende valutare l’efficacia di un ciclo standard di 2 settimane di cure inalatorie con acqua termale in 200 pazienti adulti con rinofaringite o sinusite, reclutati consecutivamente tra quanti vi si sottopongono presso le Terme di Genova srl, Acquasanta (Genova). Le misurazioni includono scala dei sintomi, valutazione clinica, rinomanometria e livelli locali di un pannello di biomarker dell’infiammazione (High Throughput RT PCR analysis, Western Blotting). Nell’analisi dei dati si tiene conto di fattori quali fumo di tabacco, esposizioni lavorative, dieta.

Obiettivi secondari sono la valutazione di: efficacia a 1 anno dalle inalazioni, in termini di sintomatologia e di eventi acuti; fattori clinici e socio-economici che influenzano la compliance dei pazienti e i cambiamenti nella sintomatologia a breve e a lungo termine; eventuali eventi avversi.

Si tratta di uno studio di coorte prospettico della durata di due anni.

All’accettazione, il medico responsabile della ricerca intervista il paziente utilizzando un questionario strutturato per la raccolta delle informazioni su lavoro, fumo, dieta,

anamnesi patologica remota e a 1 anno (in particolare ORL), punteggio sulla scala dei sintomi. Viene effettuata una valutazione clinica comprendente una rinomanometria con lavaggio nasale e la raccolta di cellule della mucosa nasale.

Dopo 2 settimane, terminato il ciclo standard di cure inalatorie, si ripetono scala dei sintomi e valutazione clinica, e si valuta la tollerabilità della terapia.

Un anno dopo, il paziente viene intervistato telefonicamente su anamnesi patologica a 1 anno, particolarmente ORL, scala dei sintomi ed eventuali cambi di abitazione, lavoro, fumo, dieta.

Questionari, schede cliniche e campioni biologici vengono contrassegnati con un codice alfanumerico, per assicurare la cecità dello studio e il rispetto della privacy. Un database dedicato con accesso ristretto raccoglie dati e informazioni relativi ai pazienti. Le cellule nasali sono analizzate con High Throughput (HT) real-time PCR utilizzando una card con 48 mini-pozzetti contenenti altrettanti geni implicati nel sistema immunitario innato e nell'infiammazione, per identificare in 25 pazienti un numero appropriato di geni candidati da testare in seguito in singoli saggi per Real-time PCR negli altri campioni. Le proteine pro-infiammatorie corrispondenti vengono visualizzate nel lisato cellulare per Western blot con gli anticorpi appropriati.

Dopo analisi statistica uni e multivariata, i risultati dello studio sono condivisi con la comunità scientifica internazionale.

Nel corso del 2013 è stato ottenuto il finanziamento dello studio da parte di FORST (Fondazione per la Ricerca Scientifica Termale).

Sono stati predisposti il questionario clinico-epidemiologico, il materiale informativo per il paziente e il medico di famiglia e i moduli per il consenso informato.

Sono stati ottenuti il parere favorevole del Comitato Etico dell'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma e quello del Comitato Etico Regionale della Liguria.

E' stato preparato e realizzato il kick-off meeting con i partecipanti al progetto.

E' stato predisposto il database per la raccolta di tutti i dati.

Sono stati richiesti i preventivi ed effettuati gli ordini dei materiali e strumenti necessari per avviare il reclutamento dei pazienti.

Nel corso del 2014 si prevede di provvedere al reclutamento dei 200 pazienti previsti per la sperimentazione, di procedere all'input dei dati nel database e di iniziare le analisi di laboratorio.

Nel 2015 verranno concluse le analisi di laboratorio, si procederà con le interviste telefoniche e verranno effettuate le analisi statistiche, per procedere alla pubblicazione dei risultati della sperimentazione.

## **AIRC – Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro**

### *Micronucleus assay in buccal exfoliated cells to measure DNA damage and predict cancer in healthy subjects*

Lo studio del danno al DNA nelle cellule esfoliate buccali è un metodo poco invasivo per monitorare l'effetto dell'esposizione ambientale e professionale a agenti genotossici, procedure mediche (ad esempio radiazioni e sostanze chimiche), carenza di micronutrienti (ad esempio folato), lo stile di vita (alcol, fumo, droga e stress), e fattori genetici come difetti ereditari del metabolismo e / o di riparazione del DNA.

E' stato dimostrato che la presenza di micronuclei (MN) e altre anomalie nucleari all'interno di queste cellule è associata a difetti genetici nella conservazione del genoma, all'invecchiamento accelerato, al danno genotossico e ad alcune malattie degenerative.

Per identificare importanti lacune informative riguardanti questo biomarcatore, è stata lanciata una nuova iniziativa, all'interno della collaborazione HUMAN MicroNucleus (HUMN): il progetto HUMNxl (dove 'XL' indica la cellula esfoliata). Sono stati inviati degli inviti a partecipare ad un sondaggio a tutti i laboratori che hanno pubblicato sul test del micronucleo buccale. Complessivamente 58 laboratori di 25 paesi hanno accettato di partecipare. I risultati hanno fornito una panoramica dei metodi più comunemente utilizzati per la raccolta e preparazione delle cellule buccali, la preparazione del vetrino, la colorazione, i criteri di scoring e la valutazione di dati epidemiologici, compresi i dati demografici, il background genetico, il genere, lo stato di salute, l'occupazione, lo stile di vita e le abitudini alimentari. Il numero di soggetti potenzialmente disponibile per la meta-analisi è stato stimato intorno 15.000, e fornirà potenza statistica sufficiente per testare molte ipotesi.

Il presente progetto è stato elaborato per affrontare le questioni critiche che emergono dai risultati di questa indagine. Gli obiettivi del HUMNxl quindi includono: (a) la definizione di variabili tecniche ed epidemiologiche che hanno un impatto sulle frequenze di MN buccali in popolazioni umane misurate utilizzando protocolli correnti, non standardizzati; (b) il disegno di studi intra- e inter-laboratorio necessari per quantificare queste variabili e produrre protocolli standard affidabili per: la raccolta delle cellule buccali e loro stoccaggio, preparazione del vetrino e colorazione, l'identificazione dei vari tipi di cellule e dei diversi indici di danno, MN e anomalie nucleari diverse da MN, la registrazione dei dati, analisi e reporting; (c) chiarire se la frequenza MN nelle cellule buccali e di altri biomarcatori citome possa essere utilizzata per la previsione di cancro, malattie cardiovascolari e disturbi neurodegenerativi.

Il progetto è stato rifinanziato nel corso del 2013. È in corso l'analisi della letteratura per la produzione di systematic review papers, la circolazione delle informazioni tra i centri partecipanti e la conduzione del follow-up nei centri partecipanti allo studio prospettico.

## **Unione Europea – VII Programma Quadro**

### *SCRIPT (Supervised Care and Rehabilitation Involving Personal Tele-robotics)*

In collaborazione con:

- University of Hertfordshire Higher Education Corporation, England
- R.U.Robots Limited of PO Box 248, Manchester, UK
- University of Sheffield
- Universiteit Twente, Enschede, The Netherlands.
- Roessingh Research and Development BV
- MOOG BV, Nieuw Vennep, The Netherlands
- User Interface Design GmbH, Ludwigsburg Germany

Recentemente si è mostrato che la riabilitazione robot assistita permette il recupero di soggetti affetti da ictus e il risparmio di risorse economiche, poiché riesce a fornire un allenamento al soggetto costante e ripetitivo, senza andare incontro a fatica (inevitabile nel caso di terapia fornita dall'uomo). Sulla base di ciò, il progetto europeo SCRIPT ha come scopo quello di sviluppare due esoscheletri di mano/ polso (uno attivo e uno passivo) e di eseguire con essi la riabilitazione di soggetti affetti da ictus. Tali soggetti effettuano la riabilitazione robotica autonomamente a casa, sotto la supervisione a distanza di clinici (tele-riabilitazione). La comunicazione paziente-clinico è possibile grazie



a una interfaccia disponibile a entrambe le parti e funzionante tramite internet. Alla fine di tre anni di progetto SCRIPT, si vuole valutare l'efficacia della tele-riabilitazione robotica, della riabilitazione eseguita con gli esoscheletri sviluppati e valutare eventuali differenze tra i due approcci riabilitativi.

Nel corso del 2013 sono stati sviluppati i due esoscheletri. Quello passivo è stato utilizzato per la tele-riabilitazione di 24 soggetti i quali hanno mostrato miglioramenti funzionali e motori. I gruppi clinici coinvolti in SCRIPT sono ora impegnati ad ottenere l'approvazione dai rispettivi comitati etici (istituzionali e nazionali) per lo svolgimento della tele-riabilitazione di pazienti con l'esoscheletro attivo. I partner coinvolti nel progetto sono 8: The University of Hertfordshire Higher Education Corporation; R.U.Robots Ltd; The University of Sheffield; Universiteit Twente; Roessingh Research and Development bv; Moog bv; San Raffaele S.p.A.; User Interface Design gmbh.

Il San Raffaele è coinvolto nel progetto come partner clinico. Fino ad ora è stata eseguita la riabilitazione dei 10 soggetti previsti. In quanto partner clinico, il San Raffaele ha come obiettivo per il terzo anno quello di far approvare il trial clinico con il secondo sistema robotico prodotto nel progetto SCRIPT dal Ministero della Salute per condurre la tele-riabilitazione su ulteriori 10 pazienti.

### *eWall for Active Long Living (eWALL)*

In collaborazione con:

- Aalborg Universitet
- Hewlett Packard Italiana Srl
- Ericsson Nikola Tesla D.D.
- Roessingh Research And Development Bv
- Cure Centrum Fur Die Untersuchung Und Realisierung Endbenutzerorientierter Interaktiver Systeme
- Research And Education Laboratory In Information Technologies
- Universitatea Politehnica Din Bucuresti
- Ss. Cyril And Methodius University In Skopje
- Javna Ustanova Univerzitet Crne Gore Podgorica
- Technical University Of Sofia
- Sveuciliste U Zagrebu Fakultet Elektrotehnike I Racunarstva
- Stelar Security Technology Law Research Ug

Una delle principali sfide del progetto europeo dal titolo "eWall for Active Long Living", presentato nel 7° programma quadro nel Programma specifico "Cooperation", è quella di fornire agli anziani uno stile di vita autonomo, in quanto tale fattore ha un impatto importante oltre che sulla vita stessa dei soggetti, dei parenti e dei caregivers, anche sui sistemi sanitari e assicurativi nazionali.

Gli obiettivi che si vogliono raggiungere attraverso il progetto eWall sono:

- Aiutare l'anziano a mantenere una vita autonoma per un tempo più prolungato;
- Migliorarne la qualità della vita attraverso un gran numero di servizi personalizzati;
- Ridurre i costi per il cittadino, per il servizio sanitario nazionale e per le compagnie assicurative;

I servizi offerti al cittadino sono:

- gestione del rischio e sicurezza in casa
- eHealth
- gestione dello stile di vita

eWall è in una parete prefabbricata, che può essere montata su una parete preesisten-

te, che copre tutta la tecnologia ICT necessaria ad attivare un numero di servizi per l'anziano. Un' ampia rete di sensori integrati nella casa o indossati dal paziente verifica le attività quotidiane degli anziani tramite un complesso di servizi intelligenti, personalizzati ed auto-adattativi che permette il controllo di un corretto stile di vita. Tra le sue funzionalità, eWall suggerisce scelte appropriate (ad esempio ricordando l'assunzione di farmaci prescritti) e corregge eventuali comportamenti errati o rischiosi per la salute (ad esempio l'allontanamento inconsueto dalla casa). Inoltre provvede alla diagnostica immediata delle criticità (come cadute, luci accese durante la notte, eccessiva inattività, complicazioni cardiache), sempre applicando gli standard più avanzati per il rispetto totale della dignità e la privacy. Il sistema è gestibile da una semplice interfaccia integrata nella parete di casa grazie a soluzioni tecnologiche di domotica evoluta sviluppate appositamente.

I lavori sono stati avviati nel mese di novembre del 2013 e vedono coinvolte 13 tra aziende e istituzioni che rappresentano l'eccellenza europea della ricerca e dello sviluppo, che collaboreranno per progettare, realizzare e validare questo prodotto che rappresenta il futuro dell'assistenza avanzata, integrata nella vita di tutti i giorni. L'IRCCS San Raffaele Pisana mette a disposizione di questo impegnativo progetto uno staff di medici, ingegneri, epidemiologi, terapisti e tutta la grande esperienza nella cura, la riabilitazione e la telemedicina su pazienti anziani, sia partecipando alla progettazione delle piattaforme standardizzandone le caratteristiche, sia valutando l'impatto di questo prodotto innovativo sulla qualità della vita di pazienti con declino cognitivo lieve (MCI) e con bronco pneumopatia cronica ostruttiva (BPCO).

Nel corso del 2014 verrà sviluppato il prototipo, e successivamente validato in un setting clinico su piccola e larga scala.

*FRAILOMIC Initiative: Utility of omic-based biomarkers in characterizing older individuals at risk for frailty, its progression to disability and general consequences to health and well-being - The FRAILOMIC Initiative*

In collaborazione con:

- Servicio Madrilenio de Salude
- World Health Organization
- Life Length SL
- YH TouHealth AB
- Evercyte GMBH
- Sistema Genomicos SL
- Mosauques Diagnostica GMBH
- Innovacion Desarrollo Y Transferenc de Tecnologia SA
- Nihce Science & Technology LTD
- University of Bedfordshire
- Universidad Autonoma de Madrid
- Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse
- Institut Nazional de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM)
- Azienda Sanitaria di Firenze
- Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma
- Università di Innsbruck
- Cardiff Metropolitan University
- Friedrich Schiller University Jena
- Universitat de Valencia

## AREA DI RICERCA BIOTECNOLOGIE AVANZATE

### PROGETTO MERIT

*Nuovi networks molecolari per il controllo dell'omeostasi energetica: implicazioni per il diabete di tipo 2 e l'obesità*

In collaborazione con la Fondazione San Raffaele a Ceglie Messapica

Le malattie metaboliche (come il diabete di tipo 2 e l'obesità) hanno elevate implicazioni sociali e un impatto significativo sulla salute pubblica, a causa principalmente della loro elevata incidenza e la percentuale di complicanze. A rendere difficile ulteriormente il quadro è il dato epidemiologico di una significativa associazione tra sindrome metabolica e cancro.

In tale contesto, il progetto si prefigge quale obiettivo primario l'attivazione ed implementazione di un database clinico e biobanca per lo studio di pazienti affetti da neoplasie solide e/o diabete mellito. Obiettivi secondari sono quelli di caratterizzare possibili biomarcatori da utilizzare nella valutazione prognostica e nella risposta al trattamento di pazienti con malattie dismetaboliche con o senza cancro. La scoperta di nuovi biomarcatori è, infatti, essenziale per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di tali condizioni patologiche, per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e per predire in maniera personalizzata la mancata risposta ad un determinato trattamento farmacologico, o la possibile insorgenza di effetti indesiderati. Il raggiungimento di tali obiettivi si basa sul disegno di studi di ricerca traslazionale ed applicativa biomedica basati sulla valutazione di campioni biologici omogenei per patologia, caratteristiche cliniche e processi di raccolta e mantenimento. La BioBIM dell'IRCCS San Raffaele Pisana, grazie alla sua strutturazione come biobanca multidisciplinare ed alla gestione del campione in base a procedure operative standardizzate condivise tra i centri partecipanti al progetto, è in grado di fornire un servizio per lo sviluppo di linee di ricerca interdisciplinari e scambi tra diversi gruppi di lavoro.

Per quanto riguarda l'implementazione tecnologica, prevista tra gli obiettivi del progetto, ed al fine di migliorare gli standard qualitativi dei campioni processati nella BioBIM e resi disponibili per gli studi citati, una parte dell'attività di ricerca è stata incentrata sull'implementazione del codice SPREC (per la definizione standardizzata delle caratteristiche qualitative pre-analitiche a cui il campione stesso è stato sottoposto) (<http://www.isber.org/wg/bs/sprec.cfm>) e sulla messa a punto di un software dedicato (SPRECware) di visione globale per il massimo sfruttamento dei codici SPREC ([www.spreware.org](http://www.spreware.org)), che mira a facilitare l'interscambio di campioni tra i centri coinvolti in specifici progetti di ricerca. Il criterio di base utilizzato nella messa a punto del software è dato dalla possibilità di associare ciascun campione conservato nella Biobanca ad un codice che ne riassume le informazioni preanalitiche (SPREC). Questo approccio permette alle biobanche di condividere un trasferimento dati completamente automatizzato senza alcun intervento manuale, a condizione che i laboratori coinvolti nello scambio di campioni condividano il codice SPREC. Inoltre, la disponibilità di una banca dati federata con una collezione di codici SPREC (che non incapsula i dati personali) consente al ricercatore di eseguire un controllo preliminare e selezionare il materiale migliore per pianificare un determinato studio. Infine, l'adozione di Standard Operative Procedure (SOP) per il controllo della qualità dei campioni biologici legato alle fasi della loro processazione, ha rappresentato un ulteriore obiettivo della ricerca. I risultati ottenuti nei nostri laboratori hanno consentito di individuare QC ottimali, sia per i fluidi

che per i campioni tessutali. Gli strumenti che sono risultati più adeguati a tale scopo e più facilmente applicabili sono stati quelli con una soglia di variazione preanalitica nota e un intervallo di riferimento per l'analisi QC noto.

Allo stato dell'arte, sono stati reclutati oltre 3000 soggetti, inclusi pazienti affetti da tumori solidi (N=1025, di cui il 16% obesi ed il 34% con diabete iatrogeno), pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (T2DM, N=1178, di cui il 21% obesi ed il 17% con patologie oncologiche associate), nonché individui apparentemente sani da utilizzare quale popolazione di controllo. A proseguimento delle indagini già avviate nel corso degli anni precedenti sono stati effettuati alcuni studi specifici al fine di individuare patterns biomolecolari correlabili allo sviluppo di neoplasia o alla predittività della risposta al trattamento. In particolare, è stato effettuato lo studio mutazionale dei geni KIT e PDGFRA in 40 casi di pazienti affetti da GIST (gastro intestinal stromal tumors), patologia paradigmatica dello stretto connubio tra analisi delle varianti nucleotidiche e farmacogenetica. I risultati hanno permesso di individuare le neoplasie con resistenza primaria e secondaria al trattamento con inibitori delle tirosin chinasi. Sempre in relazione agli studi di farmacogenomica sono stati valutati i polimorfismi C677T e A1298C del gene MTHFR su 925 pazienti con familiarità per trombosi e patologie associate ad uno status ipercoagulante. Data l'ipotesi secondo la quale in individui eterozigoti per entrambi i polimorfismi, i livelli di omocisteina totale possono variare in base alla configurazione delle basi mutate (in trans su alleli differenti, o in cis sullo stesso allele), è stata presentata una semplice metodica basata sulla separazione allelica e sul clonaggio che consente di discriminare tra queste due possibilità.

Sempre in ambito oncologico, sono stati analizzati alcuni indici predittivi di tromboembolismo venoso (TEV), una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti oncologici, soprattutto nei primi tre mesi di trattamento. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la possibilità di identificare pazienti ad alto rischio grazie all'introduzione diagnostica di alcuni test funzionali coagulativi, o mediante caratterizzazione molecolare di alcune varianti geniche a carico del promoter del gene TNFA. Inoltre, la valutazione di un numero consistente di pazienti oncologici ha evidenziato che il trattamento con regimi chemioterapici a base di composti del platino è responsabile dell'insorgenza di una condizione di trombofilia acquisita e rappresenta una variabile predittiva di TEV anche dopo correzione per altri fattori di rischio noti. Questo dato assume particolare rilievo soprattutto in pazienti anziani (over 70) in cui la presenza di co-morbilità (es. diabete) aumenta in maniera sostanziosa il rischio tromboembolico in relazione all'uso di composti del platino. È noto che l'impiego di regimi chemioterapici a base di platino nel paziente anziano è limitato a causa dell'elevato rischio di tossicità cardiovascolare, con ricadute clinico-assistenziali di notevole importanza nel percorso terapeutico e riabilitativo del paziente oncologico anziano. Una migliore stratificazione del rischio tromboembolico e l'uso di una profilassi adeguata potrebbe permettere l'applicazione di protocolli chemioterapici a base di composti del platino senza interferire con la morbilità e la qualità di vita (QdV) di pazienti oncologici anziani, evitando di esporre i pazienti non a rischio agli effetti deleteri di eventuali complicanze emorragiche.

## POR FESR 2007-2013 – Regione Sicilia

### Linea di Intervento 4.1.1.1

#### *Sistema integrato per l'armonizzazione delle procedure e la gestione delle biobanche. SIASOPs BioBank*

Il progetto ha visto quale obiettivo principale la strutturazione di una piattaforma di gestione informatica per l'accesso multiutente in remoto. La soluzione software sviluppata per la gestione dei dati clinici relativi agli utenti della banca dati Biologica è oloHEALTH-Biobim. Esso è stato realizzato con tecnologia "web based" pura, essendo utilizzabile sui più recenti sistemi operativi Microsoft Windows, Apple e Linux e sui Sistemi Operativi dei tablet più diffusi. Il sistema è dotato di moduli che offrono la possibilità di elaborare statistiche ed estrapolare grafici sull'attività. Il sistema si è rivelato uno strumento essenziale per gestire e documentare processi di analisi dei campioni biologici e per la ricerca. oloHEALTH-Biobim è uno strumento che permette facilmente ad un team, all'interno del quale ognuno dei componenti ha ruoli differenziati, la registrazione dei dati clinici del "Workflow" e un'analisi approfondita che risulta essere fondamentale per assicurare trasparenza e chiarezza nella erogazione di prestazioni corrette, appropriate e tempestive da parte di tutti gli operatori sanitari coinvolti nel percorso clinico-assistenziale di un paziente.

Essendo il sistema "Web Based" ne è consentito l'utilizzo da diversi dispositivi, se connessi in rete o internet; inoltre la gestione tramite "sistemi di autorizzazione" a più livelli. Altri utenti autorizzati, possono consultare il software per estrapolare statistiche e report.

La reportistica e le funzioni di ricerca già presenti nella suite permettono di monitorare in tempo reale le attività oggetto del servizio, come la ricerca di tutte le registrazioni effettuate e la possibilità di estrarre dati statistici in vari formati, tra cui Excel. La validazione tecnica del sistema ha permesso l'esecuzione di alcuni studi retrospettivi su casistiche selezionate di pazienti. In particolare, sono stati avviati alcuni studi che prevedono la valutazione di polimorfismi di geni coinvolti nei meccanismi patogenetici dell'emicrania in circa 600 pazienti affetti. In particolare, sono state analizzate le associazioni tra le caratteristiche socio-demografiche e cliniche di pazienti con emicrania ed il polimorfismo I/D del gene codificante per l'ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme). A tal riguardo, è stata dimostrata la presenza di una associazione significativa tra il polimorfismo I/I ed un uso ridotto di profilassi farmacologica in pazienti con emicrania cronica ed emicrania con aura, a conferma dell'importanza degli ACE-inibitori nella prevenzione dell'emicrania. Inoltre, sempre a riguardo dell'assetto farmacogenetico di questi pazienti, è stato dimostrato che i genotipi della SOD2 (superossido-dismutasi)(Val16Ala) sono associati al tipo di farmaco analgesico adottato per controllare gli attacchi di emicrania con aura. In particolare, pazienti portatori del genotipo CC utilizzano preferibilmente triplani, mentre quelli portatori del genotipo TT utilizzano preferibilmente FANS (farmaci anti-infiammatori non steroidei). Una combinazione dei due farmaci è invece efficace in pazienti portatori del genotipo CT. L'estensione degli studi ad altri biomarcatori genetici ha infine dimostrato che il polimorfismo rs1042838 (G/T - Val660Leu) del gene codificante il recettore del progesterone (PGR), pur non essendo un fattore di rischio diretto per l'emicrania, è associato in maniera significativa ad un'età d'insorgenza più avanzata della patologia.

Altri studi hanno, invece, preso in considerazione il paziente oncologico, nel quale è necessario garantire una presa in carico globale del malato fin dall'inizio del percorso

terapeutico, attraverso un approccio multidisciplinare e multidimensionale, che garantisca da un lato il miglior trattamento antitumorale e dall'altro un precoce riconoscimento di eventuali altri bisogni del malato, permettendo un inserimento precoce delle cure palliative e la riabilitazione per la prevenzione ed il controllo dei sintomi legati alla malattia e/o alle terapie. In particolare, sono stati analizzati alcuni indici predittivi di tromboembolismo venoso (TEV), una causa importante di morbilità e mortalità nei pazienti oncologici, soprattutto nei primi tre mesi di trattamento.

Grazie alla piattaforma di gestione informatica implementata, si è stati in grado di estrarre ed elaborare in tempi rapidi una ampia mole di dati associati ai campioni conservati nella biobanca ed esaminati nel corso di indagini diagnostiche tradizionali ed innovative. In particolare, le analisi condotte nell'ambito del progetto su un campione di oltre 800 pazienti hanno messo in evidenza la possibilità di identificare pazienti ad alto rischio di TEV grazie alla valutazione del tasso presunto di filtrazione glomerulare (eGFR) mediante una semplice formula che utilizza età, sesso, e livelli di creatinina sierica. La disponibilità di una variabile predittiva come l'eGFR è accattivante. Infatti, contrariamente alla maggior parte dei biomarcatori che sono stati proposti negli ultimi anni, la determinazione dell'eGFR dipende unicamente da un test di routine e non richiede laboratori di secondo livello e/o di personale specializzato. Inoltre, la determinazione della creatinina sierica è obbligatoria nell'inquadramento clinico del paziente, e non rappresenta un costo aggiuntivo per il Sistema Sanitario Nazionale (Oncologist, in corso di stampa, 2014). Altro dato interessante è sorto dall'analisi dei dati clinici associati ai campioni, che ha evidenziato come il rapporto neutrofili/linfociti (la cui determinazione è sempre routinaria nella gestione del paziente) sembrerebbe avere un valore predittivo per eventi tromboembolici in corso di chemioterapia.

Obiettivi secondari del progetto sono stati la definizione dei controlli di qualità (J Mol Diagn 15:3-16, 2013) e la corretta applicazione dei codici SPREC nell'interscambio di campioni tra la sede decentrata e la BioBIM (Biopreservation & Biobanking, 11:260-266, 2013), nonché l'identificazione di procedure operative standard preanalitiche specifiche per la crioconservazione di sangue in toto dedicato alla estrazione del DNA per una ottimale identificazione di marcatori molecolari e profili genetici. Relativamente a quest'ultimo punto è stato sviluppato un metodo rapido, affidabile, semplice e a basso costo basato sul fingerprinting del DNA, da utilizzare come strumento di routine nel controllo della qualità dei campioni della BioBIM (Int. J. Biol. Markers, 28:e398-404, 2013).

### **Ricerca sponsorizzata da privati**

*Cancer related-inflammation - Studio spontaneo no profit parzialmente sponsorizzato dalla ditta Merck KGaA.*

È stata attivata una collaborazione tra la BioBIM e la ImmunoOncology Platform della Merck Serono. Il progetto prevede l'analisi retrospettiva di numerosi marcatori infiammatori su campioni di tessuti tumorali umani, inclusi carcinomi del tratto gastrointestinale, della mammella e del polmone. Lo scopo del progetto è definire alcune componenti specifiche della risposta infiammatoria associata alla progressione tumorale, al fine di identificare possibili nuovi target terapeutici.

L'analisi dei tessuti è stata avviata durante il mese di dicembre 2013. Una valutazione ad interim dei risultati preliminari è prevista nel secondo trimestre del 2014.

### LABORATORIO DI NEUROBIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

#### Bando ISS-Istituzioni USA

*Innovative immunotherapeutic strategies in Alzheimer's disease by intracellular antibody technology*

L'accumulo del peptide  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) sotto forma di strutture conformazionali quali protofibrille, fibrille ed oligomeri costituisce uno degli eventi chiave nella patogenesi della malattia di Alzheimer (AD). Strategie immunoterapeutiche mirate a diminuire l'accumulo di  $A\beta$  nel cervello così come a neutralizzare gli effetti neurotossici e sinaptotossici ad essa associati si sono dimostrate potenzialmente efficaci. Tra queste, la tecnologia degli anticorpi intracellulari mostra diversi vantaggi: utilizza formati anticorpali che non inducono risposte immunologiche avverse, possono essere veicolati verso compartimenti intracellulari specifici, sono facili da manipolare e modificare etc.

Numerose evidenze sperimentali ottenute sia in vitro che in vivo hanno evidenziato un ruolo primario degli oligomeri dell' $A\beta$  1-42 nell'induzione dei fenomeni neurotossici e sinaptotossici tipici dell'AD. Al fine di sviluppare nuove strategie immunoterapeutiche specifiche per le forme oligomeriche del peptide  $A\beta$ , sono stati generati anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica (ScFv $A\beta$ 1-42) diretti verso quattro diversi compartimenti subcellulari: l'apparato secretorio, la membrana plasmatica, il compartimento pre-sinaptico e quello post-sinaptico.

Nel corso di questo anno, per ottenere una caratterizzazione funzionale degli anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica, sono stati espressi tali anticorpi (unitamente ad un anticorpo non rilevante come controllo negativo) in linee neuronali geneticamente modificate ad esprimere elevati livelli di  $A\beta$  oligomerica. Utilizzando i lisati proteici di cellule esprimenti gli anticorpi pre- e post-Syn-ScFv $A\beta$ 1-42, ed i lisati e i soprannatanti di colture trasfettate con l'anticorpo Sec-ScFv $A\beta$ 1-42, mediante saggio ELISA si è osservato che questi ScFv possiedono una significativa attività di legame verso le forme oligomeriche del peptide  $A\beta$  1-42. Un risultato analogo è stato osservato mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione.

Per valutare le proprietà sinapto e neuroprotettive degli ScFv anti- $A\beta$  1-42 oligomerica, sono stati subclonati questi costrutti (unitamente ad un anticorpo non rilevante) in vettori ricombinanti adenovirali (rAAV) ed infettato colture murine primarie di neuroni corticali. Dopo circa 7-9 giorni di infezione, le colture infettate sono state trattate con preparazioni oligomeriche di  $A\beta$  1-42. Mediante saggi di MTT, LDH e TUNEL si è osservato come gli ScFv anti- $A\beta$  1-42 sono in grado di contrastare gli effetti neurotossici mediati dalle preparazioni di  $A\beta$  1-42 oligomerica. Inoltre, utilizzando marcatori specifici pre e post-sinaptici mediante analisi per immunofluorescenza e Western blot, si è rilevato che questi anticorpi intracellulari possiedono una buona capacità sinaptoprotettiva. Ci si attende di poter determinare in vivo gli effetti sinapto e neuroprotettivi degli anticorpi intracellulari anti- $A\beta$  1-42 oligomerica utilizzando il modello murino AD 5XFAD.

## LABORATORIO DELLE PATOLOGIE CRONICO-DEGENERATIVE Ministero della Salute – Dispositivi Medici

### *Studio delle contaminazioni microbiche e polimicrobiche a carico dei dispositivi medici per la nutrizione enterale/parenterale*

Alcune malattie (neurologiche, infettive e tumorali) possono determinare un'incapacità temporanea o cronica ad alimentarsi attraverso la bocca. In queste situazioni è necessario assicurare al paziente una nutrizione che può avvenire per via parenterale (infusione in vena attraverso fleboclisi), tramite l'utilizzo di catetere venoso centrale (CVC) o per via enterale, mediante sonde gastriche: sonda naso gastrica, sonda PEG (Percutaneous Endoscopic Gastrostomy), sonda PED (Percutaneous Endoscopic Digijunostomy).

Recenti studi epidemiologici rilevano che nei pazienti alimentati con catetere venoso centrale, insorgono ogni anno circa 250.000-400.000 infezioni batteriche a carico del circolo sanguigno, a cui si associa una mortalità del 10-35%, mentre nei pazienti trattati con PEG si sviluppa un' infezione nel 2-39% dei casi.

È noto che nelle ferite dei siti di uscita dei dispositivi medici CVC e PEG possono insorgere infezioni batteriche causate principalmente da *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*. L'infezione può essere superficiale, attorno al sito di uscita, oppure può progredire lungo il tratto o tunnel del dispositivo medico, aumentando il rischio di invasione batterica delle strutture sottostanti.

Questo tipo di infezione è tipicamente sostenuta dallo sviluppo di un biofilm microbico, (mono-o multi-specie) a livello delle superfici interne o esterne del dispositivo, che deve essere rimosso frequentemente poiché i microrganismi che costituiscono il biofilm sono resistenti, oltre che ai presidi medici comunemente utilizzati, anche alle terapie antibiotiche convenzionali.

E' noto, infatti, che all'interno del biofilm si verificano alcune condizioni capaci di peggiorare la risposta ai farmaci anti-batterici o anti-micotici tra i quali:

- una più lenta e ridotta penetrazione degli antibiotici dovuta alla loro difficoltà di attraversare la matrice esopolisaccaridica;
- una più alta frequenza di coniugazione, che promuove lo scambio di plasmidi che contengono geni codificanti per resistenze multiple agli antibiotici;
- l'insorgenza di fenotipi resistenti, antibiotico-tolleranti, per carenza di ossigeno e nutrienti nelle zone lontane dalla superficie;
- un'attività antagonista di cataboliti microbici che interagendo con le molecole antibiotiche ne neutralizzano l'attività.

Nonostante la gravità del problema che incide in modo fortemente negativo sulle possibilità di sopravvivenza di pazienti già sofferenti per altre patologie, sono attualmente pochi gli studi mirati ad identificare in modo sistematico le specie microbiche (batteriche e fungine) che danno origine ai complessi biofilm polimicrobici misti che spesso danno origine a gravi infezioni sistemiche.

In base a tale quadro preoccupante, è quindi indispensabile la messa a punto di piani per l'identificazione sistematica di microrganismi (con particolare riferimento alle specie vitali non coltivabili e ai ceppi farmaco-resistenti) che contaminano il dispositivo, al fine di verificare e migliorare le strategie di disinfezione o di trattamento per la prevenzione e la cura delle infezioni associate all'uso di questi dispositivi.

L'obiettivo generale del progetto consiste nell'identificare i microrganismi (batteri o miceti) più frequentemente coinvolti nella formazione di biofilm a livello di dispositivi medici per la nutrizione enterale/parenterale. Particolare attenzione è dedicata all'iden-



tificazione di forme vitali non coltivabili dei batteri *Stafilococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*, che sono le specie maggiormente responsabili di infezioni associate all'uso di questi dispositivi medici.

Un ulteriore obiettivo consiste nell'identificazione dei ceppi resistenti ai dispositivi disinfettanti comunemente utilizzati ed alle terapie antibiotiche convenzionali.

Al tale scopo vengono studiati i dispositivi rimossi da pazienti febbrili e positivi e negativi all'esame colturale. In una fase preliminare i campioni saranno esaminati mediante microscopia elettronica a scansione. Quelli positivi per la presenza di microrganismi sono ulteriormente analizzati con diverse tecniche miranti alla dimostrazione della presenza e della vitalità di forme batteriche. Gli stessi isolati sono poi esaminati per la presenza e l'espressione di fattori di virulenza e di antibiotico resistenza.

I risultati ottenuti potranno offrire un notevole contributo alla generazione di una mappa dei ceppi batterici/fungini più frequentemente associati all'uso di dispositivi medici per alimentazione parenterale/enterale, alla loro capacità di dar luogo alla formazione di biofilm complessi e alla presenza di specifici fattori di virulenza e/o resistenza alle comuni strategie di disinfezione e terapia.

Le attività sono articolate su tre fasi principali:

- definizione delle caratteristiche dei pazienti da arruolare nello studio;
- analisi dei CVC rimossi dai pazienti;
- valutazione dello sviluppo di possibili biofilm batterici e/o misti.

Si è completata la prima fase ed è in corso lo svolgimento della seconda. Nella prima fase si è proceduto alla definizione delle principali caratteristiche che devono avere i pazienti per essere arruolati nello studio, ad esempio: ugual numero di maschi e femmine, in stato febbrile e non, con somministrazione di terapia antibiotica e non.

Nella seconda fase si sta procedendo ad analizzare con diverse tecniche di isolamento e di caratterizzazione biochimica i dispositivi rimossi dai pazienti.

Particolare attenzione è dedicata all'identificazione molecolare dei microrganismi selezionati e all'analisi dell'eventuale resistenza nei confronti dei farmaci antimicrobici somministrati al paziente.

Si stanno completando le attività propedeutiche per l'avvio della terza fase dello studio.

## COMITATO ETICO E CLINICAL TRIAL CENTER

Nel corso del 2013 sono attivi i seguenti studi:

### **Trials clinici sponsorizzati:**

- 110390 (ZOSTER-006). Studio clinico di fase III, randomizzato, con osservatore in cieco, controllato con placebo, multicentrico, per valutare l'efficacia profilattica, la sicurezza e l'immunogenicità del vaccino gE/AS01B di GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals, somministrato per via intramuscolare con schedula a 0 e 2 mesi a soggetti adulti di 50 anni di età ed oltre
- 113077 (ZOSTER-022). Studio clinico di fase III, randomizzato, con osservatore in cieco, controllato con placebo, multicentrico, per valutare l'efficacia profilattica, la sicurezza e l'immunogenicità del vaccino gE/AS01B di GlaxoSmithKline (GSK) Biologicals, somministrato per via intramuscolare con schedula a 0 e 2 mesi a soggetti adulti di 70 anni di età ed oltre
- 15338A Studio FORTE II. Studio non interventistico, prospettico, longitudinale per valutare l'impatto di una terapia di nuova introduzione sulla fatica in pazienti con Malattia di Parkinson in Italia-Studio FORTE II
- A7231030 SUCRE. Studio sull'utilizzazione della Cabergolina per l'aderenza ad attività che riducono il rischio
- ARC207 SAVING. Le implicazioni del sotto o non ottimale trattamento della BPCO nella fase di stabilità clinica
- BAY94-8862/14564. Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, double-dummy, per valutare la sicurezza e l'efficacia di BAY 94-8862 rispetto all'eplerenone in soggetti giunti d'urgenza in ospedale a causa del peggioramento dell'insufficienza cardiaca cronica con disfunzione sistolica del ventricolo sinistro, con diabete mellito di tipo 2 con o senza nefropatia cronica o con sola nefropatia cronica moderata.
- BI 205.452. Studio multicentrico, randomizzato in doppio cieco, doppio fittizio, a gruppi paralleli, verso controllo attivo, volto a valutare l'efficacia e la sicurezza di Tiotropio ai dosaggi 2.5 o 5 microgrammi, in soluzione inalatoria, somministrato con dispositivo Respimat in confronto a Tiotropio al dosaggio 18 microgrammi, in capsule per inalazione, somministrato con dispositivo HandiHaler
- BIA-91067-301. Efficacia e sicurezza di BIA 9-1067 nella malattia di Parkinson idiopatica con fenomeni di "wearing-off" trattati con Levo-Dopa e un inibitore di Dopa-Decarboxilase (DDCI): studio in doppio cieco, randomizzato, controllato col placebo e col farmaco di controllo, a gruppi paralleli, multicentrico
- BUC-SI-11-001. Studio clinico sull'efficacia e la tollerabilità di un immunostimolante a base di batteri inattivati (BUCCALIN®) nella profilassi degli episodi infettivi delle vie aeree (rinotracheobronchiti, malattie da raffreddamento). Studio in doppio cieco vs placebo, randomizzato, multicentrico.
- CAFQ056A2217. Studio in aperto per la valutazione della sicurezza, della tollerabilità e dell'efficacia di AFQ056 in pazienti con malattia di Parkinson con discinesie indotte dalla L-dopa
- CAFQ056A2223. Studio multicentrico, in doppio cieco, controllato verso placebo, a dose fissa, della durata di 13 settimane per valutare l'efficacia e la sicurezza di AFQ056 a rilascio modificato nella riduzione delle discinesie di grado da moderato a severo indotte da L-dopa in pazienti affetti da malattia di Parkinson
- CAFQ056A2299. Studio in aperto per valutare la sicurezza, la tollerabilità e l'efficacia

- di AFQ056 in pazienti affetti da malattia di Parkinson con discinesie indotte da L-dopa
- CL2-16257-096. Effects of oral chronic administration of ivabradine (7.5 mg bid) in comparison to placebo (bid) on top of beta-blockers, on central aortic blood pressure. Randomized, cross-over, double blind, multicentre, study over 10 weeks in patients with stable coronary artery disease and a resting heart rate equal or superior to 70 bpm, already treated with beta-blockers.
  - CL3-16257-083 SIGNIFY. Effects of ivabradine in patients with stable coronary artery disease without clinical heart failure. A randomised double-blind placebo-controlled international multicentre study.
  - CL3-16257-097. Sicurezza della somministrazione orale cronica di una formulazione a rilascio modificato di ivabradina rispetto alla formulazione a rilascio immediato di ivabradina in pazienti con cardiopatia coronarica stabile. Studio randomizzato, doppio cieco, a gruppi paralleli, multicentrico, della durata da 6 a 12 mesi
  - CLCZ696B2314. Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, con controllo attivo per valutare l'efficacia e la sicurezza di LCZ 696 in confronto a Enalapril su morbilità e mortalità in pazienti con insufficienza cardiaca cronica e ridotta frazione di eiezione
  - CQAB149B2348. Studio multicentrico di fase IIIB, randomizzato, in doppio cieco, doppio placebo, a gruppi paralleli, della durata di 52 settimane, per valutare l'efficacia di indacaterolo (150 µg o.d.) rispetto a tiotropio (18 µg o.d.) sulla funzione polmonare, sulla percentuale di riacutizzazioni e sui relativi outcomes in pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)
  - CVT-301-003. Studio di fase 2b, randomizzato, in doppio cieco, controllato verso placebo volto a valutare la sicurezza e l'efficacia di CVT-301 a inalazione (polvere per inalazione Levodopa) in pazienti affetti da morbo di Parkinson con fluttuazioni della risposta motoria (fenomeni OFF).
  - I.S.P.I.C.A. INDAGINE SICOA ISPICA: Indagine Sicoa Paziente con Cardiopatia Ischemica e Angina
  - LSH-10-001. Studio randomizzato, con controllo, per la valutazione della sicurezza e degli effetti cardiovascolari di Algisyl-LVR come metodo di contenimento della dilatazione ventricolare sinistra nei pazienti affetti da cardiomiopatia dilatativa (AUGMENT-HF)
  - P05664. Studio di fase III, in doppio-cieco, controllato con farmaco attivo e con placebo, di definizione della dose sull'efficacia e la sicurezza di preladenant in soggetti affetti da malattia di Parkinson iniziale (A Phase 3, Double-Blind, Placebo- and Active-Controlled Dose-Range-Finding Efficacy and Safety Study of Preladenant in Subjects with Early Parkinson's Disease)
  - P06153. Studio di fase III, di estensione, in doppio-cieco, double dummy, controllato con farmaco attivo e della durata di 40 settimane di preladenant in soggetti affetti da malattia di Parkinson di grado da moderato a grave (Fase III, n. di protocollo P06153)
  - PIRRI/CT/001. (Aiace) Somministrazione sublinguale di un lisato batterico polivalente (PMBL) in pazienti con broncopneumopatia cronica ostruttiva moderata, grave o molto grave, come definita dalla classificazione GOLD: uno studio controllato di fase IV in doppio cieco, randomizzato, multicentrico internazionale.
  - RTG113413. Studio Multicentrico, in aperto, a lungo termine, sulla sicurezza e tollerabilità di retigabina a rilascio immediato in pazienti adulti con crisi epilettiche parziali (estensione dello studio RGB113905)
  - SKP-021-01-11. Studio clinico in doppio cieco, randomizzato, a gruppi paralleli, con farmaco di controllo, multicentrico per valutare la non-inferiorità terapeutica del cerot-

to SKP-021 a base di ketoprofene 0,3% verso un cerotto a base di diclofenac-sodio in pazienti con condizione dolorosa ed infiammatoria (ad esempio: mal di schiena, livido, contusione, distorsione, stiramento)

- SP0990. Studio prospettico, non interventistico sulla prevalenza Incidenza dei disturbi del Controllo degli impulsi e l'Associazione di sintomi neuropsichiatrici, processi cognitivi e qualità della vita nel Morbo di Parkinson - ICARUS-

- TVP-1012/501 (ADAGIO Follow Up). Studio multicentrico, in aperto, di follow-up, per valutare gli effetti del trattamento a lungo termine con Azilect in soggetti affetti da malattia di Parkinson che abbiano partecipato allo studio ADAGIO

### **Sperimentazioni cliniche spontanee:**

- Saggio del micronucleo in cellule esfoliate della mucosa boccale per misurare il danno al DNA e predire lo sviluppo di tumori in soggetti sani

- Structured exercise training as countermeasure to space flight-induced orthostatic intolerance

- Efficacia del sistema vaküm in pazienti adulti affetti da patologie respiratorie croniche ostruttive ed ipersecrezione bronchiale

- La presa in carico delle persone con ictus cerebrale: implementazione dei percorsi di cura integrati e degli strumenti di gestione

- Genomic instability in the elderly as a marker of frailty. (Instabilità genetica come marcatore di fragilità negli anziani)

- L'Ottimismo facilita il miglioramento della persona con Parkinson in riabilitazione?

- Caratterizzazione fenotipica e sequenziamento genomico nella psicosi schizofrenica

- La riabilitazione con una stimolazione audio-video a 10 Hz modula i ritmi cerebrali e migliora le prestazioni cognitive e motorie in pazienti neurologici? Verso un'applicazione clinica basata sull'utilizzo di Internet a casa da parte dei pazienti

- Ricerca dei tratti personalità correlabili al complesso psico-fisiologico nella malattia di Parkinson e loro influenza nei processi di recupero

- ARC213. Studio Osservazionale sull'appropriatezza Terapeutica dei pazienti con BPCO Moderata (Studio OPTIMO)

- AVIRR-PD. Fattori predittivi nello sviluppo della Malattia di Parkinson: analisi della variabilità dell'intervallo cardiaco R-R in familiari di pazienti affetti

- BIOMARKERS OF ASBESTOS EXPOSURE. Valutazione di biomarker di instabilità genetica, danno ossidativo e lesioni precoci in sangue, cellule esfoliate dalla mucosa boccale ed esalato bronchiale di lavoratori a rischio-amianto

- Database geriatrico. Database Geriatrico per lo Studio dell'Utilizzo della Valutazione Multidimensionale in una popolazione anziana ospitata in regime di Residenza Sanitaria Assistenziale (RSA) nella Regione Lazio.

- DEEP TMS PARK. Utilizzo della "Deep TMS" per il trattamento e la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da paralisi sopranucleare progressiva

- FARIF-PD. Studio caso-controllo sui fattori di rischio familiari e diagnosi precoce della malattia di Parkinson

- GONDOLA PILOTA. Studio pilota cross-over sull'utilizzo della "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da Paralisi Sopranucleare Progressiva

- GONDOPARK. Studio multicentrico, doppio cieco randomizzato per gruppi paralleli sull'utilizzo della "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson

- GR-2009-1560319 InteSo. Le basi neurali dell'intelligenza sociale: studio su lesioni in

pazienti con ictus cerebrale

- ISMAR. Indagine SICOA AIMAR sulla epidemiologia ospedaliera e sulla gestione clinica delle comorbilità respiratorie e cardiache in pazienti ospedalizzati in unità cardiologiche e pneumologi che
- OCK2. Studio clinico sulla somministrazione di Eparina sodica non frazionata nebulizzata in pazienti con BPCO
- Progetto Cadute Studio multicentrico osservazionale di coorte sulla frequenza ed i fattori predittivi di caduta nei pazienti con Malattia di Parkinson
- PRO-LIVER. Registro nazionale di pazienti con cirrosi epatica per la stima della prevalenza della trombosi venosa portale
- RBNE08LN4P. Approccio integrato clinico e sperimentale allo studio dell'invecchiamento cerebrale e delle malattie neurodegenerative: basi molecolari, epidemiologia genetica, neuroimaging multimodale e farmaco genetica
- RC 10/0804. Valutazione prospettica di parametri innovativi di rischio cardiovascolare in pazienti con aumentato rischio cardiovascolare
- REG.I.RE. STUDIO OSSERVAZIONALE TRASVERSALE DI RICERCA DENOMINATO "REGISTRO EPIDEMIOLOGICO" REG.I.RE-", Studio Osservazionale trasversale per la valutazione dei dati epidemiologici di prevalenza ed incidenza dell'insufficienza respiratoria finalizzati alla corretta programmazione sanitaria ed all'ottimizzazione dell'impiego delle risorse economiche per il trattamento della malattia
- Registro TOSCA. Studio Osservazionale Multicentrico sulla prevalenza ed il significato prognostico dei difetti ormono-metabolici nei Pazienti con insufficienza cardiaca cronica
- REVIS. Restoration of Vision after Stroke
- RF-2009-1528677. Stimolazione transcranica per indurre il sonno: Efficacia delle tecniche tDCS e TMS
- RF-2009-1546787. Adattamento del ventricolo destro nell'ipertensione arteriosa polmonare: iterazione tra forma e danno miocardico
- ROBOPARK. Utilizzo di un robot per la riabilitazione del cammino in soggetti affetti da malattia di Parkinson
- ROBOSTROKE. Utilizzo di un robot per la riabilitazione del cammino in soggetti affetti da Stroke
- San Raffaele Respiratory Diseases Platform. Applicazione di un approccio di Systems Medicine alla valutazione degli effetti della riabilitazione respiratoria in pazienti affetti da insufficienza respiratoria: implementazione di una piattaforma integrata di dati clinici, epidemiologici e biologici
- SCRIPT\_mec\_ORTHO. "Feasibility of Supervised Care & Rehabilitation Involving Personal Tele-Robotics for arm/hand function of chronic stroke patients" "SCRIPT: Supervised Care and Rehabilitation Involving Personal Tele-robotics"
- SICA HF Studio di valutazione delle co-morbidity che determinano un peggioramento dello scompenso cardiaco.
- SR-NCDs. Applicazione di un approccio di Systems Medicine alla valutazione degli effetti della riabilitazione respiratoria in pazienti affetti da insufficienza respiratoria: implementazione di una piattaforma integrata di dati clinici, epidemiologici e biologici.
- Richiesta di parere per l'attivazione delle sedi decentrate di raccolta e/o processazione dei campioni della BioBanca, ridefinita come BioBIM ovvero BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare.
- Valutazione pre-clinica dell'espressione di ERCC1, BRCA1 e MMR1 in pazienti affetti da tumore del polmone non a piccole cellule per migliorare la risposta alla chemioterapia di I Linea.

- Valutazione e trattamento finalizzato al reinserimento lavorativo del disabile neurologico in età lavorativa in fase post acuta.
- Utilizzo di un robot per la riabilitazione dell'arto superiore di pazienti con danno neurologico in fase sub-acuta.

## CONVENZIONI E COLLABORAZIONI ISTITUZIONALI

### **Scuole di Specializzazione e Tirocini:**

Sono attive le seguenti Scuole di Specializzazione:

Università degli Studi di Roma "La Sapienza"

- Scuola di Specializzazione in Medicina Fisica e Riabilitazione
- Scuola di Specializzazione in Psicologia della Salute
- Tirocinio terapisti occupazionali

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

- Scuola di Specializzazione in Medicina Fisica e Riabilitazione
- Scuola di Specializzazione in Geriatria
- Convenzione per il tirocinio pratico per gli studenti che frequentano il Corso di Laurea Magistrale Biotecnologie Industriali della Facoltà di scienze MM FF NN della Scuola Istruzione a Distanza-IaD al fine di completare il percorso formativo accademico dei tirocinanti e di agevolarne la scelta professionale

Università Campus Biomedico

- Scuola di Specializzazione in Neurologia
- Scuola di Specializzazione in Radiodiagnostica

Università LUMSA

- Master in Neuropsicologia

Libera Università degli Studi di Scienza Umane e Tecnologiche (LUDES)

- Tirocinio di Formazione per i Fisioterapisti

Seconda Università degli Studi di Napoli

- Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare
- Facoltà di Psicologia

Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo"

- Centro Interuniversitario IRIDE, per lo svolgimento di Tirocinio in Psicologia Clinica.

Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

- Facoltà di Scienze della Formazione

Università di Salerno

- Tirocinio di formazione e orientamento con il Dipartimento di Farmacia

Altri Istituti

- Istituto Walden Associazione Italiana di Psicologia e Terapia Cognitivo Comportamentale
- Scuola Internazionale di Ricerca e Formazione in Psicologia Clinica e Psicoterapia Psicoanalitica - S.I.R.P.I.D.I.
- Centro Italiano di Psicologia Analitica - C.I.P.A

- Scuola di Psicoterapia Strategica Integrata Seraphicum (SCUPSIS)
- Istituto di Terapia Relazionale Integrata (ITRI)
  
- Centro Studi Martha Harris (Psicoterapia Psicoanalitica, Modello Tavistock)
- Istituto Italiano Psicoterapia Relazionale (I.I.P.R.)
- Scuola Italiana di Ipnosi e Psicoterapia Ericksoniana (S.I.I.P.E.)
- Scuola di Analisi Transazionale (SIFP)
- Scuola Superiore di Specializzazione in Psicologia Clinica - SSSPC Università Pontificia Salesiana
- Engim San Paolo

### **Collaborazioni nazionali**

Istituto Superiore di Sanità – Collaborazione Scientifica per Progetti di ricerca nell'ambito di:

- riabilitazione
- patologie cardiovascolari
- malattie respiratorie
- neuroscienze
- malattie infettive
- tabagismo
- neoplasie
- medicina di genere.

Università degli Studi di Roma "La Sapienza":

- I Facoltà di Medicina e Chirurgia
- Dipartimento di Neurologia e Psichiatria per una collaborazione scientifica nell'ambito del trattamento del dolore acuto e cronico.

Università degli Studi di Roma "Tor Vergata":

- Dipartimento di Medicina Interna nei settori della:
  - o Cardiologia, con particolare riguardo alla diagnosi e cura dell'ipertensione arteriosa e allo studio del valore predittivo e diagnostico dei marker di funzione cardiovascolare
  - o Diagnosi e terapia delle dislipedemie
  - o Prevenzione, primaria e secondaria, e cura della malattia aterosclerotica mediante la gestione informatizzata dei pazienti sul territorio
  - o Diabetologia, endocrinologia, andrologia
  - o Biochimica clinica
  - o Medicina interna, oncologia
  - o Attuazione di strategie innovative in ricerca traslazionale nel campo della broncopneumopatia cronica ostruttiva
  - o Ricerca specifica sul tema degli effetti metabolici ed autonomici del training fisico in pazienti cardiopatici anziani e con ridotta tolleranza allo sforzo.
- Dipartimento di Biologia, Accordo di collaborazione scientifica sui meccanismi molecolari dell'invecchiamento.
- Dipartimento di Neuroscienze.



Politecnico di Milano

- Dipartimento di Bioingegneria, Collaborazione nel settore della valutazione funzionale e della riabilitazione motoria. Sviluppo dell'attività clinica e di ricerca dei laboratori di analisi della postura e del movimento.

Università Magna Graecia di Catanzaro

- Attivazione progetti di ricerca nei seguenti campi: Area farmacologia di base, molecolare e clinica; area tossicologia; area chimica farmaceutica

## **Fondazioni**

Fondazione FORST in ambito di riabilitazione termale

Fondazione Veronesi Micronucleus frequency in exfoliated buccal cells as a biomarker of DNA aging and risk for age-related diseases

## **Collaborazioni internazionali**

Imperial College of Science, Technology and Medicine, Londra, UK - Laboratorio di Fisiologia Vascolare comune e progetti di ricerca sugli effetti cardiovascolari degli ormoni.

Molecular Cardiovascular Research Institute-Tufts Medical Center, Boston, USA - Collaborazione per ricerca cardiovascolare

Applied Cachexia Research, Charite Universitätsmedizin, Campus Virchow-Klinikum, Berlin-Germany - Collaborazione per ricerca cardiovascolare

Instrumentation Laboratories, Delaware, USA - Clinical Evaluation Program Agreement

Neogenix Oncology Inc, Rockville Maryland, USA - Accordo di collaborazione ricerca

University of Oxford - Accordo per la conduzione delle attività scientifiche per lo sviluppo di laboratori per studi di genomica funzionale di BPCO in area predittiva, preventiva e personalizzata delle pratiche mediche e riabilitative.

Diabetes Research Institute, University of MIAMI - Accordo di collaborazione scientifica per la ricerca e cura del diabete

Plant Product and Human Nutrition Group, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow

Institute for Molecular and Translational Therapeutic Strategies (IMTTS), Hannover Medical School, Germany

University of Barcellona, Cooperation in collaborative research in the field of home care assistance and services (through tele-assistance and tele-rehabilitation) and systems

biology of COPD.

MI&EUR BV Agreement Study on Utilization of Cabergoline for compliance with risk minimization Activities

Merck KGaA Agreement PD-L1 expression in human lung, gastric, and breast cancer tissue.

## SERVIZI BIBLIOTECARI

La biblioteca, specializzata in ambito biomedico ed economico-sanitario, collabora attivamente con tutte le biblioteche dello stesso ambito disciplinare sul territorio nazionale. Partecipa all'Organizzazione delle biblioteche scientifiche promossa e finanziata dal Ministero della Salute (Bibliosan), al Catalogo Nazionale dei Periodici (ACNP) e al sistema per lo scambio di documenti (NILDE) e al Gruppo Italiano Documentalisti dell'Industria Farmaceutica e degli Istituti di Ricerca Biomedica (Gidif-Rbm). Rappresenta l'Istituto ed il gruppo Bibliosan all'interno di gruppi di lavoro di ambito biblioteconomico.

I servizi bibliotecari si concretizzano nella consulenza bibliografica, presentazione e guida all'uso di cataloghi, banche-dati, riviste elettroniche, internet; reperimento di documenti non presenti in biblioteca; consultazione e possibilità di riproduzione del materiale cartaceo e elettronico presente (manuali, dizionari, periodici etc) nonché visione, lettura e riproduzione della produzione scientifica dell'Istituto dal 1999 ad oggi.

A disposizione degli utenti si trovano anche i seguenti strumenti, materiali e risorse:

- banche dati: PubMed + LinkSource, Cinahl, Journal Citation Reports, Web of Science, Scopus, Banche Dati EBSCO, BMJ BestPractice, Cochrane Library, ProQolid, Biology Image Library (BioMedCentral), Faculty of 1000, OECD;
- più di 7.000 periodici scientifici di editori quali Elsevier ScienceDirect, Wiley, Nature, Springer ma anche New England Journal of Medicine, Stroke, Blood, Science e i più importanti periodici italiani d'ambito medico-sanitario: Assistenza Infermieristica e Ricerca, Educazione Sanitaria & Promozione della Salute, Sole 24 Ore Sanità, Mecosan, Medicina e Morale, Organizzazione Sanitaria, Panorama della Sanità, Psicoterapia cognitiva e comportamentale, Sanità Pubblica e Privata, Tecnica Ospedaliera etc.
- tutti gli anni di periodici cartacei correnti e/o interrotti sono esposti a scaffale aperto e liberamente consultabili unitamente ad enciclopedie, dizionari;
- strumenti per la gestione delle bibliografie (RefWorks);
- oltre 1.000 testi di ambito clinico, sanitario e scientifico.

La biblioteca si occupa anche dell'organizzazione di corsi volti all'approfondimento e alla formazione all'uso delle risorse disponibili.

Le risorse sono accessibili a distanza, dall'interno dei computer della rete aziendale e da remoto.

Sul portale istituzionale, [www.sanraffaele.it](http://www.sanraffaele.it), è presente una area dedicata ai servizi e alle risorse della biblioteca: <http://www.sanraffaele.it/contenuti/37/biblioteca>.

## SCUOLE UNIVERSITARIE

Nell'Anno Accademico 2013/2014 in collaborazione con l'Università degli studi di Roma "Sapienza, vi sono i seguenti corsi:

### **Corso di Laurea in Scienze Infermieristiche**

Presidente Prof. Elisa Petrangeli

Vicepresidente Luca Poli

N° di studenti I anno: 74

N° di studenti II anno: 70

N° di studenti III anno: 37

### **Corso di Laurea in Fisioterapia**

Presidente: Vittorio Di Piero

Vice Presidente: Prof. Giuseppe Bruno

N° di studenti I anno: 12

N° di studenti II anno: 10

N° di studenti III anno: 10

## **Università Telematica San Raffaele Roma**

L'Università Telematica San Raffaele Roma, istituita con decreto del Ministro dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca dell'8 maggio 2006, è un Ateneo non statale, legalmente riconosciuto, che rilascia titoli di studio con valore legale in Italia e nell'Unione Europea. L'offerta didattica è erogata in modalità e-learning, attraverso l'utilizzo di internet e delle nuove tecnologie digitali. Gli studenti possono pertanto accedere alla piattaforma didattica in qualsiasi momento ed in qualsiasi luogo; anche coloro che per ragioni fisiche, geografiche o lavorative ne sarebbero esclusi. La lezione ex cathedra viene in sostanza sostituita da lezioni registrate e disponibili on line 24 ore su 24 e integrata con specifico materiale didattico: slide, materiale illustrativo, problemi e discussioni in linea. Le lezioni online sono integrate da attività seminariali e di laboratorio. Le prove finali relative ad ogni insegnamento sono da sostenersi in modalità frontale. Il corpo accademico, altamente qualificato, è composto da docenti ed esperti di chiara fama nazionale e internazionale, garantendo un alto livello qualitativo dell'insegnamento. L'efficacia del percorso didattico è garantita dalla presenza di tutor, figure adeguatamente formate per assicurare il proprio sostegno e supporto dal punto di vista della didattica, del metodo di studio, della tecnologia, dell'orientamento universitario e professionale e della spinta motivazionale. Grazie agli strumenti telematici i docenti e i tutor sono a disposizione degli studenti in qualsiasi momento per rispondere a domande e fornire chiarimenti. I corsi di laurea dell'Università Telematica San Raffaele Roma sono legati ai settori in cui il primato dell'industria italiana è testimoniato dall'alto livello qualitativo raggiunto dal "Made in Italy" ed è riconosciuto a livello internazionale: il design e la moda, l'alimentazione, lo sport. Il rapporto vitale con i settori industriali e sportivi di riferimento garantisce agli studenti una relazione proficua con il mondo produttivo e il mercato del lavoro anche attraverso la possibilità di accedere a stage profes-

sionalizzanti nelle realtà più qualificate. Esperti e professionisti del mondo dell'industria e dello sport assicurano un percorso di studio che valorizza l'apprendimento teorico e la formazione pratica.

L'offerta didattica dell'Università Telematica San Raffaele Roma, si articola in tre Facoltà per altrettanti corsi di laurea. In particolare:

1. **Facoltà di Scienze Motorie - Scienze delle attività motorie e sportive.** Il corso ha l'obiettivo di fornire competenze specifiche relative alla comprensione, alla conduzione e alla gestione di attività motorie a carattere educativo, adattativo, ludico o sportivo, finalizzandole allo sviluppo, al mantenimento e al recupero delle capacità motorie e del benessere psicofisico a esse correlato. I settori scientifici attivati all'interno della laurea di primo livello tendono a dare una preparazione bilanciata dei tre aspetti professionali preminenti: educativo e rieducativo, sportivo e organizzativo-gestionale.
2. **Facoltà di Agraria - Scienze dell'Alimentazione e della Gastronomia.** Il corso si propone di formare una nuova figura professionale in grado di gestire tutti gli aspetti che riguardano la produzione ed il consumo del cibo, da quelli igienico-sanitari a quelli giornalistici e culturali; una figura poliedrica che sappia coniugare le conoscenze tecniche e scientifiche con quelle umanistiche, economiche e giuridiche; un professionista in grado di affrontare con competenza e creatività le sfide del settore alimentare del XXI secolo.
3. **Facoltà di Architettura e design industriale - Moda e design industriale.** Il corso triennale è progettato per la fruizione in e-learning e concepito sulle esigenze del Sistema Moda/Design per rispondere alle nuove competenze, richieste dal mercato di domani, nei ruoli progettuali e di management creativo. L'offerta formativa post lauream, invece, si articola attualmente in Master di primo e secondo livello e Corsi di Perfezionamento.

La sede legale dell'Ateneo è sita a Roma, in Via val Cannuta, 247, all'interno del complesso della San Raffaele SpA, società che detiene la maggioranza delle quote dell'ente promotore dell'Università. Gli spazi complessivamente disponibili hanno una superficie totale di circa 1.800 metri quadrati divisi tra spazi per la didattica per gli studenti, per i laboratori e per la ricerca e per gli uffici amministrativi. La sede periferica di Milano, seconda sede d'esami dell'Ateneo, è sita in Via Francesco Daverio, 7 e dispone di aule, laboratori ed uffici amministrativi. Inoltre, a breve si prevede l'istituzione di un Polo didattico nella città di Catania.

L'infrastruttura telematica ad uso degli studenti e del personale di Ateneo, si articola in quattro strumenti principali: le piattaforme didattiche, la segreteria didattica on-line, il servizio di posta elettronica e il sito internet d'Ateneo.

La piattaforma utilizzata per la quasi totalità delle attività didattiche di Unisanraffaele è una personalizzazione di Moodle (Modular Object-Oriented Dynamic Learning Environment, vedasi il sito ufficiale [www.moodle.org](http://www.moodle.org)), un sistema in grado di recepire contenuti didattici che prevede il tracciamento delle attività per garantire il rispetto di quanto prescritto dalla normativa universitaria in merito all'obbligo della frequenza. Le principali tipologie di contenuto didattico utilizzate dall'Università sono: (a) le videolezioni, nella forma di lezioni frontali in cui è presente sia l'immagine del docente che la presentazione PowerPoint. Il video della lezione è sincronizzato con le diapositive le quali sono titolate e permettono di spostarsi da un punto all'altro della lezione; (b) le audio-lezioni nella forma di slide commentate da audio (rapid learning). In questo caso il docente dovrà inviare l'audio all'Università, la quale si occuperà di sincronizzare l'audio alle diapositive. Le tracce audio registrate dovranno essere una per ogni slide della

presentazione. Al termine di una lezione costituita da 20 diapositive il docente dovrà produrre 20 piccole tracce audio autonome; (c) materiale testuale, file e directory: i docenti possono pubblicare file di diverso formato, singolarmente oppure organizzati in cartelle; (d) link – possono essere utilizzati link a siti o video di particolare interesse, sia interni che esterni alla piattaforma.

Le principali metodologie di comunicazione con gli studenti sono: (a) il forum di discussione - consente lo scambio di messaggi tra tutti gli utenti del corso o all'interno di opportuni sottogruppi; (b) i quiz - che consentono l'utilizzo di domande di diverso tipo (risposta chiusa, risposta aperta, di tipo numerico, a corrispondenza); (c) il glossario - consente di archiviare informazioni in modo strutturato: si può quindi utilizzare sia come glossario vero e proprio, sia come ambiente in cui inserire contributi. E' possibile assegnare valutazioni e commenti ai "termini" inseriti e creare alcuni link in modo automatico all'interno del corso; (d) il compito - tramite il compito è possibile predisporre un'area in cui lo studente può inviare documenti al docente (eventualmente vincolato da scadenze). I docenti possono essere avvisati via e-mail dell'avvenuta consegna e far avere allo studente una valutazione e commenti sul lavoro consegnato; (e) la chat - consente uno scambio sincrono di messaggi. Le chat possono essere lasciate sempre aperte, ad uso degli studenti, oppure aperte e chiuse a discrezione dei docenti. Ad esempio è possibile utilizzare la chat per il ricevimento studenti, oppure per una lezione on-line in cui ognuno porta i suoi contributi. E' possibile salvare le sessioni passate della chat in modo da rivederle in momenti successivi.

La Segreteria Didattica on-line ha il compito di fornire sia le funzionalità rivolte all'amministrazione universitaria (segreteria studenti) per la gestione del percorso dello studente dall'immatricolazione al conseguimento del titolo sia i servizi web a valore aggiunto rivolti al singolo studente.

L'attività scientifica e di ricerca dell'Ateneo comprende i seguenti prodotti della ricerca:

- a) Pubblicazioni Scientifiche (Nazionali/Internazionali): pubblicazioni a carattere scientifico che abbiano: rilevanza accademica (a livello nazionale o internazionale) e diffusione nella comunità scientifica; ISBN/ISSN; carattere di scientificità: il carattere di scientificità è assicurato dal contenuto accademico della rivista e dal processo di selezione e revisione degli articoli, nonché dall'esistenza di un comitato editoriale e scientifico; Impact Factor; ISI, etc. Per pubblicazioni scientifiche si intendono anche: riviste accademiche stampate e online; annali universitari; capitoli in libri/report di ricerca; monografie e curatele internazionali e nazionali con processo di referaggio e editorial board; atti di convegni internazionali/nazionali che abbiano nel loro comitato organizzativo uno scientific board e che abbiano provveduto ad un referaggio double e blind prima dell'accettazione del contributo. Pubblicazioni Divulgative (Nazionali/Internazionali).
- b) Tutte le pubblicazioni non accademiche con ISBN/ISSN, che si rivolgono ad un pubblico più eterogeneo rispetto a quello accademico.
- c) Convegni Scientifici: convegni organizzati da una comunità scientifica di riferimento o da enti/istituzioni/associazione di professionisti, nonché network universitari e associazioni accademiche che abbiano ad oggetto tematiche scientifiche e la cui discussione avvenga tramite presentazioni di paper (su invito o submission), nonché esposizione di poster paper o relazioni su invito. La scientificità è assicurata da un meccanismo di double blind review stabilito dal comitato organizzatore del convegno. I paper presentati sono pubblicati integralmente o in parte (abstract) nei conference proceedings o atti dei convegni, che possono avere ISBN/ISSN nonché possedere Impact Factor.

- d) Partecipazioni a Convegni: si intende la partecipazione in qualità di relatore e/o di redattore del contributo a convegni nazionali o internazionali organizzati all'interno del proprio ambito scientifico di riferimento, nonché da associazioni di categoria o ordini professionali. Lo scopo di tali convegni è l'aggiornamento continuo e la partecipazione del ricercatore per permettere, attraverso una condivisione del proprio know how, il miglioramento delle conoscenze globali in relazione a determinati ambiti di riferimento.
- e) Convegni/Seminari/Corsi: Si indica con questa dicitura l'insieme di attività a cui il ricercatore partecipa in qualità di partecipante, ai fini di un aggiornamento professionale/scientifico per il miglioramento della propria attività di ricerca/didattica attinente all'Ateneo. In particolare, ci si riferisce a:
- seminari generici su tematiche di ricerca (con attestato di frequenza)
  - corsi di approfondimento (con attestato di frequenza)
  - scuole di metodologia della ricerca
  - summer school
  - intensive course
- f) Partecipazione a varie attività nel campo della ricerca
- In particolare ci si riferisce a:
- Partecipazione a editorial board di riviste nazionali/internazionali;
  - Partecipazioni a scientific board nell'ambito di book series promosse da editori internazionali e per prodotti editoriali;
  - Attività di coordinamento nell'ambito di special issues di riviste o book series;
  - Attività di referaggio per riviste accademiche e/o per convegni scientifici.

## ATTIVITÀ DI FORMAZIONE

### CORSI

Nel 2013 il Provider San Raffaele ha organizzato ed è stato sede di 37 corsi ECM che hanno visto coinvolto il network San Raffaele, per un totale di 484 crediti circa.

DATA	TITOLO	LUOGO	N. DI CREDITI ECM
Gennaio 22	Aggiornamento su percorsi diagnostici e metodologie innovative relative alle attività di laboratorio tradizionale e ad alta specializzazione	IRCCS San Raffaele Pisana	37.5
Febbraio 18	Strategie d'intervento per la psicoeducazione e l'addestramento del caregiver del paziente in cure palliative	San Raffaele Rocca di Papa	23
Febbraio 23	Teoria, refertazione e applicazioni pratiche su apparecchiatura rm 1,5 t siemens aera, trattografia, perfusione, cardio rm, spettroscopia, angio rm	IRCCS San Raffaele Pisana	50
Febbraio 28	Nuove strategie riabilitative e sistemi di valutazione nella malattia di parkinson e nei parkinsonismi atipici	IRCCS San Raffaele Pisana	6
Marzo 2	Patologie cardiologiche di più frequente riscontro nel reparto di medicina post-acuzie	San Raffaele Rocca di Papa	46.8
Marzo 5	Demenza e disabilita' intellettiva: possibili parallelismi	San Raffaele Villa Buon Respiro	4
Marzo 6	Aggiornamento in patologie cardiovascolari	San Raffaele Montecompatri	29
Marzo 7	L'alimentazione in rsa: stato di salute e qualità della vita	San Raffaele Montecompatri	10.1
Marzo 8	Intervento riabilitativo del paziente con storia di tentato suicidio ricoverato in lungodegenza	San Raffaele Rocca di Papa	12.1
Marzo 9	Il edizione - Patologie cardiologiche di più frequente riscontro nel reparto di medicina post-acuzie	San Raffaele Rocca di Papa	46.8
Marzo 14	Il edizione - Strategie d'intervento per la psicoeducazione e l'addestramento del caregiver del paziente in cure palliative	San Raffaele Cassino	23
Marzo 19	Dalla risonanza alla videourodinamica, una continua evoluzione di processi, tecniche e gestione dei rischi in diagnostica per immagini	San Raffaele Sulmona	6
Marzo 22	Il dolore in età geriatrica: riconoscerlo per curarlo	RSA Modugno	6
Marzo 23	Organizzazione dell'emergenza in reparto	San Raffaele Cassino	7.3
Marzo 26	Il progetto riabilitativo individuale (p.r.i.) nella riabilitazione intensiva: integrazione funzionale degli interventi medici, psicologici e sociali	San Raffaele Cassino	8.5



Aprile 2	Cura e gestione del paziente disfagico: diagnosi, presa in carico e riabilitazione	IRCCS San Raffaele Pisana	6.3
Aprile 11	Individuare gli obiettivi in riabilitazione: casi clinici e pragmatismo quotidiano	IRCCS San Raffaele Pisana	8
Aprile 12	Imaging rm cardio-vascolare nella pratica clinica	IRCCS San Raffaele Pisana	5.8
Aprile 22	Gli ausili, la riabilitazione alla "normalità adattata"	IRCCS San Raffaele Pisana	5
Aprile 23	La gestione delle lesioni da decubito in riabilitazione	San Raffaele Montecompatri	14
Maggio 4	Diabete tipo II e pratica clinica: questioni aperte	San Raffaele Cassino	6
Maggio 8	ICF: la classificazione internazionale del funzionamento, disabilità e salute	IRCCS San Raffaele Pisana	3.8
Maggio 17	L'intervento precoce nelle disabilità dello sviluppo: aspetti teorici ed operativi	San Raffaele SpA	7.1
Giugno 26	Tumori Cerebrali	San Raffaele SpA	6
Luglio 12	La riabilitazione geriatrica in RSA: approccio multidisciplinare alla fragilità	San Raffaele Ostuni	10.1
Settembre 12	Urgenze neuroradiologiche traumatiche e non traumatiche	San Raffaele SpA	6
Ottobre 11	Patologie infiammatorio-infettive e tossico-metaboliche	San Raffaele SpA	6
Ottobre 11	Il dolore in età geriatrica: riconoscerlo per curarlo	San Raffaele Ostuni	6
Ottobre 31	Aspetti clinici e strategie riabilitative nelle più frequenti condizioni neurologiche disabilitanti in riabilitazione di II livello codice 56	IRCCS San Raffaele Pisana	18.1
Novembre 4	La contenzione: aspetti normativi, etico-deontologici e di responsabilità professionale	San Raffaele Montecompatri	10.9
Novembre 15	La contenzione fisica e farmacologia in RSA	RSA Modugno	10
Novembre 26	Il cammino: valutazione e intervento riabilitativo mirato	IRCCS San Raffaele Pisana	7.5
Dicembre 6	Applicazione del taping neuromuscolare in riabilitazione	IRCCS San Raffaele Pisana	4.7
Dicembre 10	La presa in carico dei pazienti con ictus cerebrale: percorsi clinico-assistenziali integrati e linee guida	IRCCS San Raffaele Pisana	3.6
Dicembre 12	Patologie vertebro-midollari	San Raffaele SpA	6
Dicembre 19	Modelli ed interventi psicologici in ambito ospedaliero: informazione ed integrazione	San Raffaele Sulmona	4.5
Dicembre 30	Il dolore nel paziente con lesione del midollo spinale	San Raffaele Sulmona	2

## ATTIVITÀ ASSISTENZIALE

L'IRCCS San Raffaele Pisana dispone di 298 posti letto distribuiti, in regime di ricovero ordinario e Day Hospital nelle seguenti Unità Operative:

- Riabilitazione Neurologica
- Riabilitazione Ortopedica
- Riabilitazione Cardiologica
- Riabilitazione Respiratoria
- Riabilitazione in età evolutiva
- Medicina

Nell'Istituto vengono assicurati i seguenti servizi a supporto della clinica e della ricerca, svolgendo un'attività trasversale agli obiettivi delle differenti Unità Operative:

- Neurofisiopatologia
- Studio delle Posture e del Movimento (Gait Analysis)
- Studio della Funzionalità Cardiaca
- Studio della Funzionalità Respiratoria
- Laboratorio di Patologia Clinica e Biotecnologie Avanzate
- Robotica Riabilitativa
- Servizio di Otorinolaringoiatria con Laboratorio di Audiologia/Audiologia Infantile, Foniatria con sistema di videoendoscopia per lo studio delle prime vie aeree e Deglutologia
- Servizio di Diagnostica per Immagini
- Idrokinesiterapia
- Terapia Occupazionale
- Rieducazione Funzionale.

### DATI DI ATTIVITA'

Nel corso dell'anno 2013 il numero totale dei dimessi in regime di ricovero ordinario è stato di 4260, di cui 2819 pazienti per la Riabilitazione e 1441 pazienti per l'U.O. di Medicina (tab. n. 1).

**Tab. n. 1 - Dimessi IRCCS San Raffaele Pisana - anno 2013**

Discipline	N° Dim. regione	N° Dim. fuori regione	Totale	Degenza Media
Medicina interna	1397	44	1441	7,55
Riabilitazione	2566	253	2819	29,72
Riabilitazione DH	1440	912	2352	6,44
	5403	1209	6612	

**Nota n. 1\*:** numero medio di accessi per paziente.

### Ricoveri ordinari

Analizzando i dati per ciascuna U.O. (tab. n. 2), si osserva che la maggior parte dei ricoveri è attribuibile all'U.O. di Riabilitazione Neurologica e Ortopedica (1187 pazienti sul totale dei dimessi pari al 42,1%, di cui il 93,3% residenti nella Regione Lazio) ed all'U.O. di Riabilitazione Cardiologica (846 pazienti sul totale dei dimessi pari al 30,0%, di cui il 94,1% residenti nella Regione Lazio). Per le UU.OO. di Riabilitazione Respiratoria e di Riabilitazione Pediatrica l'ammontare dei pazienti dimessi è in termini percentuali

rispettivamente del 22,5% (634 di cui il 96,2% residenti nella Regione Lazio) e del 5,4% (152 di cui il 34,9% residenti nella Regione Lazio).

La degenza media dei pazienti dimessi dalle UU.OO. va da un minimo di 21,82 giorni per la Riabilitazione Cardiologica ad un massimo di 39,83 giorni per la Riabilitazione Neuromotoria, con una media totale di 30,0 giorni.

**Tab. n. 2 - Ricoveri U.O. di Riabilitazione Anno 2013 – Degenza ordinaria**

U.O. RIABILITAZIONE RICOVERI ORDINARI	Dimessi		Totale dimessi	Totale gg. Degenza	Degenza Media fuori regione	Degenza Media residenti	Degenza Media totale
	Fuori regione	Residenti					
R. età evolutiva	99	53	152	3910	24,05	28,85	25,72
R. Respiratoria	24	610	634	14117	22,13	22,27	22,27
R. Neuromotoria	80	1107	1187	47283	36,65	40,06	39,83
R. Cardiologica	50	796	846	18460	18,96	22,00	21,82
Totale	253	2566	2819	83770	26,85	29,72	30,00

### Ricoveri in Day Hospital

Per quanto concerne l'attività di Day Hospital, ci sono stati 15144 accessi, per un totale di 2352 pazienti (tab. n. 3). Dei pazienti ricoverati in regime di day hospital il 38,8% proviene da regioni diverse dalla Regione Lazio.

**Tab. n. 3 – Attività di DH - anno 2013**

	N° Dimessi regione	N° Dimessi fuori regione	Totale	Totale accessi	Numero medio accessi/pz
Riabilitazione dh	1440	912	2352	15144	6,44

Esaminando i dati più nel dettaglio (tab. n. 4), si evidenzia che, su un totale di 2352 pazienti, 1964 sono stati dimessi dal DH di Riabilitazione dell'età evolutiva (il 45,7% dei quali provenienti da regioni diverse dalla Regione Lazio), 215 dal DH di Riabilitazione Neuromotoria e 173 dal DH di Riabilitazione Cardiologica.

Il numero medio di accessi per paziente è di circa 6,44 giorni, andando da un minimo di 2,62 accessi per la Riabilitazione dell'età evolutiva ad un massimo di 31,36 accessi per la Riabilitazione Neuromotoria.

**Tab. n. 4 – Attività di DH per disciplina – anno 2013**

Riabilitazione DH	DIMESSI			ACCESSI			Accessi Medi fuori regione	Accessi Medi residenti	Accessi Medi totale
	Fuori regione	Residenti	Totale dimessi	Fuori regione	Residenti	Totale accessi			
R. età evolutiva	897	1067	1964	1719	3427	5146	1,92	3,21	2,62
R. Neuromotoria	11	204	215	334	6408	6742	30,36	31,41	31,36
R. Cardiologica	4	169	173	58	3198	3256	14,50	18,92	18,92
Totale	912	1440	2352	2111	13033	15144	2,31	9,05	6,44

Dall'analisi dei dati SIO relativi alle MDC attribuite ai pazienti dimessi per l'anno 2013, sia di riabilitazione che di medicina, (tab. 5), emerge che il 27,5% sono attribuibili alla MDC5, pertanto diagnosi legate a malattie e disturbi del Sistema Cardiocircolatorio, il 25,7% attribuibili alla MDC 1, ovvero diagnosi legate a Malattie e disturbi del Sistema Nervoso ed il 24,1% attribuibili alla MDC 19, ovvero diagnosi legate a Malattie e disturbi Mentali.

A quest'ultima MDC afferiscono i dimessi del Reparto di Riabilitazione dell'età evolutiva affetti da disabilità intellettiva, disturbi del linguaggio e dell'apprendimento e disturbi dello spettro autistico.

**Tab. 5 Classificazione dei dimessi per MDC (Riabilitazione e Medicina).**

<b>Major Diagnostic Categories</b>	<b>ORD.</b>	<b>D.H.</b>	<b>TOT.</b>	<b>%</b>
MDC 1 Malattie e disturbi del sistema nervoso	1165	536	1701	25,7
MDC 4 Malattie e disturbi dell'apparato respiratorio	878		878	13,3
MDC 5 Malattie e disturbi dell'app. cardiocircolatorio	1643	173	1816	27,5
MDC 8 Malattie e disturbi del sistema muscolo-scheletrico e del tessuto connettivo	382	69	451	6,8
MDC 19 Malattie e disturbi mentali	23	1569	1592	24,1
<b>ALTRI</b>	169	5	174	2,6
<b>TOTALE</b>	<b>6260</b>	<b>2352</b>	<b>6612</b>	<b>100,0</b>

## PROVENIENZA DEI PAZIENTI

L'IRCCS San Raffaele Pisana conferma una ragguardevole capacità attrattiva con ricoveri provenienti da tutte le regioni italiane. Considerando la totalità dei ricoveri, ordinari e diurni, oltre il 18,3% dei pazienti provengono da regioni diverse dalla regione Lazio (1209 su un totale di 6612 pazienti).

## Attività Ambulatoriale

Nell'anno 2013 sono state erogate 160.937 prestazioni di carattere ambulatoriale: 92.790 è il numero di prestazioni registrato presso il Poliambulatorio di Via Giolitti e 68147 quello realizzato presso la sede centrale dell'IRCCS.

## INNOVAZIONE E ECCELLENZA ASSISTENZIALE

### Area di Ricerca Neuromotoria

Nell'ambito della medicina riabilitativa moderna ed attuale un ruolo significativo è svolto dalla tecnologia e dallo sviluppo di dispositivi robotici per la riabilitazione. L'esperienza dell'ultimo decennio ha messo in evidenza l'importanza delle tecnologie robotiche in riabilitazione, sia in termini di risultati clinici, sia in termini di effetti positivi sui costi sanitari e sull'incremento della produttività. Negli ultimi anni, la tecnologia ha offerto al mondo della riabilitazione alcuni strumenti robotizzati per la rieducazione dell'arto superiore e del cammino.

La cura del paziente in riabilitazione neuromotoria all'IRCCS San Raffaele Pisana, è incentrata sull'eccellenza dei trattamenti anche mediante l'utilizzo di protocolli riabilitativi nuovi e all'avanguardia. A tal fine sono stati acquisiti alcuni robot, quali:

#### *Mit Manus*

È un robot prodotto presso il Massachusetts Institute of Technology (M.I.T. Institute) all'avanguardia nella riabilitazione dell'arto superiore. Tale robot è stato sviluppato e testato sia per l'utilizzo in ambito riabilitativo, che come dispositivo di ricerca nel movimento della spalla e del gomito. Sono stati effettuati numerosi studi su prestigiose riviste internazionali per dimostrare l'efficacia dell'utilizzo del robot per la riabilitazione di pazienti affetti da stroke, paralisi cerebrale infantile e cerebro lesioni. In alternativa il dispositivo è stato utilizzato nel controllo del movimento psicofisico e nella ricerca nei disturbi del movimento.

Il robot InMotion 2.0 costituisce quindi uno strumento avanzato sia per la ricerca sia per la pratica clinica in ambito riabilitativo. Il dispositivo, dotato di tutti i sistemi di sicurezza previsti e di marchio CE, è costituito da un braccio meccanico in grado di muoversi su due piani. Il soggetto, in posizione seduta, posizionando il braccio paretico su di uno specifico supporto e, partendo dal centro, deve raggiungere dei bersagli posizionati in forma circolare, come in un orologio. Il sistema, dotato di un braccio meccanico a bassissima inerzia, controllato da un sistema di controllo computerizzato, permette movimenti attivi e passivi sui due piani. Esso registra in contemporanea il comportamento del braccio umano durante l'esecuzione dei movimenti, che possono essere attivi (guidati dalla macchina), passivi (completamente gestiti dal braccio umano) oppure misti. Il sistema è in grado di riconoscere la componente volontaria del movimento del paziente e, se questa non fosse sufficiente a raggiungere il target, il braccio meccanico "accompagna" il soggetto fino al raggiungimento dell'obiettivo, vincolandone la traiettoria. Si realizza cioè la migliore condizione possibile per l'apprendimento motorio. Il Comitato Etico dell'Istituto ha autorizzato ed approvato una sperimentazione clinica sull'uso del robot nel primo mese dall'evento acuto dell'Ictus per confermare l'efficacia di un trattamento intensivo e precoce nel recupero funzionale dell'arto superiore. La ricerca, condotta in collaborazione con l'Istituto Sant'Anna di Pisa e il centro di riabilitazione "Auxilium Vitae" di Volterra si è conclusa recentemente e sono in corso le analisi dei dati finali.

## G-EO

Il secondo sistema robotico di cui è dotato l'Istituto è il G-EO della Reha Technologies. Si tratta di uno strumento motorizzato, dotato di sei motori. Il robot segue il principio dell'effettore finale. Il paziente imbracato e fissato su un sistema di scarico del peso corporeo sta in piedi su di due piattaforme, le cui traiettorie sono liberamente programmabili nel piano sagittale. Attualmente il dispositivo è in grado di simulare l'allenamento ripetitivo di tre situazioni rilevanti per la locomozione nella vita quotidiana: il cammino nel piano, l'ascesa e la discesa delle scale. I piedi del paziente vengono fissati alle piattaforme attraverso degli attacchi, i quali, per ragioni di sicurezza del paziente, si aprono quando nella caviglia viene raggiunta una posizione prestabilita. Le piattaforme sono mosse in alto e in basso, in avanti e indietro ed inclinate attraverso sei motori. Grazie ad una rampa, il paziente può essere spinto sulla sua sedia a rotelle da dietro fino alla posizione di fissaggio, oppure può salire da solo, il tutto con l'aiuto di un solo terapista. La macchina può essere impostata in base alle capacità individuali del paziente, grazie a ciò vengono soddisfatti i moderni concetti di riabilitazione che prediligono allenamenti ripetitivi e mirati. Lo scopo della terapia su questo nuovo dispositivo è il ripristino della funzione locomotoria e del controllo dell'equilibrio. Il GEO assiste i movimenti dei pazienti con deambulazione compromessa a causa di danni per lo più conseguenti a danno neurologico a livello corticale. Si ritiene che questi movimenti possano fornire dei "suggerimenti" sensoriali molto importanti per il miglioramento e mantenimento delle abilità locomotorie. L'esoscheletro è dotato di sensori elettronici a livello del piede che consentono di controllare costantemente il carico del peso corporeo sulle varie parti della pianta del piede.

Presso l'IRCCS San Raffaele Pisana è stato approvato dal Comitato Etico e attivato uno studio sperimentale all'avanguardia sulla validazione e sull'utilizzo di tale metodologia, volto al miglioramento del cammino nelle persone con esiti di stroke e con malattia di Parkinson.

In queste prime esperienze cliniche il robot ha dimostrato di essere uno strumento valido

per il recupero del cammino in fase precoce. Soprattutto nel trattamento dei pazienti con Parkinson, con disabilità medio gravi, si sono evidenziati dei promettenti successi. I dati preliminari mostrano come l'utilizzo nei pazienti con Parkinson renda possibile un recupero della velocità e della simmetria del cammino.

Nel mese di Aprile è stato effettuato un upgrade: si è aggiunto il sistema advanced, un modulo che permette un riapprendimento ed un controllo motorio più efficace nella disabilità di tipo neuromotoria. Il robot è controllato dal paziente e supporta l'attività del cammino qualora il paziente non sia in grado di camminare attivamente. Inoltre è presente la possibilità di immergere il paziente in una realtà virtuale portando idealmente la persona all'interno di paesaggi montani, di città o di piccoli villaggi.

## *AMADEO*

L'Amadeo è un dispositivo robotico di tipo end-effector creato per la riabilitazione della porzione distale dell'arto superiore ed è prodotto in Austria, a Graz.

Il robot consente alle falangi distali delle cinque dita di essere collegate, bloccandole, a delle slitte scorrevoli, che permettono movimenti di flessione ed estensione delle dita e di apertura e chiusura del palmo della mano. L'avambraccio ed il polso sono fissati ad un supporto: viene così favorito il movimento selettivo della mano e l'abbandono delle sinergie con i distretti più prossimali dell'arto superiore. Così posizionato, il paziente può compiere gesti di presa globale e di precisione o sequenze motorie delle singole dita in un numero molto alto di ripetizioni.

Il movimento viene effettuato dal paziente in modo interattivo: gli esercizi, simili a videogames, consentono di impostare il grado di difficoltà e di mettere alla prova abilità cognitive quali attenzione e memoria. Il software fornisce feedback visivi sull'andamento e la riuscita della performance, curando anche l'aspetto motivazionale della terapia. Il robot ha inoltre una ottima capacità di personalizzazione del trattamento. Infatti, se lo scopo generale degli esercizi è il recupero di forza muscolare e controllo del movimento, all'interno di ogni esercizio è possibile variare diversi parametri, adattandoli al paziente anche nel corso della stessa seduta:

- il movimento può essere passivo, gestito quindi completamente dal robot;
- il movimento può essere solo attivo nel caso in cui il paziente sia in grado di effettuare tutto il movimento; in questo caso il robot serve solo da guida e controllo col feedback del movimento e registra l'attività fatta.

Il robot consente di selezionare le sole dita da coinvolgere nell'esercizio e l'escursione articolare (0- 180°), consentire il movimento globale o delle singole dita, variare la sequenza di reclutamento delle dita e la velocità richiesta, la resistenza opposta dalle slitte al movimento, il numero e la frequenza delle ripetizioni, fino a 60 al minuto.

Il dispositivo può trovare applicazione in tutte le limitazioni funzionali della mano dipendenti da cause neurologiche (ictus cerebrale, cerebropatie di varia origine, sclerosi multipla, lesioni midollari a livello cervicale, lesioni del plesso brachiale e delle vie nervose periferiche dell'arto superiore, probabilmente anche nel Parkinson). Potrebbe trovare indicazioni anche in alcune limitazioni funzionali della mano da causa reumatico/ortopedica.

## *SCRIPT*

Si intende riuscire ad adottare un approccio al trattamento delle disabilità del paziente in terapia riabilitativa con un sistema integrato di trattamenti. Lo scenario del futuro sarà

quindi un utilizzo sinergico di sistemi robotica. In questa ottica l'Istituto partecipa ad un progetto europeo (SCRIPT), che vede il coinvolgimento di 7 partner complessivamente ed è coordinato dalla University of Hertfordshire (UK). Si intende lavorare con una serie di robot prototipi direttamente a domicilio, con un controllo, tramite teleriabilitazione, della correttezza dell'esercizio effettuato e delle modifiche allo stesso.

Il sistema per la riabilitazione robotica SCRIPT (Supervised Care & Rehabilitation Involving Personal Tele-Robotics) è stato progettato e disegnato per permettere la verifica del recupero funzionale della mano a domicilio in pazienti affetti da ictus, ed è stato sviluppato nell'ambito dell'omonimo progetto europeo da un consorzio internazionale di cui l'IRCCS San Raffaele Pisana è un fondamentale partner clinico.

Il sistema SCRIPT è composto da:

- un esoscheletro passivo comodamente indossabile che permette, tramite meccaniche sensorizzate, la flessione-estensione di tutti i giunti di mano e polso, la adduzione /abduzione del polso e l'opposizione del pollice;
- un supporto per il braccio per scaricare il peso dell'ortesi e non affaticare il paziente durante la sessione riabilitativa;
- un'interfaccia integrata con un computer ed un monitor con comunicazione touch-screen, che consente la gestione della sessione riabilitativa, l'interazione con il software dedicato e l'analisi delle grandezze biometriche misurate attraverso i sensori posti sull'esoscheletro;
- una connessione via web con un server sicuro accessibile a medico e terapeuta;

Il sistema SCRIPT, collegato via web con un server dedicato, offre quindi la possibilità di prolungare in modo controllato il processo di riabilitazione nella fase di post ospedalizzazione in pazienti colpiti da ictus, con residue capacità motorie in fase cronica.

Il sistema per la riabilitazione robotica SCRIPT2, costituisce l'evoluzione del sistema SCRIPT (Supervised Care & Rehabilitation Involving Personal Tele-Robotics), che, in aggiunta a quanto riportato sopra, è composto da una nuova raccolta di sei videogiochi interattivi sviluppati per lo svolgimento di serie di esercizi ripetuti che si traducono in un processo di riabilitazione ma in un ambiente pseudo-ludico. La novità fondamentale nel disegno di questa macchina risiede nella possibilità di controllare attivamente il movimento dell'arto del paziente per correggerne o assisterne l'evoluzione del movimento all'interno dell'esercizio richiesto. Quattro sistemi SCRIPT2 completi saranno a disposizione di pazienti nel 2014 per permetterne la validazione clinica per l'utilizzo in ambito riabilitativo domiciliare.

Nell'ambito delle attività previste dal progetto di ricerca europeo SCRIPT, sono stati trattati 10 pazienti a domicilio che hanno effettuato un training riabilitativo per il polso e per la mano mediante l'utilizzo del guanto robotico Script, con un follow-up a tre mesi dal termine del trattamento. Sono state somministrate scale cliniche come FM, Action Research Arm Test (ARAT), Ashworth e Box and Block test e scale funzionali sulla qualità della vita, sulla percezione del trattamento robotico e sulla soddisfazione personale rispetto al trattamento proposto e ai risultati ottenuti. I dati preliminari ottenuti dai nostri pazienti mostrano come vi sia una correlazione tra tempo di trattamento effettuato e risultati ottenuti in termini di miglioramento della funzionalità della mano. La maggioranza dei pazienti inoltre ha mostrato una grande soddisfazione a livello di fattibilità del trattamento, facilità di uso e risultati attesi e ottenuti.

## Area di Ricerca Cefalea e Dolore Neuropatico

*Uso della neurostimolazione vagale transcutanea mediante GammaCore per la terapia acuta dell'emicrania*

In collaborazione con l'IRCCS Carlo Besta di Milano

Il trattamento di neuromodulazione mirato alle cefalee, impiegato per la prima volta al mondo nel trattamento della cefalea a grappolo cronica farmaco-resistente, sta cambiando grazie alla messa a punto dello stimolatore nVNS, acronimo di noninvasive vagal nerve stimulation (gammacore).

Questo tipo di stimolazione può essere utilizzata sia nel trattamento sintomatico e sia in quello di profilassi.

I nuovi strumenti di stimolazione, tipo il gammaCore, offrono una gestione esclusivamente clinica del paziente cefalalgico in trattamento di neuromodulazione, senza richiedere il posizionamento neurochirurgico di un microcatetere di collegamento con il generatore di impulsi posizionato in sede extracranica. Questo tipo di stimolazione può essere utilizzata sia nel trattamento sintomatico e sia in quello di profilassi dell'emicrania.

Il device, delle dimensioni di un cellulare, va collocato sul lato destro del collo ed emette treni rettangolari di stimoli della durata di circa 90 secondi la cui intensità può essere variata tramite un'apposita rotella, fino a che il paziente non percepisce lievi contrazioni muscolari sottocutanee.

Presso il Centro dell'IRCCS San Raffaele, in collaborazione con l'IRCCS Carlo Besta Milano, è in corso uno studio osservazionale per il trattamento acuto dell'attacco in pazienti con emicrania senz'aura. I soggetti reclutati, di età compresa tra 18 e 65 anni, utilizzano il Gammacore per il trattamento di 3 attacchi consecutivi mediante una doppia stimolazione del nervo vago di destra, della durata di 60 secondi ciascuna, per ogni singolo attacco. L'efficacia del trattamento sul dolore (misurata mediante VAS) e sui sintomi associati, viene valutata dopo 30, 60 e 120 minuti e successivamente dopo 12 e 24 ore. È prevista la possibilità di ricorrere a una rescue medication nei pazienti non responsivi a 2 ore dal trattamento.

Nel corso del 2013 sono stati arruolati 20 pazienti (14 F, 6M), con un'età media di  $39 \pm 11$  ed una durata di malattia in anni di  $25 \pm 9$ . Il 40% aveva una diagnosi di emicrania senza aura, il 55% emicrania senza aura e il 45% di emicrania cronica. In totale sono stati trattati 49 attacchi ed il 43% ha avuto una risposta positiva entro 60 minuti. È in corso l'arruolamento di altri pazienti.

## Area di Ricerca Cardiovascolare

È in atto uno studio su un dispositivo medico Algisyl-LVR. Si tratta di un dispositivo nuovo e di una nuova procedura volta a prevenire o invertire il progresso di rimodellamento del LV nella cardiomiopatia dilatativa. L'alginato è un polisaccaride idrocolloide presente come componente strutturale nell'alga bruna marina. Il prodotto è altamente biocompatibile (citotossicità, mutagenicità, emolisi, irritazione o sensibilizzazione) e la cinetica dell'alginato è stata adattata in modo che l'Algisyl-LVR risulti simile per proprietà funzionali al tessuto miocardico: un materiale deformabile e poroso. I due differenti componenti dell'alginato formano un idrogel di calcio reticolato pochi minuti dopo la miscelazione, rendendolo così subito pronto da iniettare. I polimeri di alginato non si degradano biochimicamente nei tessuti degli organismi superiori.

I principi di ingegneria tessutale impiegati con Algisyl-LVR mirano all'aspetto più im-



portante del ventricolo compromesso, riducendo direttamente la tensione della parete (migliorando le prestazioni dei miociti) grazie a una riduzione strategica e mirata del raggio della camera interna. Questo approccio è unico ed evita le conseguenze negative, potenzialmente involontarie, di altre terapie quali l'alterazione delle prestazioni diastoliche, dell'emodinamica periferica o l'aumento del carico di lavoro del miocita. Algisyl-LVR viene impiantato (iniettato) direttamente nel tessuto miocardico durante una singola procedura chirurgica (cardioracica). Gli impianti sono permanenti e servono ad aumentare lo spessore della parete del LV e ridurre la tensione della parete del LV, con la conseguente riduzione delle dimensioni della camera del LV e una migliorata efficienza di pompaggio. I posizionamenti degli impianti fungono inoltre da struttura protesica, con la funzione di prevenire l'accrescimento ventricolare progressivo e ripristinare una forma più vantaggiosa per il ventricolo sinistro dilatato. I dati sperimentali dimostrano che il dispositivo produce un miglioramento immediato e sostenuto della funzione cardiaca.

Si prevede che Algisyl-LVR migliori la struttura e del funzionamento del cuore malato con un progresso associato dello stato clinico del paziente e della sua qualità della vita.

*Patients' Empowerment Partecipazione attiva dei pazienti e dei loro caregiver.*

Adesione alla "QUARTA GIORNATA NAZIONALE DELLA MALATTIA DI PARKINSON" – Evento Nazionale in cui il Centro CTC ha aderito alla Quarta Giornata Nazionale di Parkinson Promossa dalla LIMPE, con la collaborazione delle associazione dei Pazienti, al fine di offrire informazioni personalizzate e divulgazione scientifica a tutte le persone interessate. Con l'obiettivo di diffondere la conoscenza della malattia e sensibilizzare l'importanza di una diagnosi precoce. Il CTC il giorno 24/11/2012, insieme ad altri 50 Centri Parkinson distribuiti in tutto il territorio Nazionale, ha fornito assistenza e informazione a tutte le persone Interessate.

OPEN ACCESS freely available online PLOS ONE

**Walking Performance: Correlation between Energy Cost of Walking and Walking Participation. New Statistical Approach Concerning Outcome Measurement**

Marco Franceschini<sup>1</sup>, Anais Rampello<sup>1</sup>, Maurizio Agosti<sup>1</sup>, Maurizio Massucci<sup>1</sup>, Federica Boyvalenta<sup>1</sup>, Patrizio Sale<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Via delle Messiaghe 157, 00138 Rome, Italy, <sup>2</sup>Department of Experimental Medicine, Sapienza University of Rome, Via delle Messiaghe 157, 00138 Rome, Italy

OPEN ACCESS freely available online PLOS ONE

**A Proposal for a Comprehensive Grading of Parkinson's Disease Severity Combining Motor and Non-Motor Assessments: Meeting an Unmet Need**

Kaljol Ray Chaudhuri<sup>1</sup>, Jose Manuel Rojo<sup>2</sup>, Anthony H. V. Schapira<sup>3</sup>, David J. Brooks<sup>4</sup>, Fabrizio Stocchi<sup>5</sup>, Per Odin<sup>6</sup>, Angelo Antonini<sup>7</sup>, Richard J. Brown<sup>8</sup>, Pablo Martinez-Martin<sup>9\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>2</sup>Department of Neurology, Hospital General de Madrid, Madrid, Spain, <sup>3</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>4</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>5</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>6</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>7</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>8</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, <sup>9</sup>Department of Neurology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

OPEN ACCESS freely available online BMC Neurology

RESEARCH ARTICLE Open Access

**Robot-assisted walking training for individuals with Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial**

Benjamin Ling<sup>1</sup>, Maria Flaminia De Luca<sup>2</sup>, Domenico Di Paolo<sup>3</sup>, Giancarlo Ferrante<sup>4</sup>, Antonino Grimaldi<sup>5</sup>, Giuseppe Grimaldi<sup>6</sup>, Antonino Iadonna<sup>7</sup>, J. Alberto Jorquera<sup>8</sup>, Giuseppe Liguori<sup>9</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>10</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>11</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>12</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>13</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>14</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>15</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>16</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>17</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>18</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>19</sup>, Giuseppe Lombardi<sup>20</sup>

BMC Res Commun (2013) 13:387  
DOI 10.1007/s12019-013-0387-4

ORIGINAL CONTRIBUTION

**Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease**

Francesco Fedele<sup>1</sup>, Massimo Mancone<sup>1</sup>, William M. Chilian<sup>2</sup>, Paolo Severino<sup>3</sup>, Emanuele Canali<sup>4</sup>, Susanna Logan<sup>5</sup>, Maria Laura De Marchis<sup>6</sup>, Maurizio Volterrani<sup>7</sup>, Raffaele Palmirotta<sup>8</sup>, Fiorella Guadagni<sup>9</sup>

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

**SIRT1 Silencing Confers Neuroprotection Through IGF-1 Pathway Activation**

LUIGI SANSONE<sup>1,2</sup>, VALENTINA REALI<sup>1</sup>, LAURA PELLEGRINI<sup>1,3</sup>, LIDIA VILLANOVA<sup>1,4</sup>, MICHELE AVENTAGGIATO<sup>1</sup>, GABRIELLA MARFE<sup>5</sup>, ROBERTA ROSA<sup>1,6</sup>, MARCELLA NEBBIOSO<sup>8</sup>, MARCO TAFANI<sup>7</sup>, MASSIMO FINI<sup>2</sup>, MATTEO A. RUSSO<sup>1,2</sup> and BRUNA PUCCI<sup>10\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Experimental Medicine, "Sapienza" University of Rome, Rome, Italy; <sup>2</sup>Department of Cellular and Molecular Pathology, IRCCS San Raffaele Pisano, Rome, Italy; <sup>3</sup>University of Hawaii Cancer Center, Department of Cancer Biology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii; <sup>4</sup>Department of Medicine, Division of Endocrinology, Gerontology, and Metabolism, Stanford University School of Medicine, Stanford, California; <sup>5</sup>Department of Experimental Medicine and Biomedical Sciences, "Tor Vergata" University of Rome, Rome, Italy; <sup>6</sup>Department of Endocrinology and Metabolism and Clinical Oncology, University of Naples Federico II, Naples, Italy; <sup>7</sup>Department of Surgical Oncology and Gastrointestinal Medical Oncology, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas; <sup>8</sup>Department of Basic Organ, Centre of Ocean Electrophysiology, "Sapienza" University of Rome, Rome, Italy

Neuro Sci (2013) 34:1009–1060  
DOI 10.1007/s10072-013-1308-4

ORIGINAL ARTICLE

**Establishment of a biorepository for migraine research: the experience of Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM)**

Raffaele Palmirotta<sup>1</sup>, Piero Barbanti<sup>2</sup>, Giorgia Ludovici<sup>3</sup>, Gabriella Egen<sup>4</sup>, Cinzia Aurilia<sup>5</sup>, Luisa Fofi<sup>6</sup>, Maria Laura De Marchis<sup>7</sup>, Antonella Spila<sup>8</sup>, Patrizia Ferroni<sup>9</sup>, David Della-Morte<sup>10</sup>, Fiorella Guadagni<sup>11</sup>

1686

Current Medicinal Chemistry, 2013, 20, 1686–1693

**Multitarget Drugs of Plants Origin Acting on Alzheimer's Disease**

P. Russo<sup>1</sup>, A. Frustaci<sup>2</sup>, A. Del Bufalo<sup>1</sup>, M. Fini<sup>3</sup> and A. Cesario<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Systems Approaches and Non Communicable Diseases, IRCCS "San Raffaele Pisano" Via di Valcannuta, 247, I-00168 Rome, Italy; <sup>2</sup>Unit of Clinical and Molecular Epidemiology, IRCCS "San Raffaele Pisano" Via di Valcannuta, 247, I-00168 Rome, Italy; <sup>3</sup>Scientific Direction, IRCCS "San Raffaele Pisano" Via di Valcannuta, 247, I-00168 Rome, Italy; <sup>4</sup>Catholic University, Largo Agostino Gemelli, 8, I-00168 Rome, Italy

**Pulmonary Rehabilitation in lung cancer**

F. Pasqua<sup>1</sup>, K. Geraneo<sup>1</sup>, L. Nardi<sup>1</sup>, F. Locòco<sup>2</sup>, A. Cesario<sup>3</sup>

**ABSTRACT:** Pulmonary Rehabilitation in lung cancer. F. Pasqua, K. Geraneo, L. Nardi, F. Locòco, A. Cesario. Non-small-cell lung cancer (NSCLC) represents a very severe disease, leading to mortality increasingly reported and, therefore, successfully treatable only with surgery followed by its radiation. Furthermore, the disease and the clinical effects related to the complementary therapies (radio and/or chemotherapy) may adversely affect frequently with symptoms (muscle mass effects, the patient's inability to perform physical exercise. In such context, the PRP/RP, which has already been proved to be useful and effective in other diseases such as CHD), could play a crucial role.

The aim of this review article is therefore to analyze the previous data recently reported in English literature in order to highlight the role of rehabilitation as complementary therapy in the management of patients with NSCLC. The evidence currently available suggests that when surgery is indicated, PR is a safe and feasible option both among pre-operative and post-operative settings. The safety and feasibility of rehabilitation are proven even in immunable patients, although to date, little evidence has been reported on its role in the overall management of such cancer patients. *Minerva Arch Clin Oncol* 2014; 7(5):1-3000

**The effects of low arched feet on foot rotation during gait in children with Down syndrome**

M. Galli,<sup>1,2</sup> V. Cimolin,<sup>1</sup> C. Rigoldi,<sup>1</sup> M. Pau,<sup>2</sup> P. Costici<sup>3</sup> & G. Albertini<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Elettronica, Informazione e Biomeccanica, Politecnico di Milano, Milano, Italy

<sup>2</sup> IRCCS "San Raffaele Pisana", San Raffaele SpA, Roma, Italy

<sup>3</sup> Department of Mechanical, Chemical and Materials Engineering, University of Cagliari, Cagliari, Italy

<sup>4</sup> Ospedale Pediatrico Bambino Gesù, Roma, Italy

Journal Publishing Correspondence:  
Journal of Intellectual Disability Research  
Volume 3(1), Article ID 12097, 6 pages  
http://dx.doi.org/10.1111/jir.12097



Review Article

**Gene-Based Antibody Strategies for Prion Diseases**

Alessio Cardinale<sup>1</sup> and Silvia Biocca<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IRCCS San Raffaele Pisana, Via di Via Cassanese 217, 00166 Roma, Italy

<sup>2</sup> Department of System Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Via Ardeatina 4, 00133 Roma, Italy

Correspondence should be addressed to Alessio Cardinale; [alessio.cardinale@hsr.it](mailto:alessio.cardinale@hsr.it)

**FULL-LENGTH ORIGINAL RESEARCH**

**Fractalkine/CX3CL1 modulates GABA<sub>A</sub> currents in human temporal lobe epilepsy**

\*Cristina Roseti, ††Sergio Fucile, †Clotilde Lauro, ††Katuscia Martinello, †Cristina Bertollini, †Vincenzo Esposito, †Addolorata Mascia, ††Myriam Catalano, ††Eleonora Aronica, †Cristina Limatola, and ††Eleonora Palma

*Epilepsia*, 54(10):1834–1844, 2013  
doi:10.1111/epi.12354

Neuro Sci (2013) 34 (Suppl 1):S67–S70  
DOI: 10.1007/s10072-013-1415-8

**PECULIAR CLINICAL ASPECTS OF MIGRAINE**

**Dopaminergic symptoms in migraine**

Piero Barbanti • L. Fofi • C. Aurilia • G. Egge

Am J Blood Res 2013;3(1):14-28  
[www.AJBloodRes.com](http://www.AJBloodRes.com) /ISSN.2160-1992/AJBR1212001.

**Review Article**  
**Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides**

Stefania Gorni, Lucia Gatta, Laura Pontecorvo, Laura Vitiello, Andrea la Sala  
Laboratory of Molecular and Cellular Immunology, IRCCS San Raffaele Pisana, Italy

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology  
Contents lists available at ScienceDirect  
Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jabmb](http://www.elsevier.com/locate/jabmb)

**Review**  
**Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity**

Alessandra Feraco<sup>1</sup>, Andrea Armani<sup>2</sup>, Caterina Mammì<sup>3</sup>, Andrea Fabbri<sup>4</sup>, Giuseppe M.C. Rosano<sup>1</sup>, Massimiliano Caprio<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup> Centre for Clinical and Basic Research, IRCCS San Raffaele Pisana, Rome, Italy  
<sup>2</sup> San Raffaele Hospital, Salsomaggiore, 42013, Italy  
<sup>3</sup> Department of Molecular and Cellular Biochemistry, University of Perugia, Perugia, Italy

*Journal of Alzheimer's Disease* 34 (2013) 495–505  
DOI:10.1007/s12071-013-1270-9  
495 Pages

**Cortical Sources of Resting State EEG Rhythms are Sensitive to the Progression of Early Stage Alzheimer's Disease**

Claudio Babiloni<sup>1,2,3,4\*</sup>, Roberta Lizio<sup>5</sup>, Claudio Del Percio<sup>6</sup>, Nicola Marzani<sup>7</sup>, Andrea Soricelli<sup>8,9</sup>, Elena Salvatore<sup>6</sup>, Raffaele Ferri<sup>3</sup>, Filomena L.I. Cosentino<sup>3</sup>, Gioacchino Tedeschi<sup>6</sup>, Patrizia Montella<sup>6</sup>, Silvia Marino<sup>6</sup>, Simona De Salvo<sup>6</sup>, Guido Rodriguez<sup>6</sup>, Flavio Nobil<sup>6</sup>, Fabrizio Vermieri<sup>6</sup>, Francesca Ursini<sup>1</sup>, Carlo Mundi<sup>1</sup>, Jill C. Richardson<sup>4</sup>, Giovanni B. Frisoni<sup>3</sup> and Paolo M. Rossini<sup>1,10</sup>

Franceschini M, Rampello A, Agosti M, Massucci M, Bovolenta F, Sale P.

**Walking performance: Correlation between energy cost of walking and walking participation. new statistical approach concerning outcome measurement.**

PLoS ONE. 2013 02/28;8(2):e56669. doi:10.1371/journal.pone.0056669, Epub 2013 Feb 28.

Walking ability, though important for quality of life and participation in social and economic activities, can be adversely affected by neurological disorders, such as Spinal Cord Injury, Stroke, Multiple Sclerosis or Traumatic Brain Injury. The aim of this study is to evaluate if the energy cost of walking (CW), in a mixed group of chronic patients with neurological diseases almost 6 months after discharge from rehabilitation wards, can predict the walking performance and any walking restriction on community activities, as indicated by Walking Handicap Scale categories (WHS). One hundred and seven subjects were included in the study, 31 suffering from Stroke, 26 from Spinal Cord Injury and 50 from Multiple Sclerosis. The multivariable binary logistical regression analysis has produced a statistical model with good characteristics of fit and good predictability. This model generated a cut-off value of .40, which enabled us to classify correctly the cases with a percentage of 85.0%. Our research reveal that, in our subjects, CW is the only predictor of the walking performance of in the community, to be compared with the score of WHS. We have been also identifying a cut-off value of CW cost, which makes a distinction between those who can walk in the community and those who cannot do it. In particular, these values could be used to predict the ability to walk in the community when discharged from the rehabilitation units, and to adjust the rehabilitative treatment to improve the performance.

Geroini C, Mazzoleni S, Smania N, Gandolfi M, Bonaiuti D, Gasperini G, Sale P, Munari D, Waldner A, Spidalieri R, Bovolenta F, Picelli A, Posteraro F, Molteni F, Franceschini M; Italian Robotic Neurorehabilitation Research Group.

**Systematic review of outcome measures of walking training using electromechanical and robotic devices in patients with stroke.**

J Rehabil Med. 2013 Oct 23;45(10):987-996.

The aim of this systematic review was to identify appropriate selection criteria of clinical scales for future trials, starting from those most commonly reported in the literature, according to their psychometric properties and International Classification of Functioning, Disability and Health (ICF) domains.

A computerized literature research of articles was conducted in MEDLINE, EMBASE, CINALH, PubMed, PsychINFO and Scopus databases.

Study selection: clinical trials evaluating the effects of electromechanical and robot-assisted gait training trials in stroke survivors. Data extraction: Fifteen independent authors performed an extensive literature review.

A total of 45 scales was identified from 27 studies involving 966 subjects. The most commonly used outcome measures were: Functional Ambulation Category (18 studies), 10-Meter Walking Test (13 studies), Motricity Index (12 studies), 6-Minute Walking Test (11 studies), Rivermead Mobility Index (8 studies) and Berg Balance Scale (8 studies). According to the ICF domains 1 outcome measure was categorized into Body Function and Structure, 5 into Activity and none into Participation.

The most commonly used scales evaluated the basic components of walking. Future studies should also include instrumental evaluation. Criteria for scale selection should

be based on the ICF framework, psychometric properties and patient characteristics.

Gison A, Bruti L, Dall'Armi V, Palma E, Giaquinto S.

**Return to work and painkiller medication after rehabilitation for subacute back conditions. A 2-year follow-up.**

Advances in Applied Sociology. 2013; Vol.3, No.2, 106-113.

The study was aimed at evaluating the outcome after 2 years in a population of outpatients suffering from Low Back Pain (LBP) who were treated with a multi-disciplinary approach. The end-points were: 1) the rate of return to work (RTW); 2) the frequency of painkiller medication; 3) the frequency of unavoidable surgical operation; 4) the rate of relapses. Eighty consecutive subjects (75% women) were enrolled. They were referred by general physicians and completed the rehabilitation program at our centre. We followed an open, prospective design. The main results were: RTW: 92.5% positive cases; 7.5% failure. Job cohort settlement: 93.1% the same; 6.9% change. Time interval between discharge and RTW: 76.8% few days after discharge. Painkillers: At follow-up 46 participants (57.5%) could stop the medication. Surgical operations: At admission 39 participants presented with lumbar root involvement (48.7%). Only 4 of them had a surgical intervention (10.2%). In a third of cases of the all sample relapses did not occur. In conclusion, a multi-disciplinary model of intervention led to a high rate of RTW, a reduction of painkiller medication, a low rate of surgical interventions and of relapses as well. Further controlled studies are warranted for assessing the cost/benefit ratio. The clear prevalence of LBP in women recommends measures of preventing Medicine.

Mazzoleni S, Sale P, Franceschini M, Bigazzi S, Carrozza MC, Dario P, Posteraro F.

**Effects of proximal and distal robot-assisted upper limb rehabilitation on chronic stroke recovery.**

NeuroRehabilitation. 2013;33(1):33-39.

The aim of the study is to evaluate the effects of add-on distal upper limb robot-assisted treatment on the outcome of proximal regions.

64 chronic stroke patients divided into two groups participated in the study. Group A was assigned to the proximal robot-assisted rehabilitation, Group B to the proximal and distal. Shoulder/elbow subsection of Fugl-Meyer Assessment scale was collected for Group A, whereas for Group B wrist subsection was also collected. Motricity Index was used and a set of kinematic parameters was computed for both groups.

A decrease in impairment after the treatment in both groups of patients (Group A: Shoulder/elbow FM  $p < 0.001$  and MI  $p < 0.001$ ; Group B: Shoulder/elbow FM  $p < 0.001$  and MI  $p < 0.001$ ) was found. In the Group B wrist subsection of FM showed an improvement as well ( $p < 0.001$ ). No difference between groups was found in changes of clinical scales. Movement velocity and accuracy increased after the robot-assisted treatment in both groups; group B showed a greater improvement in velocity.

Robotic treatment is effective to reduce motor impairment in chronic stroke patients even if distal training added to proximal segments in the Group B does not provide any incremental benefit to the proximal segments. It remains unclear if the effectiveness of robot-assisted treatment is directly related to the upper limb segment specifically treated and which order may lead to better outcome. Our study suggests that kinematic parameters should be computed in order to better clarify the role of distal training (wrist) on proximal segments (shoulder/elbow) as well.

Mazzoleni S, Sale P, Tiboni M, Franceschini M, Carrozza MC, Posteraro F.

**Upper limb robot-assisted therapy in chronic and subacute stroke patients: a kinematic analysis.**

Am J Phys Med Rehabil. 2013 Oct;92(10 Suppl 2):e26-37

The aim of this study was to compare motor recovery in subacute and chronic stroke patients through clinical assessment scales and a set of kinematic parameters recorded using a robotic system.

Fifty post-stroke patients, 25 subacute and 25 chronic, and 20 healthy subjects participated in this study. The InMotion 2.0 robotic system for shoulder/elbow rehabilitation was used. Clinical outcome measures were used for assessment. Kinematic parameters related to the speed measured at the robot's end effector and to the movement's smoothness were computed.

The results of this study show that the robot-assisted training can contribute to reduce motor impairment in both subacute and chronic stroke patients. The evaluation of the kinematic parameters and their correlation with the clinical scales highlight some differences in mechanisms of recovery in subacute and chronic stroke patients.

The proposed set of kinematic parameters and the analysis of the reaching movements' onset time, associated with a quantitative evaluation of motor improvement provided by the clinical outcome measures, are also able to quantify the changes in the quality of motion obtained after robot-assisted therapy in stroke patients. The higher gain in the subacute stroke patients suggests that the rehabilitative treatment provided at an earlier stage is able to avoid the development of pathologic patterns, resulting in a better quality of motion.

Sale P, Bovolenta F, Agosti M, Clerici P, Franceschini M.

**Short-term and long-term outcomes of serial robotic training for improving upper limb function in chronic stroke.**

Int J Rehabil Res. 2013 Oct 11. [Epub ahead of print]

The aim of this study was to determine short-term and long-term changes in motor function in patients with chronic hemiparesis who underwent robot training and to evaluate its long-term benefit after 6 months. This was a longitudinal study with a 6-month follow-up. The 15 patients included in this study underwent the Fugl-Meyer test, the Ashworth Scale test, the Frenchay Arm test, and the Box and Block test according to the following schedule: immediately before (T1, T3) and after each treatment (T2, T4), and 6 months after T4 (T5). There were statistically significant improvements in Fugl-Meyer test between T1 and T2 and between T1 and T4; the score increased in the Ashworth Scale test for Shoulder between T1 and T3 and between T1 and T5; a statistically significant decrease was found between T1 and T2 and between T1 and T4, in the Box and Block test between T1 and T4, and also between T1 and T5. This original rehabilitation treatment may contribute toward increasing upper limb motor recovery in stable chronic stroke patients.

Sale P, De Pandis MF, Stocchi F, Domenica LP, Sova I, Cimolin V, Ancillao A, Albertini G, Galli M, Franceschini M.

**Robot-assisted walking training for individuals with Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial.**

BMC Neurol. 2013 May 24;13(1):50. [Epub ahead of print]

Over the last years, the introduction of robotic technologies into Parkinson's disease rehabilitation settings has progressed from concept to reality. However, the benefit of robotic training remains elusive. This pilot randomized controlled observer trial is aimed at investigating the feasibility, the effectiveness and the efficacy of new end-effector robot training in people with mild Parkinson's disease.

**Design.** Pilot randomized controlled trial. **Setting.** Robot assisted gait training (EG) compared to treadmill training (CG). **Participants.** Twenty cognitively intact participants with mild Parkinson's disease and gait disturbance. **Interventions.** The EG underwent a rehabilitation programme of robot assisted walking for 40 minutes, 5 times a week for 4 weeks. The CG received a treadmill training programme for 40 minutes, 5 times a week for 4 weeks. **Main outcome measures.** The outcome measure of efficacy was recorded by gait analysis laboratory. The assessments were performed at the beginning (T0) and at the end of the treatment (T1). The main outcome was the change in velocity. The feasibility of the intervention was assessed by recording exercise adherence and acceptability by specific test.

Robot training was feasible, acceptable, safe, and the participants completed 100% of the prescribed training sessions. A statistically significant improvement in gait index was found in favour of the EG (T0 versus T1). In particular, the statistical analysis of primary outcome (gait speed) using the Friedman test showed statistically significant improvements for the EG ( $p = 0,0195$ ). The statistical analysis performed by Friedman test of Step length left ( $p = 0,0195$ ) and right ( $p = 0,0195$ ) and Stride length left ( $p = 0,0078$ ) and right ( $p = 0,0195$ ) showed a significant statistical gain. No statistically significant improvements on the CG were found.

Robot training is a feasible and safe form of rehabilitative exercise for cognitively intact people with mild PD. This original approach can contribute to increase a short time lower limb motor recovery in idiopathic PD patients. The focus on the gait recovery is a further characteristic that makes this research relevant to clinical practice. On the whole, the simplicity of treatment, the lack of side effects, and the positive results from patients support the recommendation to extend the use of this treatment. Further investigation regarding the long-time effectiveness of robot training is warranted.

Tavernese E, Paoloni M, Mangone M, Mandic V, Sale P, Franceschini M, Santilli V.

**Segmental muscle vibration improves reaching movement in patients with chronic stroke. A randomized controlled trial.**

NeuroRehabilitation 2013 01/01;32(3):591-599.

Segmental muscle vibration (SMV) has been used to improve gait and to reduce spasticity in stroke patients. No data exist about the possibility to improve upper limb motor function by using SMV.

Forty-four patients with hemiparesis following chronic stroke were randomized to an experimental ( $n = 24$ ) and a control group ( $n = 20$ ). Patients in the experimental group received two weeks of general physical therapy and SMV over the biceps brachii and flexor carpi ulnaris muscles of the paretic side, while those in the control group received two weeks of general physical therapy. Kinematic analysis of reaching movement was performed at baseline and two weeks after treatment ended.

Normalized jerk, indicating the smoothness of movement, significantly improved in the experimental group, with significant difference emerging between groups at the post-treatment evaluation. Patients in the experimental group also displayed a significant improvement for mean linear velocity, mean angular velocity at shoulder, distance to tar-

get at the end of movement and movement duration. No differences emerged between baseline and post-treatment evaluations in the control group.

When added to general physical therapy, SMV is effective in improving, in a short-term period, upper limb motor performances of reaching movement in chronic stroke patients.

Borghain R, Szasz J, Stanzione P, Meshram C, Bhatt M, Chirilineau D, Stocchi F, Lucini V, Giuliani R, Forrest E, Rice P, Anand R; for the Study 016 Investigators.

**Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in Parkinson's disease with motor fluctuations.**

Mov Disord. 2013 Dec 9. [Epub ahead of print]

Levodopa is effective for the motor symptoms of Parkinson's disease (PD), but is associated with motor fluctuations and dyskinesia. Many patients require add-on therapy to improve motor fluctuations without exacerbating dyskinesia. The objective of this Phase III, multicenter, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study was to evaluate the efficacy and safety of safinamide, an  $\alpha$ -aminoamide with dopaminergic and nondopaminergic mechanisms, as add-on to l-dopa in the treatment of patients with PD and motor fluctuations. Patients were randomized to oral safinamide 100 mg/day (n=224), 50 mg/day (n=223), or placebo (n=222) for 24 weeks. The primary endpoint was total on time with no or nontroublesome dyskinesia (assessed using the Hauser patient diaries). Secondary endpoints included off time, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) Part III (motor) scores, and Clinical Global Impression-Change (CGI-C). At week 24, mean $\pm$ SD increases in total on time with no or nontroublesome dyskinesia were 1.36 $\pm$ 2.625 hours for safinamide 100 mg/day, 1.37 $\pm$ 2.745 hours for safinamide 50 mg/day, and 0.97 $\pm$ 2.375 hours for placebo. Least squares means differences in both safinamide groups were significantly higher versus placebo. Improvements in off time, UPDRS Part III, and CGI-C were significantly greater in both safinamide groups versus placebo. There were no significant between-group differences for incidences of treatment-emergent adverse events (TEAEs) or TEAEs leading to discontinuation. The addition of safinamide 50 mg/day or 100 mg/day to l-dopa in patients with PD and motor fluctuations significantly increased total on time with no or nontroublesome dyskinesia, decreased off time, and improved parkinsonism, indicating that safinamide improves motor symptoms and parkinsonism without worsening dyskinesia.

Ray Chaudhuri K, Rojo JM, Schapira AHV, Brooks DJ, Stocchi F, Odin P, Antonini A, Brown RJ, Martinez-Martin P.

**A proposal for a comprehensive grading of parkinson's disease severity combining motor and non-motor assessments: Meeting an unmet need.**

PLoS ONE. 2013 02/27;8(2):e57221. Epub 2013 Feb 27.

Non-motor symptoms are present in Parkinson's disease (PD) and a key determinant of quality of life. The Non-motor Symptoms Scale (NMSS) is a validated scale that allows quantifying frequency and severity (burden) of NMS. We report a proposal for using NMSS scores to determine levels of NMS burden (NMSB) and to complete PD patient classification.

This was an observational, cross-sectional international study of 935 consecutive patients. Using a distribution of NMSS scores by quartiles, a classification based on levels from 0 (no NMSB at all) to 4 (very severe NMSB) was obtained and its relation with Hoehn



and Yahr (HY) staging, motor and health-related quality of life scales was analyzed. Concordance between NMSB levels and grouping based on clinician's global impression of severity, using categorical regression, was determined. Disability and HRQoL predictors were identified by multiple regression models.

The distribution of motor and QoL scales scores by HY and NMSB levels was significantly discriminative. The difference in the classification of cases for both methods, HY and NMSB, was significant ( $\gamma=0.45$ ;  $ASE=0.032$ ). Concordance between NMSB and global severity-based levels from categorical regression was 91.8%, ( $\kappa=0.97$ ). NMS score was predictor of disability and QoL.

Current clinical practice does not address a need for inclusion of non-motor scores in routine assessment of PD in spite of the overwhelming influence of NMS on disability and quality of life. Our data overcome the problems of "pure motor assessment" and we propose a combined approach with addition of NMSB levels to standard motor assessments.

Olanow CW, Kieburtz K, Rascol O, Poewe W, Schapira AH, Emre M, Nissinen H, Leinonen M, Stocchi F; Stalevo Reduction in Dyskinesia Evaluation in Parkinson's Disease (STRIDE-PD) Investigators.

#### **Factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease.**

Mov Disord. 2013 Jul;28(8):1064-1071.

The Stalevo Reduction in Dyskinesia Evaluation in Parkinson's Disease (STRIDE-PD) study compared the initiation of levodopa (l-dopa) therapy with l-dopa/carbidopa (LC) versus l-dopa/carbidopa/entacapone (LCE) in patients with Parkinson's disease. In the current study, the STRIDE-PD study population was investigated to determine the effect of l-dopa dose and other risk factors on the development of dyskinesia and wearing-off. Patients were randomized to receive LCE ( $n=373$ ) or LC ( $n=372$ ). Blinded assessments for dyskinesia and wearing-off were performed at 3-month intervals for the 134- to 208-week duration of the study. The patients were divided into 4 dose groups based on nominal l-dopa dose at the time of onset of dyskinesia (or at study conclusion if there was no dyskinesia): group 1,  $<400$  mg/day ( $n=157$ ); group 2, 400 mg/day ( $n=310$ ); group 3, 401 to 600 mg/day ( $n=201$ ); and group 4,  $>600$  mg/day ( $n=77$ ). Similar analyses were performed with respect to wearing-off and any motor complication. The times to onset and frequency of dyskinesia, wearing-off, or any motor complication were compared using the log-rank test (overall trend test) and a Cox proportional hazards model (pairwise comparisons). A stepwise Cox proportional hazards model was used to screen predictive factors in a multivariate analysis. The risk of developing dyskinesia and wearing-off increased in an l-dopa dose-dependent manner ( $P<0.001$  for both). Analyses using l-dopa equivalent doses produced comparable results. Factors that were predictive of dyskinesia, in rank order, were: young age at onset, higher l-dopa dose, low body weight, North American geographic region, LCE treatment group, female gender, and more severe Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) Part II. Multivariate analyses identified similar predictors for wearing-off but included baseline UPDRS Part III and excluded weight and treatment allocation. The risk of developing dyskinesia or wearing-off was closely linked to l-dopa dose. The current results suggest that physicians should use the lowest dose of l-dopa that provides satisfactory clinical control to minimize the risk of both dyskinesia and wearing-off.

Onofrij M, Varanese S, Bonanni L, Taylor JP, Antonini A, Valente EM, Petrucci S, Stocchi F, Thomas A, Perfetti B.

**Cohort study of prevalence and phenomenology of tremor in dementia with Lewy bodies.**

J Neurol. 2013 Jul;260(7):1731-1742.

To study prevalence, specific patterns and response to treatment of tremor in dementia with Lewy bodies (DLB), in comparison with other tremulous disorders prevalence, qualitative and quantitative features of tremor were studied in an incident cohort of 67 dopaminergic treatment naive DLB, 111 Parkinson's Disease (PD) and 34 Essential Tremor (ET) patients. Tremulous DLB patients (tDLB) were compared with tremulous PD (tPD) and ET patients and followed for 2 years. Double blind placebo-controlled acute drug challenge with L-Dopa and alcohol was performed in all ET, 24 tDLB and 27 tPD. Effects of dopaminergic chronic treatment in all tDLB and tPD patients and primidone in 8 tDLB were also assessed. Tremor occurred in 44.76 % of DLB patients. The tDLB patients presented a complex pattern of mixed tremors, characterized by rest and postural/action tremor, including walking tremor and standing overflow in 50 % tDLB. Standing tremor with overflow was characteristic of tDLB ( $p < 0.001$ ). Head tremor was more frequent in tDLB than tPD and ET ( $p = 0.001$ ). The tDLB tremors were reduced by acute and chronic dopaminergic treatments ( $p < 0.01$ ) but not by alcohol or primidone. Tremor occurs commonly in DLB patients with a complex mixed tremor pattern which shows a significant response to acute and chronic dopaminergic treatments. Recognizing that there is a clinical category of tremulous DLB may help the differential diagnosis of tremors.

Quadri M, Fang M, Picillo M, Olgiati S, Breedveld GJ, Graafland J, Wu B, Xu F, Erro R, Amboni M, Pappatà S, Quarantelli M, Annesi G, Quattrone A, Chien HF, Barbosa ER; International Parkinsonism Genetics Network, Oostra BA, Barone P, Wang J, Bonifati V.

**Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism.**

Hum Mutat. 2013 Sep;34(9):1208-1215.

Autosomal recessive, early-onset Parkinsonism is clinically and genetically heterogeneous. Here, we report the identification, by homozygosity mapping and exome sequencing, of a SYNJ1 homozygous mutation (p.Arg258Gln) segregating with disease in an Italian consanguineous family with Parkinsonism, dystonia, and cognitive deterioration. Response to levodopa was poor, and limited by side effects. Neuroimaging revealed brain atrophy, nigrostriatal dopaminergic defects, and cerebral hypometabolism. SYNJ1 encodes synaptojanin 1, a phosphoinositide phosphatase protein with essential roles in the postendocytic recycling of synaptic vesicles. The mutation is absent in variation databases and in ethnically matched controls, is damaging according to all prediction programs, and replaces an amino acid that is extremely conserved in the synaptojanin 1 homologues and in SAC1-like domains of other proteins. Sequencing the SYNJ1 ORF in unrelated patients revealed another heterozygous mutation (p.Ser1422Arg), predicted as damaging, in a patient who also carries a heterozygous PINK1 truncating mutation. The SYNJ1 gene is a compelling candidate for Parkinsonism; mutations in the functionally linked protein auxilin cause a similar early-onset phenotype, and other findings implicate endosomal dysfunctions in the pathogenesis. Our data delineate a novel form of human Mendelian Parkinsonism, and provide further evidence for abnormal synaptic vesicle recycling as a central theme in the pathogenesis.

Stocchi F, Antonini A, Barone P, Tinazzi M, Zappia M, Onofri M, Ruggieri S, Morgante L, Bonuccelli U, Lopiano L, Pramstaller P, Albanese A, Attar M, Posocco V, Colombo D, Abbruzzese G.

### **Early DEtection of wEaring off in parkinson disease: The DEEP study.**

Parkinsonism Relat Disord 2013.10.027. Epub 2013 Nov 5.

The aim of the study is to assess the frequency of Wearing-Off (WO) in Parkinson's disease (PD) patients, and its impact on Quality of Life (QoL).

Consecutive ambulatory patients, who were on dopaminergic treatment for  $\geq 1$  year, were included in this multicentre, observational cross-sectional study. In a single visit, WO was diagnosed based on neurologist assessment as well as using the validated Italian version of a patient self-rated 19-question Wearing-Off Questionnaire (WOQ-19); WO was defined for scores  $\geq 2$ . QoL was evaluated by the 8-item Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-8).

617 subjects were included, with a mean anti-Parkinson treatment duration of  $6.6 \pm 4.6$  years, 87.2% were on levodopa treatment. Neurologists identified presence of WO in 351 subjects (56.9%), whereas 415 subjects (67.3%) were identified by the self-administered WOQ-19. In patients with a  $< 2.5$  years disease duration, WO was diagnosed in 12 subjects (21.8%) by neurologists and in 23 subjects (41.8%) by the WOQ-19. The most frequent WO symptoms, as identified by WOQ-19, were "slowness of movements" (55.8%) and "reduced dexterity" (48.8%). Younger age, female gender, Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) part II score and duration of anti-Parkinson treatment were found significantly associated with WO. The number of motor ( $p < 0.0001$ ) and non-motor ( $p < 0.0001$ ) WO symptoms correlated with PDQ-8 total score. WO is common already at the early stages of PD and is underestimated by routine neurological clinical evaluation. The number of WO symptoms, both motor and non motor, increases along with disease duration and has a negative impact on patients QoL.

Stocchi F, The ADAGIO investigators.

### **Benefits of treatment with rasagiline for fatigue symptoms in patients with early Parkinson's disease.**

Eur J Neurol. 2013 Jun 21. [Epub ahead of print]

Fatigue is a common symptom of Parkinson's disease (PD), often considered by patients as one of the most disabling PD symptoms with significant impact on quality of life. Our aim was to assess the benefits of rasagiline treatment on fatigue in early PD patients.

In this sub-study of ADAGIO (N Engl J Med 2009; 361: 1268), 1105 untreated PD patients were randomized to receive rasagiline 1 mg/day ( $n = 270$ ) or 2 mg/day ( $n = 277$ ) or placebo ( $n = 558$ ) for 36 weeks. The 16-item Parkinson Fatigue Scale (PFS) was assessed at baseline and at week 36/early withdrawal visit. Changes from baseline to last observed visit for each rasagiline group were compared with placebo using ancova.

Mean baseline PFS score was  $2.2 \pm 0.9$  units. At 36 weeks, patients receiving placebo showed greater progression of symptoms (0.17 units) from baseline in PFS scores compared with the 1 mg/day (0.03 units) and 2 mg/day rasagiline groups (-0.02 units); the difference versus placebo was significant for both rasagiline groups ( $P < 0.01$ ).

Symptoms of fatigue can be detected in patients with early PD and progressively worsen over time. Rasagiline was associated with significantly less progression of fatigue compared with placebo over a 9-month period.

Stocchi F, Olanow CW.

**Obstacles to the development of a neuroprotective therapy for Parkinson's disease.**  
Mov Disord. 2013 Jan;28(1):3-7.

A neuroprotective or disease-modifying therapy that can slow or stop disease progression and prevent the development of intolerable disability is the major unmet medical need in the treatment of Parkinson's disease (PD). Many putative neuroprotective agents have been identified in the laboratory, but none has been unequivocally demonstrated to provide disease-modifying effects in PD patients, even when clinical trials are positive. Obstacles to defining a neuroprotective therapy in PD include: (1) uncertainty about the cause of PD and precisely what to target, (2) a reliable animal model in which to test putative neuroprotective agents that accurately predicts results in PD patients, (3) insight about which dose to employ in clinical trials and which patient group to study, (4) a clinical trial design that reliably differentiates disease-modifying and symptomatic effects and that is acceptable to regulatory authorities, and (5) the cost and time of the development program. Advances have been made in each of these areas, thereby increasing the prospects of developing a neuroprotective or disease-modifying therapy in the not-too-distant future. These issues are reviewed in the present article.

Stocchi F, Rascol O, Destee A, Hattori N, Hauser RA, Lang AE, Poewe W, Stacy M, Tolosa E, Gao H, Nagel J, Merschhemke M, Graf A, Kenney C, Trenkwalder C.

**AFQ056 in Parkinson patients with levodopa-induced dyskinesia: 13-week, randomized, dose-finding study.**

Mov Disord. 2013 Jul 12.

AFQ056 is a novel, selective metabotropic glutamate receptor 5 antagonist. This was a 13-week, double-blind, placebo-controlled study. Patients with Parkinson's disease and moderate-to-severe levodopa (l-dopa)-induced dyskinesia who were receiving stable l-dopa/anti-parkinsonian treatment and were not currently receiving amantadine were randomized to receive either AFQ056 (at doses of 20, 50, 100, 150, or 200 mg daily) or placebo (1:1:1:1:2:3 ratio) for 12 weeks. The primary outcome was the modified Abnormal Involuntary Movements Scale. Secondary outcomes included the 26-item Parkinson's Disease Dyskinesia Scale, the Patient's/Clinician's Global Impression of Change, and the Unified Parkinson's Disease Rating Scale parts III (motor evaluation) and IV (severity of motor complications). Safety was assessed. In total, 98 of 133 (73.7%) AFQ056-treated patients and 47 of 64 (73.4%) patients in the placebo group completed the study. Baseline characteristics were comparable. Patients randomized to AFQ056 200 mg daily administered in 2 doses demonstrated significant improvements at Week 12 on the modified Abnormal Involuntary Movements Scale compared with placebo (difference, -2.8; 95% confidence interval [CI], -5.2, -0.4;  $P=0.007$ ). Based on final actual doses, there was a dose-response relationship on the modified Abnormal Involuntary Movements Scale, with 200 mg daily demonstrating the most robust effect (difference, -3.6; 95% CI, -7.0, -0.3;  $P=0.012$ ). Improvements in dyskinesia were supported by change on Unified Parkinson's Disease Rating Scale part IV item 32 (50 mg daily: difference, -0.7; 95% CI, -1.1, -0.2;  $P=0.003$ ; 200 mg daily: difference, -0.5; 95% CI, -0.8, -0.1;  $P=0.005$ ). No significant changes were observed on the 26-item Parkinson's Disease Dyskinesia Scale, the Unified Parkinson's Disease Rating Scale part IV item 33 or items 32 and 33, or the Patient's/Clinician's Global Impression of Change. Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III scores were not significantly changed, indicating no wor-

sening of motor symptoms. The most common adverse events (with incidence greater with AFQ056 than with placebo) were dizziness, hallucination, fatigue, nasopharyngitis, diarrhea, and insomnia. AFQ056 demonstrated anti-dyskinetic efficacy in this population without worsening underlying motor symptoms. These results will guide dose selection for future clinical trials.

Barbanti P, Aurilia C, Egeo G, Fofi L, Vanacore N.

**A case-control study on excessive daytime sleepiness in chronic migraine.**

Sleep Med. 2013 Mar;14(3):278-281.

Excessive daytime sleepiness is a major clinical and health concern that can have varied and sometimes harmful consequences. Findings from uncontrolled studies suggest a high prevalence in patients with chronic migraine.

In a case-control study, we compared frequency data for excessive daytime sleepiness in 100 patients with chronic migraine and 100 healthy controls paired for sex and age, and assessed risk factors including lifestyle, sleep quality, anxiety, depression, concomitant disease and medications.

The frequency of excessive daytime sleepiness was higher in migraineurs (especially in those with medication overuse) than in controls (20% versus 6%; odds ratio 3.92, 95% CI 1.5-10.22), but was lower than previously reported and correlated with poor quality sleep and anxiolytic and antidepressant use.

Again confirming that disability in chronic migraine is multifactorial in origin, excessive daytime sleepiness, especially in migraineurs who overuse medications, adds to the multiple factors known to impair social and working function. Patients with chronic migraine might benefit from diagnostic interviews focussing also on sleep problems and from targeted psychoactive drug prescribing.

Barbanti P, Fofi L, Aurilia C, Egeo G.

**Dopaminergic symptoms in migraine.**

Neurol Sci. 2013 May;34 Suppl 1:67-70.

Migraine pain is often preceded, accompanied and followed by dopaminergic symptoms (premonitory yawning and somnolence, accompanying nausea and vomiting, postdromal somnolence, euphoria and polyuria). After reviewing evidence from pharmacological, biochemical, genetic and animal experimental studies on the relationship between dopamine and migraine, and matching these data with patients' clinical features, we postulate that migraine attacks could be characterized by an ictal dopamine release in a subject with dopamine receptor hypersensitivity due to a chronic dopaminergic deficit synergistic to serotonergic impairment. Our review suggests that when the attack begins, a low dopamine plasma concentration stimulates hypersensitive central presynaptic dopamine receptors thus causing prodromal symptoms such as yawning and somnolence. Increasing dopamine levels, though still insufficient to stop trigemino-vascular activation, stimulate postsynaptic dopamine receptors thus inducing nausea, vomiting and hypotension. Finally, dopamine levels slowly return to baseline, giving rise to somnolence and fatigue, but, in some cases, continue to rise triggering postdromal symptoms such as euphoria and polyuria.

Bonini F, Egeo G, Fattouch J, Fanella M, Morano A, Giallonardo AT, di Bonaventura C.  
**Natural evolution from idiopathic photosensitive occipital lobe epilepsy to idio-**

### **pathic generalized epilepsy in an untreated young patient.**

Brain Dev. 2013 Jun 28. [Epub ahead of print]

Idiopathic photosensitive occipital lobe epilepsy (IPOE) is an idiopathic localization-related epilepsy characterized by age-related onset, specific mode of precipitation, occipital photic-induced seizures - frequently consisting of visual symptoms - and good prognosis. This uncommon epilepsy, which usually starts in childhood or adolescence, has rarely been observed in families in which idiopathic generalized epilepsy also affects other members. We describe a nuclear family in which the proband showed electro-clinical features of idiopathic photosensitive occipital lobe epilepsy in childhood, which subsequently evolved into absences and a single generalized tonico-clonic seizure in early adolescence. His mother had features suggestive of juvenile myoclonic epilepsy. This case illustrates a continuum between focal and generalized entities in the spectrum of the so-called idiopathic (genetically determined) epileptic syndromes.

Fanciulli M, Di Bonaventura C, Egeo G, Fattouch J, Dazzo E, Radovic S, Spadotto A, Giallonardo AT, Nobile C.

### **Suggestive linkage of familial mesial temporal lobe epilepsy to chromosome 3q26.**

Epilepsy Res. 2013 [Epub ahead of print]

The aim of the study is to describe the clinical findings in a family with a benign form of mesial temporal lobe epilepsy and to identify the causative genetic factors.

All participants were personally interviewed and underwent neurologic examination. The affected subjects underwent EEG and most of them neuroradiological examinations (MRI). All family members were genotyped with the HumanCytoSNP-12 v1.0 beadchip and linkage analysis was performed with Merlin and Simwalk2 programs. Exome sequencing was performed on HiSeq2000, after exome capture with SureSelect 50Mb kit v2.0.

The family had 6 members with temporal lobe epilepsy. Age at seizure onset ranged from 8 to 13 years. Five patients had epigastric auras often associated to oro-alimentary automatic activity, 3 patients presented loss of contact, and 2 experienced secondary generalizations. Febrile seizures occurred in 2 family members, 1 of whom also had temporal lobe epilepsy. EEG showed focal slow waves and epileptic abnormalities on temporal regions in 1 patient and was normal in the other affected individuals. MRI was normal in all temporal lobe epilepsy patients. We performed single nucleotide polymorphism-array linkage analysis of the family and found suggestive evidence of linkage (LOD score=2.106) to a region on chromosome 3q26. Haplotype reconstruction supported the linkage data and showed that the majority of unaffected family members carried the haplotype at risk. Whole exome sequencing failed to identify pathogenic mutations in genes of the candidate region.

Our data suggest the existence of a novel locus for benign familial mesial temporal lobe epilepsy on chromosome 3q26. Our failure to identify pathogenic mutations in genes of this region may be due to limitations of the exome sequencing technology.

Fanella M, Egeo G, Fattouch J, Casciato S, Lapenta L, Morano A, Giallonardo AT, Di Bonaventura C.

### **Oxcarbazepine-induced myoclonic status epilepticus in juvenile myoclonic epilepsy.**

Epileptic Disord. 2013 Jun;15(2):181-187.

Juvenile myoclonic epilepsy (JME) is a frequent idiopathic generalised epilepsy syndrome with typical clinical and EEG features that can usually be controlled by valproate monotherapy. JME may be underdiagnosed or misdiagnosed; in the latter case, it may be mistaken for partial epilepsy. The incorrect diagnosis of JME is likely to result in inappropriate therapy, which may, in turn, worsen the seizures. While a number of studies have documented that carbamazepine aggravates idiopathic generalised epilepsy, few have shown a worsening of symptoms following the administration of oxcarbazepine (OXC). We report the case of a 44-year-old male affected by JME in which the inappropriate use of OXC precipitated a dramatic worsening of myoclonic seizures. In this case, video-EEG monitoring documented myoclonic status epilepticus with positive and negative myoclonus, correlating with repetitive, continuous, rhythmic, generalised polyspike-and-wave discharges. This is the first case of myoclonic status epilepticus induced by OXC in a patient with JME which is clearly documented by video-EEG. A review of the literature with regards to OXC-induced worsening of seizures is also presented.

Palmirotta R, Barbanti P, Ludovici G, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Spila A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F.

**Establishment of a biorepository for migraine research: the experience of Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM).**

Neurol Sci. 2013 Jan 26. [Epub ahead of print]

The development of Biobanks and recent advances in molecular biology have enhanced the possibility to accelerate translational research studies. The Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM) is organized in a large healthy donors collection and pathology-based biobanks with the aim to provide a service for development of interdisciplinary studies. A new pathology-based biobank has been organized to specifically collect biospecimen from patients affected by migraine, with the final goal to centralize data, collect blood, plasma, serum, DNA and RNA of patients with this disease. The BioBIM is fully equipped for the automation of sampling/processing, storage and tracking of biospecimens. Standard Operating Procedures have been developed for processing and storage phases as well as archive of clinical data. The availability of biospecimens and clinical data will constitute a resource for various research projects.

Palmirotta R, Ludovici G, Egeo G, Ialongo C, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Della-Morte D, Barbanti P, Guadagni F.

**Prion Protein Gene M129V polymorphism and variability in age at migraine onset.**

Headache. 2013 Mar;53(3):540-545.

Prion protein, a sialoglycoprotein with neuroprotective properties on oxidative stress damage, has been related with the mechanisms leading to migraine. In the present case-control study, we investigated the correlation between the common methionine/valine polymorphism at codon 129 within the prion protein gene (PRNP) and migraine. Genotyping of PRNP V129M variant was performed in 384 migraine patients and 185 age-, sex-, and race-ethnicity-matched healthy controls. The frequencies of the PRNP V129M genotype did not differ significantly between migraineurs and controls. The frequencies of 129VV genotype were significantly higher in patients with earlier age at migraine onset. No correlation was found between PRNP 129 genotype and demographics, and other clinical migraine features. Our data suggest that the PRNP 129VV

polymorphism is not a direct migraine risk factor but is significantly associated with an earlier onset of the disease.

Tullo V, Bussone G, Omboni S, Barbanti P, Cortelli P, Curone M, Peccarisi C, Benedetto C, Pezzola D, Zava D, Allais G.

**Efficacy of frovatriptan and other triptans in the treatment of acute migraine of hypertensive and normotensive subjects: a review of randomized studies.**

Neurol Sci. 2013 May;34 Suppl 1:87-91.

Migraine might be associated with high blood pressure (BP), which can cause more severe and more difficult to treat forms of headache. To evaluate the efficacy of frovatriptan and other triptans in the acute treatment of migraine, in patients classified according to a history of arterial hypertension, enrolled in three randomized, double-blind, crossover, Italian studies. Migraineurs with or without aura were randomized to frovatriptan 2.5 mg or rizatriptan 10 mg (study 1), frovatriptan 2.5 mg or zolmitriptan 2.5 mg (study 2), frovatriptan 2.5 mg or almotriptan 12.5 mg (study 3). After treating up to three episodes of migraine in 3 months with the first treatment, patients switched to the alternate treatment for the next 3 months. The present analysis assessed triptan efficacy in 60 subjects with a history of treated or untreated essential arterial hypertension (HT) and in 286 normotensive (NT) subjects. During the study, migraine attacks with aura were significantly more prevalent in HT subjects (21 vs. 13 % NT,  $p < 0.001$ ). The proportion of pain free at 2 h did not significantly differ between HTs and NTs for either frovatriptan (25 vs. 26 %) or the comparators (33 vs. 32 %). Pain relief was achieved in significantly ( $p < 0.05$ ) fewer episodes in HT subjects for both frovatriptan (41 vs. 52 % NT) and the comparators (48 vs. 58 %). Relapses at 48 h were similarly low in HTs and NTs with frovatriptan (29 vs. 31 %), while they were significantly ( $p < 0.05$ ) larger in HTs (62 %) than in NTs (44 %) with comparators. No BP or heart rate increment was observed during the study in HT subjects. No difference in tolerability was reported between HTs and NTs. In conclusion, HT individuals tend to be less responsive than NT migraineurs to triptan therapy. However, frovatriptan, in contrast to other triptans, seems to have a sustained antimigraine effect in both HT and NT patients.

Tullo V, Valguarnera F, Barbanti P, Cortelli P, Sette G, Allais G, d'Onofrio F, Curone M, Zava D, Pezzola D, Benedetto C, Frediani F, Bussone G.

**Comparison of frovatriptan plus dexketoprofen (25 mg or 37.5 mg) with frovatriptan alone in the treatment of migraine attacks with or without aura: A randomized study.**

Cephalalgia. 2013 Dec 20. [Epub ahead of print]

Drugs for migraine attacks include triptans and NSAIDs; their combination could provide greater symptom relief.

A total of 314 subjects with history of migraine, with or without aura, were randomized to frovatriptan 2.5mg alone (Frova), frovatriptan 2.5 mg + dexketoprofen 25mg (FroDex25) or frovatriptan 2.5mg+dexketoprofen 37.5mg (FroDex37.5) and treated at least one migraine attack. This was a multicenter, randomized, double-blind, parallel-group study. The primary end point was the proportion of pain free (PF) at two hours. Secondary end points were PF at one and four hours, pain relief (PR) at one, two, four hours, sustained PF (SPF) at 24 and 48 hours, recurrence at 48 hours, resolution of nausea, photophobia and phonophobia at two and four hours, the use of rescue medication and



the judgment of the treatment.

The results were assessed in the full analysis set (FAS) population, which included all subjects randomized and treated for whom at least one post-dose intensity of headache was recorded. The proportions of subjects PF at two hours (primary end point) were 29% (27/93) with Frova compared with 51% (48/95 FroDex25 and 46/91 FroDex37.5) with each combination therapies (  $P < 0.05$ ). Proportions of SPF at 24 hours were 24% (22/93) for Frova, 43% (41/95) for FroDex25 (  $P < 0.001$ ) and 42% (38/91) for FroDex37.5 (  $P < 0.05$ ). SPF at 48 hours was 23% (21/93) with Frova, 36% (34/95) with FroDex25 and 33% (30/91) with FroDex37.5 (  $P = \text{NS}$ ). Recurrence was similar for Frova (22%, 6/27), FroDex25 (29%, 14/48) and FroDex37.5 (28%, 13/46) ( $P = \text{NS}$ ), meaning a lack of improvement with the combination therapy. Statistical adjustment for multiple comparisons was not performed. No statistically significant differences were reported in the occurrence of total and drug-related adverse events. FroDex25 and FroDex37.5 showed a similar efficacy both for primary and secondary end points. There did not seem to be a dose response curve for the addition of dexketoprofen.

FroDex improved initial efficacy at two hours compared to Frova whilst maintaining efficacy at 48 hours in this study. Tolerability profiles were comparable. Intrinsic pharmacokinetic properties of the two single drugs contribute to this improved efficacy profile.

Cardinale A, Biocca S.

#### **Gene-Based Antibody Strategies for Prion Diseases.**

Int J Cell Biol. 2013 Epub 2013 Aug 21. Review.

Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are a group of neurodegenerative and infectious disorders characterized by the conversion of a normal cellular protein PrPC into a pathological abnormally folded form, termed PrPSc. There are neither available therapies nor diagnostic tools for an early identification of individuals affected by these diseases. New gene-based antibody strategies are emerging as valuable therapeutic tools. Among these, intrabodies are chimeric molecules composed by recombinant antibody fragments fused to intracellular trafficking sequences, aimed at inhibiting, *in vivo*, the function of specific therapeutic targets. The advantage of intrabodies is that they can be selected against a precise epitope of target proteins, including protein-protein interaction sites and cytotoxic conformers (i.e., oligomeric and fibrillar assemblies). Herein, we address and discuss *in vitro* and *in vivo* applications of intrabodies in prion diseases, focussing on their therapeutic potential.

Cifelli P, Palma E, Roseti C, Verlengia G, Simonato M.

#### **Changes in the sensitivity of GABAA current rundown to drug treatments in a model of temporal lobe epilepsy.**

Front Cell Neurosci. 2013 Jul 11;7:108.

The pharmacological treatment of mesial temporal lobe epilepsy (mTLE), the most common epileptic syndrome in adults, is still unsatisfactory, as one-third of the patients are or become refractory to antiepileptic agents. Refractoriness may depend upon drug-induced alterations, but the disease *per se* may also undergo a progressive evolution that affects the sensitivity to drugs. mTLE has been shown to be associated with a dysfunction of the inhibitory signaling mediated by GABAA receptors. In particular, the repetitive activation of GABAA receptors produces a use-dependent decrease (rundown) of the evoked currents (I GABA), which is markedly enhanced in the hippocampus

and cortex of drug-resistant mTLE patients. This phenomenon has been also observed in the pilocarpine model, where the increased I GABA rundown is observed in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure, then extends to the cortex and remains constant in the chronic phase of the disease. Here, we examined the sensitivity of I GABA to pharmacological modulation. We focused on the antiepileptic agent levetiracetam (LEV) and on the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which were previously reported to attenuate mTLE-induced increased rundown in the chronic human tissue. In the pilocarpine model, BDNF displayed a paramount effect, decreasing rundown in the hippocampus at the time of the first seizure, as well as in the hippocampus and cortex in the chronic period. In contrast, LEV did not affect rundown in the hippocampus, but attenuated it in the cortex. Interestingly, this effect of LEV was also observed on the still unaltered rundown observed in the cortex at the time of the first spontaneous seizure. These data suggest that the sensitivity of GABA<sub>A</sub> receptors to pharmacological interventions undergoes changes during the natural history of mTLE, implicating that the site of seizure initiation and the timing of treatment may highly affect the therapeutic outcome.

Conti L, Limon A, Palma E, Miledi R.

**Microtransplantation of cellular membranes from squid stellate ganglion reveals ionotropic GABA Receptors.**

Biol Bull. 2013 Feb;224(1):47-52.

The squid has been the most studied cephalopod, and it has served as a very useful model for investigating the events associated with nerve impulse generation and synaptic transmission. While the physiology of squid giant axons has been extensively studied, very little is known about the distribution and function of the neurotransmitters and receptors that mediate inhibitory transmission at the synapses. In this study we investigated whether  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) activates neurotransmitter receptors in stellate ganglia membranes. To overcome the low abundance of GABA-like mRNAs in invertebrates and the low expression of GABA in cephalopods, we used a two-electrode voltage clamp technique to determine if *Xenopus laevis* oocytes injected with cell membranes from squid stellate ganglia responded to GABA. Using this method, membrane patches containing proteins and ion channels from the squid's stellate ganglion were incorporated into the surface of oocytes. We demonstrated that GABA activates membrane receptors in cellular membranes isolated from squid stellate ganglia. Using the same approach, we were able to record native glutamate-evoked currents. The squid's GABA receptors showed an EC(50) of 98  $\mu$ mol l(-1) to GABA and were inhibited by zinc (IC(50) = 356  $\mu$ mol l(-1)). Interestingly, GABA receptors from the squid were only partially blocked by bicuculline. These results indicate that the microtransplantation of native cell membranes is useful to identify and characterize scarce membrane proteins. Moreover, our data also support the role of GABA as an ionotropic neurotransmitter in cephalopods, acting through chloride-permeable membrane receptors.

Roseti C, Fucile S, Lauro C, Martinello K, Bertollini C, Esposito V, Mascia A, Catalano M, Aronica E, Limatola C, Palma E.

**Fractalkine/CX3CL1 modulates GABA<sub>A</sub> currents in human temporal lobe epilepsy.**

Epilepsia. 2013;54(10):1834-1844.

The chemokine fractalkine/CX3CL1 and its receptor CX3CR1 are widely expressed in

the central nervous system (CNS). Recent evidence showed that CX3CL1 participates in inflammatory responses that are common features of CNS disorders, such as epilepsy. Mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) is the prevalent form of focal epilepsy in adults, and hippocampal sclerosis (HS) represents the most common underlying pathologic abnormality, as demonstrated at autopsy and postresection studies. Relevant features of MTLE are a characteristic pattern of neuronal loss, as are astrogliosis and microglia activation. Several factors affect epileptogenesis in patients with MTLE, including a lack of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)ergic inhibitory efficacy. Therefore, experiments were designed to investigate whether, in MTLE brain tissues, CX3CL1 may influence GABA<sub>A</sub> receptor (GABA<sub>A</sub> R) mediated transmission, with a particular focus on the action of CX3CL1 on the use-dependent decrease (rundown) of the GABA-evoked currents (IGABA), a feature underlying the reduction of GABAergic function in epileptic tissue.

Patch-clamp recordings were obtained from cortical pyramidal neurons in slices from six MTLE patients after surgery. Alternatively, the cell membranes from epileptic brain tissues of 17 MTLE patients or from surgical samples and autopsies of nonepileptic patients were microtransplanted into *Xenopus* oocytes, and IGABA were recorded using the standard two-microelectrode voltage-clamp technique. Immunohistochemical staining and double-labeling studies were carried out on the same brain tissues to analyze CX3CR1 expression.

In native pyramidal neurons from cortical slices of patients with MTLE, CX3CL1 reduced IGABA rundown and affected the recovery of IGABA amplitude from rundown. These same effects were confirmed in oocytes injected with cortical and hippocampal MTLE membranes, whereas CX3CL1 did not influence IGABA in oocytes injected with nonepileptic tissues. Consistent with a specific effect of CX3CL1 on tissues from patients with MTLE, CX3CR1 immunoreactivity was higher in MTLE sclerotic hippocampi than in control tissues, with a prominent expression in activated microglial cells.

These findings indicate a role for CX3CL1 in MTLE, supporting recent evidence on the relevance of brain inflammation in human epilepsies. Our data demonstrate that in MTLE tissues the reduced GABAergic function can be modulated by CX3CL1. The increased CX3CR1 expression in microglia and the modulation by CX3CL1 of GABAergic currents in human epileptic brain suggests new therapeutic approaches for drug-resistant epilepsies based on the evidence that the propagation of seizures can be influenced by inflammatory processes.

Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Marzano N, Infarinato F, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Bonforte C, Tedeschi G, Montella P, Baglieri A, Rodriguez G, Famà F, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state electroencephalographic alpha rhythms deteriorate across time in subjects with amnesic mild cognitive impairment.**

Neurobiol Aging. 2013 Jul 30. [Epub ahead of print]

Cortical sources of resting state electroencephalographic (EEG) rhythms are abnormal in subjects with mild cognitive impairment (MCI). Here, we tested the hypothesis that these sources in amnesic MCI subjects further deteriorate over 1 year. To this aim, the resting state eyes-closed EEG data were recorded in 54 MCI subjects at baseline (Mini Mental State Examination I = 26.9; standard error [SE], 0.2) and at approximately 1-year follow-up (13.8 months; SE, 0.5; Mini Mental State Examination II = 25.8; SE, 0.2). As a control, EEG recordings were also performed in 45 normal elderly and in 50 mild Alzheimer's disease subjects. EEG rhythms of interest were delta (2-4 Hz), theta (4-8

Hz), alpha1 (8-10.5 Hz), alpha2 (10.5-13 Hz), beta1 (13-20 Hz), and beta2 (20-30 Hz). Cortical EEG sources were estimated using low-resolution brain electromagnetic tomography. Compared with the normal elderly and mild Alzheimer's disease subjects, the MCI subjects were characterized by an intermediate power of posterior alpha1 sources. In the MCI subjects, the follow-up EEG recordings showed a decreased power of posterior alpha1 and alpha2 sources. These results suggest that the resting state EEG alpha sources were sensitive—at least at the group level—to the cognitive decline occurring in the amnesic MCI group over 1 year, and might represent cost-effective, noninvasive and widely available markers to follow amnesic MCI populations in large clinical trials.

Babiloni C, Lizio R, Del Percio C, Marzano N, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Cosentino FI, Tedeschi G, Montella P, Marino S, De Salvo S, Rodriguez G, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Richardson JC, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state EEG rhythms are sensitive to the progression of Alzheimer's disease at early stage.**

J Alzheimers Dis. 2013 Jan 1;34(4):1015-1035.

Cortical sources of resting state electroencephalographic (EEG) rhythms are abnormal in subjects with Alzheimer's disease (AD). Here we tested the hypothesis that these sources are also sensitive to the progression of early stage AD over the course of one year. The resting state eyes-closed EEG data were recorded in 88 mild AD patients at baseline (Mini Mental State Evaluation, MMSE I =  $21.7 \pm 0.2$  standard error, SE) and at approximately one-year follow up (13.3 months  $\pm 0.5$  SE; MMSE II =  $20 \pm 0.4$  SE). All patients received standard therapy with acetylcholinesterase inhibitors. EEG recordings were also performed in 35 normal elderly (Nold) subjects as controls. EEG rhythms of interest were delta (2-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha 1 (8-10.5 Hz), alpha 2 (10.5-13 Hz), beta 1 (13-20 Hz), beta 2 (20-30 Hz), and gamma (30-40 Hz). Cortical EEG sources were estimated by low-resolution brain electromagnetic tomography (LORETA). Compared to the Nold subjects, the mild AD patients were characterized by a power increase of widespread delta sources and by a power decrease of posterior alpha sources. In the mild AD patients, the follow-up EEG recordings showed increased power of widespread delta sources as well as decreased power of widespread alpha and posterior beta 1 sources. These results suggest that the resting state EEG sources were sensitive, at least at group level, to the cognitive decline occurring in the mild AD group over a one-year period, and might represent cost-effective and non-invasive markers with which to enrich cohorts of AD patients that decline faster for clinical studies.

Capotosto P, Babiloni C, Romani GL, Corbetta M.

**Resting-state modulation of alpha rhythms by interference with angular gyrus activity.**

J Cogn Neurosci. 2013 Aug 12. [Epub ahead of print]

The default mode network is active during restful wakefulness and suppressed during goal-driven behavior. We hypothesize that inhibitory interference with spontaneous ongoing, that is, not task-driven, activity in the angular gyrus (AG), one of the core regions of the default mode network, will enhance the dominant idling EEG alpha rhythms observed in the resting state. Fifteen right-handed healthy adult volunteers underwent to this study. Compared with sham stimulation, magnetic stimulation (1 Hz for 1 min) over both left and right AG, but not over FEF or intraparietal sulcus, core regions of the dorsal attention network, enhanced the dominant alpha power density (8-10 Hz) in

occipitoparietal cortex. Furthermore, right AG-rTMS enhanced intrahemispheric alpha coherence (8-10 Hz). These results suggest that AG plays a causal role in the modulation of dominant low-frequency alpha rhythms in the resting-state condition.

Del Percio C, Triggiani AI, Marzano N, De Rosas M, Valenzano A, Petito A, Bellomo A, Soricelli A, Cibelli G, Babiloni C.

**Subjects' hypnotizability level affects somatosensory evoked potentials to non-painful and painful stimuli.**

Clin Neurophysiol. 2013 Jul;124(7):1448-1455.

We evaluated the working hypothesis that the EEG activity associated to non-painful and painful stimuli in condition of waking state (no hypnotic procedure) was related to the hypnotizability level.

Hypnotizability level was measured in 16 healthy subjects through the Italian version of the Stanford Hypnotic Susceptibility Scale (SHSS, score: 0-12). EEG data (56 electrodes) were recorded during non-painful and painful electrical stimuli applied to the left index finger. Cortical activity (vertex N1-P2 complex) was compared in subjects with low hypnotizability level (N=8, SHSS:0-6) vs. subjects with high hypnotizability level (N=8, SHSS:7-12).

The amplitude of the N1-P2 complex was lower in the High-hypnotizability compared to the Low-hypnotizability group over primary sensorimotor cortex (C3 and C4 electrodes) and centro-parietal midline areas (Cz and Pz electrodes) for non-painful and painful stimuli. The SHSS showed a statistically significant negative correlation with the vertex N1-P2 complex at C3 and Cz ( $r=-0.5$ ,  $p<0.05$ ) electrodes for non-painful stimuli.

Compared to the Low-hypnotizability subjects, High-hypnotizability subjects showed a reduced cortical activity related to non-painful and painful stimuli.

The results suggest a relationship between hypnotizability and cortical activity related to non-painful and painful stimuli in the condition of waking state (no hypnotic effect).

Del Percio C, Triggiani AI, Marzano N, Valenzano A, De Rosas M, Petito A, Bellomo A, Lecce B, Mundi C, Infarinato F, Soricelli A, Limatola C, Cibelli G, Babiloni C.

**Poor desynchronisation of resting-state eyes-open cortical alpha rhythms in obese subjects without eating disorders.**

Clin Neurophysiol. 2013 Feb 21. 2013 Jun;124(6):1095-1105.

Obese subjects without eating disorders were characterised by poor electroencephalographic (EEG) alpha rhythms during resting-state eye-closed condition (Babiloni et al., 2011b). Is this true also for the desynchronisation of alpha rhythms during resting-state eyes opening?

EEG data were recorded in 15 underweight, 20 normal-weight, and 18 overweight/obese subjects during resting-state eyes-closed and -open conditions. EEG sources were estimated by LORETA for alpha 1 (8-10.5 Hz) and alpha 2 (10.5-13 Hz). The alpha desynchronisation was calculated as the difference eyes-open minus -closed condition. The occipital alpha 1 desynchronisation was lower in overweight/obese and underweight subjects compared with normal-weight subjects ( $p < 0.000005$ ). The same was true for parietal, occipital and temporal alpha 2 (10.5-13 Hz) desynchronisation ( $p < 0.000002$ ). The parietal and temporal alpha 1 desynchronisation was lower in overweight/obese than in normal-weight subjects ( $p < 0.00001$ ). These effects spatially matched those observed in the resting-state eyes-closed condition.

Subjects with abnormal weight and normal eating behaviour are characterised by poor alpha desynchronisation during resting-state eyes opening. Obese subjects without eating disorders show abnormal mechanisms of cortical neural synchronisation and desynchronisation of alpha rhythms in the resting state condition.

Ferreri F, Vecchio F, Ponzio D, Pasqualetti P, Rossini PM.

**Time-varying coupling of EEG oscillations predicts excitability fluctuations in the primary motor cortex as reflected by motor evoked potentials amplitude: An EEG-TMS study.**

Hum Brain Mapp. 2013 Jul 19. [Epub ahead of print]

Motor evoked potentials (MEPs) elicited by a train of consecutive, individual transcranial magnetic stimuli demonstrate fluctuations in amplitude with respect to time when recorded from a relaxed muscle. The influence of time-varying, instantaneous modifications of the electroencephalography (EEG) properties immediately preceding the transcranial magnetic stimulation (TMS) has rarely been explored. The aim of this study was to investigate the influence of the pre-TMS motor cortex and related areas EEG profile on time variants of the MEPs amplitude.

MRI-navigated TMS and multichannel TMS-compatible EEG devices were used. For each experimental subject, post-hoc analysis of the MEPs amplitude that was based on the 50th percentile of the MEPs amplitude distribution provided two subgroups corresponding to "high" (large amplitude) and "low" (small amplitude). The pre-stimulus EEG characteristics (coherence and spectral profile) from the motor cortex and related areas were analyzed separately for the "high" and "low" MEPs and were then compared.

On the stimulated hemisphere, EEG coupling was observed more often in the high compared to the low MEP trials. Moreover, a paradigmatic pattern in which TMS was able to lead to significantly larger MEPs was found when the EEG of the stimulated motor cortex was coupled in the beta 2 band with the ipsilateral prefrontal cortex and in the delta band with the bilateral centro-parietal-occipital cortices.

This data provide evidence for a statistically significant influence of time-varying and spatially patterned synchronization of EEG rhythms in determining cortical excitability, namely motor cortex excitability in response to TMS.

Luigetti M, Padua L, Mazza S, Rossini PM, Sabatelli M, Lo Monaco M.

**Clinical-neurophysiological correlations in a series of patients with IgM-related neuropathy.**

Clin Neurophysiol. 2013 Sep;124(9):1899-1903.

We aim to draw clinical-neurophysiological correlations in our cohort of patients affected by IgM-related neuropathy to investigate whether neurophysiological parameters may help differentiate the classical phenotype from atypical forms.

We retrospectively evaluated patients with IgM-related neuropathy referred to our Institute from 1990 to 2011. All patients underwent extensive laboratory, clinical and neurophysiological evaluation.

A classic sensory-ataxic form was observed in 20 of 34 patients, while an atypical phenotype (multiple mononeuropathy, polyneuropathy with predominant motor impairment, painful small-fibre neuropathy) was identified in the remaining 14 cases. Nerve conduction studies revealed in almost all cases a pattern typical of demyelination. A

reduced terminal latency index and a prolonged distal motor latency of median nerve, as well as a prolonged distal motor latency and a reduced motor conduction velocity of peroneal nerve when recorded from extensor digitorum brevis, were significantly associated with classic sensory-ataxic phenotype. Conversely, a compound muscle action potential amplitude reduction of peroneal nerve from the tibialis anterior, was mostly associated with atypical forms.

No clear electrophysiological differences between classical forms and atypical cases can be identified in IgM-related neuropathy. Still, we demonstrated that demyelinating abnormalities are more often associated with classical phenotypes, while axonal impairment occurs more often in atypical clinical patterns.

Performing correlations between clinical and neurophysiological findings in IgM-related neuropathy may help to better understand different disease mechanisms in this heterogeneous form of inflammatory neuropathy.

Sizonenko SV, Babiloni C, de Bruin EA, Isaacs EB, Jönsson LS, Kennedy DO, Latulippe ME, Hasan Mohajeri M, Moreines J, Pietrini P, Walhovd KB, Winwood RJ, Sijben JW.

**Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies?**

Br J Nutr. 2013 Aug;110 Suppl 1:S1-S30.

The present review describes brain imaging technologies that can be used to assess the effects of nutritional interventions in human subjects. Specifically, we summarise the biological relevance of their outcome measures, practical use and feasibility, and recommended use in short- and long-term nutritional studies. The brain imaging technologies described consist of MRI, including diffusion tensor imaging, magnetic resonance spectroscopy and functional MRI, as well as electroencephalography/magnetoencephalography, near-IR spectroscopy, positron emission tomography and single-photon emission computerised tomography. In nutritional interventions and across the lifespan, brain imaging can detect macro- and microstructural, functional, electrophysiological and metabolic changes linked to broader functional outcomes, such as cognition. Imaging markers can be considered as specific for one or several brain processes and as surrogate instrumental endpoints that may provide sensitive measures of short- and long-term effects. For the majority of imaging measures, little information is available regarding their correlation with functional endpoints in healthy subjects; therefore, imaging markers generally cannot replace clinical endpoints that reflect the overall capacity of the brain to behaviourally respond to specific situations and stimuli. The principal added value of brain imaging measures for human nutritional intervention studies is their ability to provide unique in vivo information on the working mechanism of an intervention in hypothesis-driven research. Selection of brain imaging techniques and target markers within a given technique should mainly depend on the hypothesis regarding the mechanism of action of the intervention, level (structural, metabolic or functional) and anticipated timescale of the intervention's effects, target population, availability and costs of the techniques

Sizonenko SV, Babiloni C, Sijben JW, Walhovd KB.

**Brain imaging and human nutrition: which measures to use in intervention studies?**

Adv Nutr. 2013 Sep 1;4(5):554-556.

Throughout the life span, the brain is a metabolically highly active organ that uses a large proportion of total nutrient and energy intake. Furthermore, the development

and repair of neural tissue depend on the proper intake of essential structural nutrients, minerals, and vitamins. Therefore, what we eat, or refrain from eating, may have an important impact on our cognitive ability and mental performance. Two of the key areas in which diet is thought to play an important role are in optimizing neurodevelopment in children and in preventing neurodegeneration and cognitive decline during aging. From early development to aging, brain imaging can detect structural, functional, and metabolic changes in humans and modifications due to altered nutrition or to additional nutritional supplementation. Inclusion of imaging measures in clinical studies can increase understanding with regard to the modification of brain structure, metabolism, and functional endpoints and may provide early sensitive measures of long-term effects. In this symposium, the utility of existing brain imaging technologies to assess the effects of nutritional intervention in humans is described. Examples of current research showing the utility of these markers are reviewed.

Vecchio F, Babiloni C, Lizio R, Fallani Fde V, Blinowska K, Verrienti G, Frisoni G, Rossini PM.

**Resting state cortical EEG rhythms in Alzheimer's disease: toward EEG markers for clinical applications: a review.**

Suppl Clin Neurophysiol. 2013; 62:223-36.

The human brain contains an intricate network of about 100 billion neurons. Aging of the brain is characterized by a combination of synaptic pruning, loss of cortico-cortical connections, and neuronal apoptosis that provoke an age-dependent decline of cognitive functions. Neural/synaptic redundancy and plastic remodeling of brain networking, also secondary to mental and physical training, promote maintenance of brain activity and cognitive status in healthy elderly subjects for everyday life. However, age is the main risk factor for neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) that impact on cognition. Growing evidence supports the idea that AD targets specific and functionally connected neuronal networks and that oscillatory electromagnetic brain activity might be a hallmark of the disease. In this line, digital electroencephalography (EEG) allows noninvasive analysis of cortical neuronal synchronization, as revealed by resting state brain rhythms. This review provides an overview of the studies on resting state eyes-closed EEG rhythms recorded in amnesic mild cognitive impairment (MCI) and AD subjects. Several studies support the idea that spectral markers of these EEG rhythms, such as power density, spectral coherence, and other quantitative features, differ among normal elderly, MCI, and AD subjects, at least at group level. Regarding the classification of these subjects at individual level, the most previous studies showed a moderate accuracy (70-80%) in the classification of EEG markers relative to normal and AD subjects. In conclusion, resting state EEG markers are promising for large-scale, low-cost, fully noninvasive screening of elderly subjects at risk of AD.

Carducci F, Onorati P, Condoluci C, Di Gennaro G, Quarato PP, Pierallini A, Sarà M, Miano S, Cornia R, Albertini G.

**Whole-brain voxel-based morphometry study of children and adolescents with Down syndrome.**

Funct Neurol. 2013 Jan-Mar;28(1):19-28.

In order to investigate alterations in brain morphology and a possible temporal pattern of neuroanatomical abnormalities in the gray matter (GM), white matter (WM) and



cerebrospinal fluid (CSF) of young patients with Down syndrome (DS), high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) voxel-based morphometry (VBM) was performed on 21 children and adolescents with this chromosomal aberration and 27 age-matched participants as controls. In comparison with control subjects, children and adolescents with DS showed not only an overall smaller whole-brain volume, but also volume reductions of the GM in the cerebellum, frontal lobes, frontal region of the limbic lobe, parahippocampal gyri and hippocampi and of the WM in the cerebellum, frontal and parietal lobes, sub-lobar regions and brainstem. By contrast, volume preservation was observed in the GM of the parietal lobes, temporal lobe and sub-lobar regions and in the WM of the temporal lobe and temporal regions of the limbic lobe. A lower volume of CSF was also detected in the frontal lobes. This study is the first to use the high-resolution MRI VBM method to describe a whole-brain pattern of abnormalities in young DS patients falling within such a narrow age range and it provides new information on the neuroanatomically specific regional changes that occur during development in these patients.

Garaci F, Toschi N, Lanzafame S, Meschini A, Bertini E, Simonetti G, Santorelli FM, Guerisi M, Floris R.

**Diffusion tensor imaging in SPG11-and SPG4-linked hereditary spastice paraplegia.**

Int J Neuroscience 2013; early online 1-10.

The aim of this study was to identify potential diagnostic markers of Hereditary Spastic Paraplegia (HSP). We investigated the white matter features of spastic gait (SPG)11- and SPG4-linked HSP, using diffusion tensor imaging performed with a 3-Tesla (3T) scanner. We examined four patients with SPG11 mutations, three with SPG4 mutations, and 26 healthy controls. We obtained maps of fractional anisotropy (FA) and mean diffusivity (MD), which we analyzed through both region of interest -based approach and tract-based spatial statistics (TBSS). Compared with healthy controls, SPG11 patients presented increased MD and decreased FA in the semioval centers, frontal and peritrigonal white matter, posterior limb of the internal capsule, and throughout the corpus callosum. Similar alterations were seen in the SPG4 patients at the levels of the semioval centers, the posterior limb of the internal capsule, the left cerebral pedicle, the genu and trunk of the corpus callosum, and the peritrigonal white matter on the left. No MD or FA alterations were observed in the cerebellar white matter. In a direct comparison, white matter alterations were more pronounced and widespread in HSP-SPG11 than in HSP-SPG4 patients. Joint TBSS analysis of all three groups confirmed significant widespread alterations of FA and MD values in the supratentorial white matter. This noninvasive study documented the presence of altered diffusivity in white matter in both forms of HSP, which could represent an important diagnostic marker of HSP. The association of reduced FA and increased MD in this patient population supports the interpretation of HPG as a neurodegenerative disorder.

Hampel H, Lista S, Teipel SJ, Garaci F, Nisticò R, Blennow K, Zetterberg H, Bertram L, Duyckaerts C, Bakardjian H, Drzezga A, Colliot O, Epelbaum S, Broich K, Lehéricy S, Brice A, Khachaturian ZS, Aisen PS, Dubois B.

**Perspective on future role of biological markers in clinical therapy trials of Alzheimer's Disease: a long-range point of view beyond 2020.**

Biochem Pharmacol. 2013 Nov 22 [Epub ahead of print]

Recent advances in understanding the molecular mechanisms underlying various paths

toward the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) has begun to provide new insight for interventions to modify disease progression. The evolving knowledge gained from multidisciplinary basic research has begun to identify new concepts for treatments and distinct classes of therapeutic targets; as well as putative disease-modifying compounds that are now being tested in clinical trials. There is a mounting consensus that such disease modifying compounds and/or interventions are more likely to be effectively administered as early as possible in the cascade of pathogenic processes preceding and underlying the clinical expression of AD. The budding sentiment is that "treatments" need to be applied before various molecular mechanisms converge into an irreversible pathway leading to morphological, metabolic and functional alterations that characterize the pathophysiology of AD. In light of this, biological indicators of pathophysiological mechanisms are desired to chart and detect AD throughout the asymptomatic early molecular stages into the prodromal and early dementia phase. A major conceptual development in the clinical AD research field was the recent proposal of new diagnostic criteria, which specifically incorporate the use of biomarkers as defining criteria for preclinical stages of AD. This paradigm shift in AD definition, conceptualization, operationalization, detection and diagnosis represents novel fundamental opportunities for the modification of interventional trial designs. This perspective summarizes not only present knowledge regarding biological markers but also unresolved questions on the status of surrogate indicators for detection of the disease in asymptomatic people and diagnosis of AD.

Lista S, Garaci FG, Ewers M, Teipel S, Zetterberg H, Blennow K, Hampel H.

**CSF A 1-42 combined with neuroimaging biomarkers in the early detection, diagnosis and prediction of Alzheimer's disease.**

*Alzheimers Dement.* 2013 Jul 11. [Epub ahead of print]

The development of validated, qualified, and standardized biomarkers for Alzheimer's disease (AD) that allow for an early presymptomatic diagnosis and discrimination (classification) from other types of dementia and neurodegenerative diseases is warranted to accelerate the successful development of novel disease-modifying therapies. Here, we focus on the value of the 42-residue-long amyloid isoform (A 1-42) peptide in the cerebrospinal fluid as the core, feasible neurobiochemical marker for the amyloidogenic mechanisms in early-onset familial and late-onset sporadic AD. We discuss the role and use of A 1-42 in combination with evolving neuroimaging biomarkers in AD detection and diagnosis. Multimodal neuroimaging techniques, directly providing structural-functional-metabolic aspects of brain pathophysiology, are supportive to predict and monitor the progression of the disease. Advances in multimodal neuroimaging provide new insights into brain organization and enable the detection of specific proteins and/or protein aggregates associated with AD. The combination of biomarkers from different methodologies is believed to be of incrementally added risk-value to accurately identify asymptomatic and prodromal individuals who will likely progress to dementia and represent rational biomarker candidates for preventive and symptomatic pharmacological intervention trials.

Lista S, Garaci FG, Toschi N, Hampel H.

**Imaging epigenetics in Alzheimer's Disease.**

*Curr Pharm Des.* 2013;19(36):6393-6415.

Sporadic Alzheimer's disease (AD) is a prevalent, complex and chronically progressive brain disease. Its course is non-linear, dynamic, adaptive to maladaptive, and compensatory to decompensatory, affecting large-scale neural networks through a plethora of mechanistic and signaling pathway alterations that converge into regional and cell type-specific neurodegeneration and, finally, into clinically overt cognitive and behavioral decline. This decline includes reductions in the activities of daily living, quality of life, independence, and life expectancy. Evolving lines of research suggest that epigenetic mechanisms may play a crucial role during AD development and progression. Epigenetics designates molecular mechanisms that alter gene expression without modifications of the genetic code. This topic includes modifications on DNA and histone proteins, the primary elements of chromatin structure. Accumulating evidence has revealed the relevant processes that mediate epigenetic modifications and has begun to elucidate how these processes are apparently dysregulated in AD. This evidence has led to the clarification of the roles of specific classes of therapeutic compounds that affect epigenetic pathways and characteristics of the epigenome. This insight is accompanied by the development of new methods for studying the global patterns of DNA methylation and chromatin alterations. In particular, high-throughput sequencing approaches, such as next-generation DNA sequencing techniques, are beginning to drive the field into the next stage of development. In parallel, genetic imaging is beginning to answer additional questions through its ability to uncover genetic variants, with or without genome-wide significance, that are related to brain structure, function and metabolism, which impact disease risk and fundamental network-based cognitive processes. Neuroimaging measures can further be used to define AD systems and endophenotypes. The integration of genetic neuroimaging methods with epigenetic markers in humans appears promising. This evolving development may lead to a new research discipline - imaging epigenetics - that will provide deeper insight into the causative pathogenetic and pathophysiological pathways through which genes and environment interrelate during life and impact human brain development, physiology, aging and disease. This knowledge may open doors for the development of novel biomarkers and preventive and disease-modifying treatments.

Teipel SJ, Grothe M, Lista S, Toschi N, Garaci FG, Hampel H.

**Relevance of magnetic resonance imaging for early detection and diagnosis of alzheimer disease.**

Med Clin North Am. 2013 5;97(3):399-424.

Hippocampus volumetry currently is the best-established imaging biomarker for AD. However, the effect of multicenter acquisition on measurements of hippocampus volume needs to be explicitly considered when it is applied in large clinical trials, for example by using mixed-effects models to take the clustering of data within centers into account. The marker needs further validation in respect of the underlying neurobiological substrate and potential confounds such as vascular disease, inflammation, hydrocephalus, and alcoholism, and with regard to clinical outcomes such as cognition but also to demographic and socioeconomic outcomes such as mortality and institutionalization. The use of hippocampus volumetry for risk stratification of predementia study samples will further increase with the availability of automated measurement approaches. An important step in this respect will be the development of a standard hippocampus tracing protocol that harmonizes the large range of presently available manual protocols. In the near future, regionally differentiated automated methods will become available toge-

ther with an appropriate statistical model, such as multivariate analysis of deformation fields, or techniques such as cortical-thickness measurements that yield a meaningful metrics for the detection of treatment effects. More advanced imaging protocols, including DTI, DSI, and functional MRI, are presently being used in monocenter and first multicenter studies. In the future these techniques will be relevant for the risk stratification in phase IIa type studies (small proof-of-concept trials). By contrast, the application of the broader established structural imaging biomarkers, such as hippocampus volume, for risk stratification and as surrogate end point is already today part of many clinical trial protocols. However, clinical care will also be affected by these new technologies. Radiologic expert centers already offer “dementia screening” for well-off middle-aged people who undergo an MRI scan with subsequent automated, typically VBM-based analysis, and determination of z-score deviation from a matched control cohort. Next-generation scanner software will likely include radiologic expert systems for automated segmentation, deformation-based morphometry, and multivariate analysis of anatomic MRI scans for the detection of a typical AD pattern. As these developments will start to change medical practice, first for selected subject groups that can afford this type of screening but later eventually also for other cohorts, clinicians must become aware of the potentials and limitations of these technologies. It is decidedly unclear to date how a middle-aged cognitively intact subject with a seemingly AD-positive MRI scan should be clinically advised. There is no evidence for individual risk prediction and even less for specific treatments. Thus, the development of preclinical diagnostic imaging poses not only technical but also ethical problems that must be critically discussed on the basis of profound knowledge. From a neurobiological point of view, the main determinants of cognitive impairment in AD are the density of synapses and neurons in distributed cortical and subcortical networks. MRI-based measures of regional gray matter volume and associated multivariate analysis techniques of regional interactions of gray matter densities provide insight into the onset and temporal dynamics of cortical atrophy as a close proxy for regional neuronal loss and a basis of functional impairment in specific neuronal networks. From the clinical point of view, clinicians must bear in mind that patients do not suffer from hippocampus atrophy or disconnection but from memory impairment, and that dementia screening in asymptomatic subjects should not be used outside of clinical studies.

Accoto D, Francomano MT, Rainer A, Trombetta M, Rossini PM, Guglielmelli E.

**An implantable neural interface with electromagnetic stimulation capabilities.**

Med Hypotheses. 2013 Aug;81(2):322-327.

Invasive interfaces with the Peripheral Nervous System (PNS), which currently rely on electric means for both nerves stimulation and signals recording, are needed in a number of applications, including prosthetics and assistive technologies. Recent studies showed that the quality of the signal-to-noise ratio of the afferent channel might be negatively affected by physiological reactions, including fibrosis. In this paper we propose a novel approach to the development of implantable neural interfaces, where the PNS is excited electromagnetically and in situ, while electrical means are used only for neural signals recording. Electromagnetic (EM) waves, capable of overcoming fibrotic capsules, are generated by microfabricated coils. Stimulation coils and registration electrodes are deposited on the same flexible substrate, also provided with a bio-absorbable coating, which releases anti-fibrotic drugs and neurons-specific functionalized magnetic nanoparticles (NPs). The NPs are intended to improve the capability of local EM waves to

elicit membranes depolarization, thus enhancing selectivity. This paper details the concept of the proposed technology and provides a preliminary in silico feasibility study.

Babiloni C, Lizio R, Del Percio C, Marzano N, Soricelli A, Salvatore E, Ferri R, Cosentino FI, Tedeschi G, Montella P, Marino S, De Salvo S, Rodriguez G, Nobili F, Vernieri F, Ursini F, Mundi C, Richardson JC, Frisoni GB, Rossini PM.

**Cortical sources of resting state EEG rhythms are sensitive to the progression of Alzheimer's disease at early stage.**

J Alzheimers Dis. 2013 Jan 1;34(4):1015-1035.

Cortical sources of resting state electroencephalographic (EEG) rhythms are abnormal in subjects with Alzheimer's disease (AD). Here we tested the hypothesis that these sources are also sensitive to the progression of early stage AD over the course of one year. The resting state eyes-closed EEG data were recorded in 88 mild AD patients at baseline (Mini Mental State Evaluation, MMSE I =  $21.7 \pm 0.2$  standard error, SE) and at approximately one-year follow up (13.3 months  $\pm 0.5$  SE; MMSE II =  $20 \pm 0.4$  SE). All patients received standard therapy with acetylcholinesterase inhibitors. EEG recordings were also performed in 35 normal elderly (Nold) subjects as controls. EEG rhythms of interest were delta (2-4 Hz), theta (4-8 Hz), alpha 1 (8-10.5 Hz), alpha 2 (10.5-13 Hz), beta 1 (13-20 Hz), beta 2 (20-30 Hz), and gamma (30-40 Hz). Cortical EEG sources were estimated by low-resolution brain electromagnetic tomography (LORETA). Compared to the Nold subjects, the mild AD patients were characterized by a power increase of widespread delta sources and by a power decrease of posterior alpha sources. In the mild AD patients, the follow-up EEG recordings showed increased power of widespread delta sources as well as decreased power of widespread alpha and posterior beta 1 sources. These results suggest that the resting state EEG sources were sensitive, at least at group level, to the cognitive decline occurring in the mild AD group over a one-year period, and might represent cost-effective and non-invasive markers with which to enrich cohorts of AD patients that decline faster for clinical studies.

Bucossi S, Polimanti R, Ventriglia M, Mariani S, Siotto M, Ursini F, Trotta L, Scrascia F, Callea A, Vernieri F, Squitti R.

**Intronic rs2147363 variant in ATP7B transcription factor-binding site associated with Alzheimer's disease.**

J Alzheimers Dis. 2013;37(2):453-459.

Copper homeostasis abnormalities have been shown to be associated with Alzheimer's disease (AD), possibly by accelerating amyloid- toxicity and plaque formation. The ATP7B gene plays a key role in controlling body copper balance. Our previous studies showed an association between ATP7B variants and AD risk. Among these variants, an intronic single nucleotide polymorphism, rs2147363, was associated with AD risk. In order to understand this intronic association, we screened a population of 286 AD patients and 283 healthy controls, and verified the presence of other functional coding variants in linkage disequilibrium (LD). Then we searched for a regulatory function region close to rs2147363. An LD analysis revealed the presence of an LD between rs2147363 and a Wilson's disease-causing variant, rs7334118. However, this mutation did not explain the observed genetic association. Conversely, in silico analyses of rs2147363 functionality highlighted that this variant is located in a binding site of a transcription factor, and is, consequently, associated with regulatory function. These data suggest that the genetic

variation in cis-regulatory elements located in non-coding regions can have a role in determining ATP7B functionality and account for some of the AD missing heritability. Caliandro P, Silvestri G, Padua L, Bianchi ML, Simbolotti C, Russo G, Masciullo M, Rosini PM.

fNIRS evaluation during a phonemic verbal task reveals prefrontal hypometabolism in patients affected by myotonic dystrophy type 1.

Clin Neurophysiol. 2013 Nov;124(11):2269-2276.

Myotonic dystrophy type 1 (DM1), the most common muscular dystrophy in adults, is characterized by a multisystem involvement. Cognitive involvement predominantly affecting fronto-temporal functions is an established clinical feature in this disorder. Brain imaging and metabolic studies showed a predominant involvement of fronto-temporal regions in DM1 patients, yet correlation studies among these findings and neuropsychological data gave contrasting results. In order to contribute to clarify the relationship between the metabolic changes documented in the frontal cortex of DM1 patients and a related cognitive task, we applied the functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) during the execution of a phonemic verbal fluency task (pVFT). We enrolled 29 consecutive right-handed DM1 patients and 30 controls. A 2-channel fNIRS imaging system was used to investigate changes in oxygenated [O<sub>2</sub>Hb] and deoxygenated [HHb] hemoglobin concentrations in the prefrontal cortex (PFC) during a pVFT. [O<sub>2</sub>Hb] and [HHb] baseline-corrected activation values were calculated (respectively [O<sub>2</sub>Hb]<sub>c</sub> and [HHb]<sub>c</sub>). In the control group [O<sub>2</sub>Hb] significantly increased and [HHb] significantly decreased during the pVFT, in the DM1 group no significant variation was found for both parameters revealing no activation of both PFCs during the task. On the other hand, in the DM1 sample, statistical analysis revealed a direct correlation between [O<sub>2</sub>Hb]<sub>c</sub> of the left PFC and the pVFT score, while no correlation was observed in the control group. Our study reveals that DM1 patients show prefrontal hypometabolism during a specific frontal cognitive task compared to controls. Moreover the rapid temporal discrimination of fNIRS allows revealing the correlation between the PFC hypometabolism and the cognitive performance in DM1 patients. fNIRS can be helpful to understand the functional correlates of the frontal cognitive impairment in DM1.

Deguil J, Ravasi L, Auffret A, Babiloni C, Bartres Faz D, Bragulat V, Cassé-Perrot C, Colavito V, Herrero Ezquerro MT, Lamberty Y, Lanteaume L, Pemberton D, Pifferi F, Richardson J, Schenker E, Tarragon E, Bordet R.

**Evaluation of symptomatic drug effects in Alzheimer's disease: strategies for prediction of efficacy in humans.**

Drug Discovery Today: Technologies. 2013 9;10(3):e329-342.

In chronic diseases such as Alzheimer's disease (AD), the arsenal of biomarkers available to determine the effectiveness of symptomatic treatment is very limited. Interpretation of the results provided in literature is cumbersome and it becomes difficult to predict their standardization to a larger patient population. Indeed, cognitive assessment alone does not appear to have sufficient predictive value of drug efficacy in early clinical development of AD treatment. In recent years, research has contributed to the emergence of new tools to assess brain activity relying on innovative technologies of imaging and electrophysiology. However, the relevance of the use of these newer markers in treatment response assessment is waiting for validation. This review shows how the early clinical assessment of symptomatic drugs could benefit from the inclusion of suitable pharmacodynamic markers. This review also emphasizes the importance of re-evaluating a step-by-step strategy in drug development.

Ferreri F, Ponzo D, Vollero L, Guerra A, Di Pino G, Petrichella S, Benvenuto A, Tombini M, Rossini L, Denaro L, Micera S, Iannello G, Guglielmelli E, Denaro V, Rossini PM.

**Does an intraneural interface short-term implant for robotic hand control modulate sensorimotor cortical integration? An EEG-TMS co-registration study on a human amputee.**

Restor Neurol Neurosci. 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]

Following limb amputation, central and peripheral nervous system relays partially maintain their functions and can be exploited for interfacing prostheses. The aim of this study is to investigate, for the first time by means of an EEG-TMS co-registration study, whether and how direct bidirectional connection between brain and hand prosthesis impacts on sensorimotor cortical topography. Within an experimental protocol for robotic hand control, a 26 years-old, left-hand amputated male was selected to have implanted four intrafascicular electrodes (tf-LIFE-4) in the median and ulnar nerves of the stump for 4 weeks. Before tf-LIFE-4s implant (T0) and after the training period, once electrodes have been removed (T1), experimental subject's cortico-cortical excitability, connectivity and plasticity were tested via a neuronavigated EEG-TMS experiment. The statistical analysis clearly demonstrated a significant modulation (with t-test  $p < 0.0001$ ) of EEG activity between 30 and 100 ms post-stimulus for the stimulation of the right hemisphere. When studying individual latencies in that time range, a global amplitude modulation was found in most of the TMS-evoked potentials; particularly, the GEE analysis showed significant differences between T0 and T1 condition at 30 ms ( $p < 0.0404$ ), 46 ms ( $p < 0.0001$ ) and 60 ms ( $p < 0.007$ ) latencies. Finally, also a clear local decrement in N46 amplitude over C4 was evident. No differences between conditions were observed for the stimulation of the left hemisphere. The results of this study confirm the hypothesis that bidirectional neural interface could redirect cortical areas -deprived of their original input/output functions- toward restorative neuroplasticity. This reorganization strongly involves bi-hemispheric networks and intracortical and transcortical modulation of GABAergic inhibition.

Ferreri F, Rossini PM.

**TMS and TMS-EEG techniques in the study of the excitability, connectivity, and plasticity of the human motor cortex.**

Rev Neurosci. 2013;24(4):431-442.

Increasing evidence supports the notion that brain plasticity involves distinct functional and structural components, each entailing a number of cellular mechanisms operating at different time scales, synaptic loci, and developmental phases within an extremely complex framework. However, the exact relationship between functional and structural components of brain plasticity/connectivity phenomena is still unclear and its explanation is a major challenge within modern neuroscience. Transcranial magnetic stimulation (TMS), with or without electroencephalography (EEG), is a sensitive and objective measure of the effect of different kinds of noninvasive manipulation of the brain's activity, particularly of the motor cortex. Moreover, the key feature of TMS and TMS-EEG coregistration is their crucial role in tracking temporal dynamics and inner hierarchies of brain functional and effective connectivities, possibly clarifying some essential issues underlying brain plasticity. All together, the findings presented here are significant for the adoption of the TMS and TMS-EEG coregistration techniques as a tool for basic neurophysiologic research and, in the future, even for clinical diagnostics purposes.

Frisoni GB, Bocchetta M, Chételat G, Rabinovici GD, de Leon MJ, Kaye J, Reiman EM, Scheltens P, Barkhof F, Black SE, Brooks DJ, Carrillo MC, Fox NC, Herholz K, Nordberg A, Jack CR Jr, Jagust WJ, Johnson KA, Rowe CC, Sperling RA, Thies W, Wahlund LO, Weiner MW, Pasqualetti P, Decarli C; For ISTAART's NeuroImaging Professional Interest Area.

**Imaging markers for Alzheimer disease: which vs how.**

Neurology. 2013 Jul 30;81(5):487-500.

Revised diagnostic criteria for Alzheimer disease (AD) acknowledge a key role of imaging biomarkers for early diagnosis. Diagnostic accuracy depends on which marker (i.e., amyloid imaging, <sup>1</sup>F-fluorodeoxyglucose [FDG]-PET, SPECT, MRI) as well as how it is measured ("metric": visual, manual, semiautomated, or automated segmentation/computation). We evaluated diagnostic accuracy of marker vs metric in separating AD from healthy and prognostic accuracy to predict progression in mild cognitive impairment. The outcome measure was positive (negative) likelihood ratio, LR+ (LR-), defined as the ratio between the probability of positive (negative) test outcome in patients and the probability of positive (negative) test outcome in healthy controls. Diagnostic LR+ of markers was between 4.4 and 9.4 and LR- between 0.25 and 0.08, whereas prognostic LR+ and LR- were between 1.7 and 7.5, and 0.50 and 0.11, respectively. Within metrics, LRs varied up to 100-fold: LR+ from approximately 1 to 100; LR- from approximately 1.00 to 0.01. Markers accounted for 11% and 18% of diagnostic and prognostic variance of LR+ and 16% and 24% of LR-. Across all markers, metrics accounted for an equal or larger amount of variance than markers: 13% and 62% of diagnostic and prognostic variance of LR+, and 29% and 18% of LR-. Within markers, the largest proportion of diagnostic LR+ and LR- variability was within <sup>1</sup>F-FDG-PET and MRI metrics, respectively. Diagnostic and prognostic accuracy of imaging AD biomarkers is at least as dependent on how the biomarker is measured as on the biomarker itself. Standard operating procedures are key to biomarker use in the clinical routine and drug trials.

Giambattistelli F, Tomasevic L, Pellegrino G, Porcaro C, Melgari JM, Rossini PM, Tecchio F.

**The spontaneous fluctuation of the excitability of a single node modulates the internodes connectivity: a TMS-EEG study.**

Hum Brain Mapp. 2013 May 14. [Epub ahead of print]

Brain effective connectivity can be tracked by cerebral recruitments evoked by transcranial magnetic stimulation (TMS), as measured by simultaneous electroencephalography (TMS-EEG). When TMS is targeting the primary motor area, motor evoked potentials (MEPs) can be collected from the "target" muscles. The aim of this study was to measure whether or not effective brain connectivity changes with the excitability level of the corticospinal motor pathway (CSMP) as parameterized by MEP amplitude. After averaging two subgroups of EEG-evoked responses corresponding to high and low MEP amplitudes, we calculated the individual differences between them and submitted the grand average to sLORETA algorithm obtaining localized regions of interest (Rols). Statistical differences of Rol recruitment strength between low and high CSMP excitation was assessed in single subjects. Preceding the feedback arrival, neural recruitment for stronger CSMP activation were weaker at 6-10 ms of homotopic sensorimotor areas BA3/4/5 of the right nonstimulated hemisphere (trend), weaker at 18-25 ms of left parietal BA2/3/40, and stronger at 26-32 ms of bilateral frontal motor areas BA6/8. The



proposed method enables the tracking of brain network connectivity during stimulation of one node by measuring the strength of the connected recruited node activations. Spontaneous increases of the excitation of the node originating the transmission within the hand control network gave rise to dynamic recruitment patterns with opposite behaviors, weaker in homotopic and parietal circuits, stronger in frontal ones. The effective connectivity within bilateral circuits orchestrating hand control appeared dynamically modulated in time even in resting state as probed by TMS.

Gorgoni M, D'Atri A, Lauri G, Rossini PM, Ferlazzo F, De Gennaro L.

**Is sleep essential for neural plasticity in humans, and how does it affect motor and cognitive recovery?**

Neural Plast. 2013;2013. Epub 2013 Jun 11.

There is a general consensus that sleep is strictly linked to memory, learning, and, in general, to the mechanisms of neural plasticity, and that this link may directly affect recovery processes. In fact, a coherent pattern of empirical findings points to beneficial effect of sleep on learning and plastic processes, and changes in synaptic plasticity during wakefulness induce coherent modifications in EEG slow wave cortical topography during subsequent sleep. However, the specific nature of the relation between sleep and synaptic plasticity is not clear yet. We reported findings in line with two models conflicting with respect to the underlying mechanisms, that is, the "synaptic homeostasis hypothesis" and the "consolidation" hypothesis, and some recent results that may reconcile them. Independently from the specific mechanisms involved, sleep loss is associated with detrimental effects on plastic processes at a molecular and electrophysiological level. Finally, we reviewed growing evidence supporting the notion that plasticity-dependent recovery could be improved managing sleep quality, while monitoring EEG during sleep may help to explain how specific rehabilitative paradigms work. We conclude that a better understanding of the sleep-plasticity link could be crucial from a rehabilitative point of view.

Guerra A, Curcio G, Pasqualetti P, Bressi F, Petrichella S, Scrascia F, Ponzo D, Ferilli M, Vernieri F, Rossini PM, Ferreri F.

**Unilateral cortical hyperexcitability in congenital hydrocephalus: a TMS study.**

Neurocase. 2013 May 17. [Epub ahead of print]

Changes in cortical excitability are considered to play an important role in promoting brain plasticity both in healthy people and in neurological diseases. Hydrocephalus is a brain development disorder related to an excessive accumulation of cerebrospinal fluid (CSF) in the ventricular system. The functional relevance of cortical structural changes described in this disease is largely unexplored in human. We investigated cortical excitability using multimodal transcranial magnetic stimulation (TMS) in a case of congenital hydrocephalus with almost no neurological signs. A caucasian 40 years old, ambidextrous and multilingual woman affected by occult spina bifida and congenital symmetrical hydrocephalus underwent a TMS study. The intracortical and interhemispheric paired pulse paradigms were used, together with the mapping technique. No significant differences were found in the resting motor thresholds between the two hemispheres. Instead, the intracortical excitability curves were statistically different between the two hemispheres (with short intracortical inhibition (SICI) being strongly reduced and intracortical facilitation (ICF) enhanced in the right one), and the interhemispheric curves showed a general hyper-exci-

tability on the right hemisphere (when conditioned by the left one) and a general hypo-excitability in the left hemisphere (when conditioned by the right one). It is noteworthy that an asymmetric right hemisphere (RH) change of excitability was observed by means of mapping technique. We hypothesize that in this ambidextrous subject, the observed RH hyper-excitability could represent a mechanism of plasticity to preserve functionality of specific brain areas possibly devoted to some special skills, such as multilingualism.

Jacobi H, Reetz K, du Montcel ST, Bauer P, Mariotti C, Nanetti L, Rakowicz M, Sulek A, Durr A, Charles P, Filla A, Antenora A, Schöls L, Schicks J, Infante J, Kang JS, Timmann D, Fabio RD, Masciullo M, Baliko L, Bela M, Boesch S, Bürk K, Peltz A, Schulz JB, Dufaure-Garé I, Klockgether T.

**Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data.**

Lancet Neurol. 2013 Jul;12(7):650-658.

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are autosomal, dominantly inherited, fully penetrant neurodegenerative diseases. Our aim was to study the preclinical stage of the most common SCAs: SCA1, SCA2, SCA3, and SCA6.

Between Sept 13, 2008, and Dec 1, 2011, offspring or siblings of patients with SCA1, SCA2, SCA3, or SCA6 were enrolled into a prospective, longitudinal observational study at 14 European centres. To be eligible for inclusion in our study, individuals had to have no ataxia and be aged 18-50 years if directly related to individuals with SCA1, SCA2, or SCA3, or 35-70 years if directly related to individuals with SCA6. We did anonymous genetic testing to identify mutation carriers. We assessed participants with clinical scales, questionnaires, and performance-based coordination tests. In eight of the 14 centres, participants underwent MRI. We analysed relations between outcome variables and time from onset (defined as the difference between present age and estimated age at ataxia onset). This study is registered with ClinicalTrials.gov, number NCT01037777.

276 participants met inclusion criteria and agreed to participate, of whom 12 (4%) were excluded from final analysis because DNA samples were missing or genotyping failed. Estimated time from onset was -9 years (IQR -13 to -6) in 50 carriers of the SCA1 mutation, -12 years (-15 to -9) in 31 SCA2 mutation carriers, -8 years (-11 to -6) in 26 SCA3 mutation carriers, and -18 years (-22 to -16) in 16 SCA6 mutation carriers. Compared with non-carriers of each mutation, SCA1 mutation carriers had higher median scores on the scale for the assessment and rating of ataxia (SARA; 0.5 [IQR 0-1.0] vs 0 [0-0];  $p=0.0052$ ), as did SCA2 mutation carriers (0.5 [0-2.0] vs 0 [0-0.5];  $p=0.0037$ ). SCA2 mutation carriers had lower SCA functional index scores than did non-carriers (-0.43 [-0.91 to -0.07] vs 0.09 [-0.30 to 0.56];  $p=0.0007$ ). SCA2 mutation carriers had worse composite cerebellar functional scores than did their non-carrier counterparts (0.915 [0.861-0.959] vs 0.849 [0.764-0.886];  $p=0.0039$ ). All other differences between carriers and non-carriers were non-significant. In SCA1 and SCA2 mutation carriers, SARA scores were increased in participants who were closer to the estimated age at onset (SCA1:  $r=0.36$ ,  $p=0.0112$ ; SCA2:  $r=0.50$ ,  $p=0.0038$ ). 83 individuals (30%) underwent MRI. Voxel-based morphometry showed grey-matter loss in the brainstem and cerebellum in SCA1 and SCA2 mutation carriers, and normalised brainstem volume was lower in SCA2 mutation carriers (median 0.015, range 0.012-0.016) than in non-carriers (0.019, 0.017-0.021;  $p=0.0107$ ).

Preclinical SCA1 and SCA2 mutation carriers seem to have mild coordination deficits and abnormalities in the brain that are more common in carriers who are closer to the

estimated onset of ataxia. Individuals in this early disease stage could be targeted in future preventive trials.

Masciullo M, Iannaccone E, Bianchi ML, Santoro M, Conte G, Modoni A, Monforte M, Tasca G, Laschena F, Ricci E, Silvestri G.

**Myotonic dystrophy type 1 and de novo FSHD mutation double trouble: A clinical and muscle MRI study.**

Neuromuscul Disord. 2013 May;23(5):427-431.

Here we describe the first case of myotonic dystrophy type 1 (DM1) associated with facio-scapulo-humeral dystrophy (FSHD). From a clinical point of view, the patient displayed a pattern of muscle involvement reminiscent of both disorders, including hand-grip myotonia, facial, axial and distal limbs muscle weakness as well as a bilateral winged scapula associated with atrophy of the pectoralis major muscle and lumbar lordosis; pelvic muscles were mostly spared. An extensive muscle MRI assessment including neck, shoulder, abdominal, pelvic and lower limb muscles documented radiological features typical of DM1 and FSDH. Molecular genetic studies confirmed that the proband carried both a pathologically expanded DMPK allele, inherited from his father, and a de novo shortened D4Z4 repeat fragment at 4q35 locus.

Melgari JM, Zappasodi F, Porcaro C, Tomasevic L, Cassetta E, Rossini PM, Tecchio F.

**Movement-induced uncoupling of primary sensory and motor areas in focal task-specific hand dystonia.**

Neuroscience. 2013 Oct 10;250:434-445.

Due to growing evidence of sensorimotor integration impairment in focal task-specific hand dystonia, we aimed at describing primary sensory (S1) and primary motor (M1) cortex source activities and their functional cross-talk during a non-dystonia-inducing sensorimotor task free of biases generated by the interfering with the occurrence of dystonic movements. Magnetoencephalographic brain signals and opponens pollicis (OP) electromyographic activities were acquired at rest and during a simple isometric contraction performed either alone or in combination with median nerve stimulation. The task was performed separately with the right and left hand by eight patients suffering from focal task-specific hand dystonia and by eight healthy volunteers. Through an ad hoc procedure Functional Source Separation (FSS), distinct sources were identified in S1 (FSS1) and M1 (FSM1) devoted to hand control. Spectral properties and functional coupling (coherence) between the two sources were assessed in alpha [8,13]Hz, beta [14,32]Hz and gamma [33,45]Hz frequency bands. No differences were found between spectral properties of patients and controls for either FSM1 or FSS1 cerebral sources. Functional coupling between FSM1 and FSS1 (gamma band coherence), while comparable between dystonic patients and healthy controls at rest, was selectively reduced in patients during movement. All findings were present in both hemispheres. Because previous literature has shown that gamma-band sensory-motor synchronization reflects an efficiency index of sensory-motor integration, our data demonstrate that, in dystonic patients, uncoupling replaces the functional coupling required for efficient sensory-motor control during motor exertion. The presence of bi-hemispheric abnormalities in unilateral hand dystonia supports the presence of an endophenotypic trait.

Piacentini S, Polimanti R, Simonelli I, Donno S, Pasqualetti P, Manfellotto D, Fuciarelli M.

## **Glutathione S-transferase polymorphisms, asthma susceptibility and confounding variables: a meta-analysis.**

Mol Biol Rep. 2013 Apr;40(4):3299-3313. Epub 2013 Jan 10.

Oxidative stress is one of the main risk factors for asthma development. Glutathione S-transferases play an important role in antioxidant defences and may influence asthma susceptibility. In particular, GSTM1 and GSTT1 positive/null genotypes and the GSTP1 Ile105 Val polymorphism have been analyzed in a number of genetic association studies, with conflicting outcomes. Two previous meta-analyses have attempted to clarify the associations between GST genes and asthma, but these studies have also showed contrasting results. Our aim was to perform a meta-analysis that included independent genetic association studies on GSTM1, GSTP1, and GSTT1, evaluating also the effect of potential confounding variables (i.e. ethnicity, population age, and urbanization). Systematic review and meta-analysis of the effects of GST genes on asthma were conducted. The meta-analyses were performed using a fixed or, where appropriate, random effects model. The meta-analysis of the GSTM1 (n = 35), GSTT1 (n = 31) and GSTP1 (n = 28) studies suggests that no significant associations with asthma susceptibility were observed for GSTM1 and GSTP1 gene polymorphisms, whereas a significant outcome was detected for the GSTT1 positive/null genotype (pooled OR = 1.33, 95 %CI = 1.10-1.60). However, high between-study heterogeneity was identified in all the general analyses ( $p$  heterogeneity < 0.05). The stratification analysis seems to explain the heterogeneity only in few cases. This picture is probably due to the interactive process of genetics and environment that characterizes disease pathogenesis. Further studies on interactions of GST genes with the potential oxidative stress sources and with other antioxidant genes are needed to explain the role of GST enzymes in asthma.

## **Porcaro C, Coppola G, Pierelli F, Seri S, Di Lorenzo G, Tomasevic L, Salustri C, Tecchio F. Multiple frequency functional connectivity in the hand somatosensory network: an EEG study.**

Clin Neurophysiol. 2013 Jun;124(6):1216-1224.

The aim of the study is to investigate the dynamics of communication within the primary somatosensory neuronal network.

Multichannel EEG responses evoked by median nerve stimulation were recorded from six healthy participants. We investigated the directional connectivity of the evoked responses by assessing the Partial Directed Coherence (PDC) among five neuronal nodes (brainstem, thalamus and three in the primary sensorimotor cortex), which had been identified by using the Functional Source Separation (FSS) algorithm. We analyzed directional connectivity separately in the low (1-200 Hz, LF) and high (450-750 Hz, HF) frequency ranges.

LF forward connectivity showed peaks at 16, 20, 30 and 50 ms post-stimulus. An estimate of the strength of connectivity was modulated by feedback involving cortical and subcortical nodes. In HF, forward connectivity showed peaks at 20, 30 and 50 ms, with no apparent feedback-related strength changes.

In this first non-invasive study in humans, we documented directional connectivity across subcortical and cortical somatosensory pathway, discriminating transmission properties within LF and HF ranges.

The combined use of FSS and PDC in a simple protocol such as median nerve stimulation sheds light on how high and low frequency components of the somatosensory

evoked response are functionally interrelated in sustaining somatosensory perception in healthy individuals. Thus, these components may potentially be explored as biomarkers of pathological conditions.

Rahman A, Languille S, Lamberty Y, Babiloni C, Perret M, Bordet R, Blin OJ, Jacob T, Auffret A, Schenker E, Richardson J, Pifferi F, Aujard F.

**Sleep deprivation impairs spatial retrieval but not spatial learning in the non-human primate grey mouse lemur.**

PLoS One. 2013 May 22;8(5):e64493.

A bulk of studies in rodents and humans suggest that sleep facilitates different phases of learning and memory process, while sleep deprivation (SD) impairs these processes. Here we tested the hypothesis that SD could alter spatial learning and memory processing in a non-human primate, the grey mouse lemur (*Microcebus murinus*), which is an interesting model of aging and Alzheimer's disease (AD). Two sets of experiments were performed. In a first set of experiments, we investigated the effects of SD on spatial learning and memory retrieval after one day of training in a circular platform task. Eleven male mouse lemurs aged between 2 to 3 years were tested in three different conditions: without SD as a baseline reference, 8 h of SD before the training and 8 h of SD before the testing. The SD was confirmed by electroencephalographic recordings. Results showed no effect of SD on learning when SD was applied before the training. When the SD was applied before the testing, it induced an increase of the amount of errors and of the latency prior to reach the target. In a second set of experiments, we tested the effect of 8 h of SD on spatial memory retrieval after 3 days of training. Twenty male mouse lemurs aged between 2 to 3 years were tested in this set of experiments. In this condition, the SD did not affect memory retrieval. This is the first study that documents the disruptive effects of the SD on spatial memory retrieval in this primate which may serve as a new validated challenge to investigate the effects of new compounds along physiological and pathological aging.

Sabatelli M, Moncada A, Conte A, Lattante S, Marangi G, Luigetti M, Lucchini M, Mirabella M, Romano A, Del Grande A, Bisogni G, Niccolo' Doronzio P, Rossini PM, Zollino M.

**Mutations in the 3' untranslated region of FUS causing FUS overexpression are associated with amyotrophic lateral sclerosis.**

Hum Mol Genet. 2013 Dec 1;22(23):4748-4755.

Mutations in the gene encoding fused-in-sarcoma (FUS) have been identified in a subset of patients with sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS). Variants in the 3' untranslated region (3'UTR) of FUS have also been reported in ALS patients, but their pathogenic role has not been assessed. We sequenced the whole 3'UTR of FUS in 420 ALS patients who were negative for mutations in the currently known ALS genes and in 480 ethnically matched controls. We detected four 3'UTR variants (c.\*48 G>A, c.\*59 G>A, c.\*108 C>T and c.\*110 G>A) in four sporadic and in one familial ALS patients compared with none in controls ( $P = 0.02$ ). We investigated whether these variants impaired FUS expression in primary fibroblast cultures from three patients harbouring the c.\*59 G>A, c.\*108 C>T and c.\*110 G>A variants, respectively. The pattern of FUS expression was also investigated in fibroblasts from one ALS patient with FUS R521C mutation, in two ALS patients without mutations in the known ALS genes and in four control indivi-

duals. By immunostaining and immunoblotting, large amounts of FUS were observed in both the cytoplasm and nuclei of mutant 3'UTR FUS fibroblasts. In FUS R521C mutant fibroblasts, we observed a slight increase of FUS in the cytoplasm associated with a remarkable loss of detection in nuclei. Our findings show that mutations in 3'UTR of FUS are overrepresented in ALS patients and result into translation de-regulation of FUS. Overexpression and mislocalization of wild-type FUS likely contribute to ALS pathogenesis in these cases.

Santoro M, Masciullo M, Bonvissuto D, Bianchi ML, Michetti F, Silvestri G.

**Alternative splicing of human insulin receptor gene (INSR) in type I and type II skeletal muscle fibers of patients with myotonic dystrophy type 1 and type 2.**

Mol Cell Biochem. 2013 Aug;380(1-2):259-265. Epub 2013 May 11.

INSR, one of those genes aberrantly expressed in myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) due to a toxic RNA effect, encodes for the insulin receptor (IR). Its expression is regulated by alternative splicing generating two isoforms: IR-A, which predominates in embryonic tissue, and IR-B, which is highly expressed in adult, insulin-responsive tissues (skeletal muscle, liver, and adipose tissue). The aberrant INSR expression detected in DM1 and DM2 muscles tissues, characterized by a relative increase of IR-A versus IR-B, was pathogenically related to the insulin resistance occurring in DM patients. To assess if differences in the aberrant splicing of INSR could underlie the distinct fiber type involvement observed in DM1 and DM2 muscle tissues, we have used laser capture microdissection (LCM) and RT-PCR, comparing the alternative splicing of INSR in type I and type II muscle fibers isolated from muscle biopsies of DM1, DM2 patients and controls. In the controls, the relative amounts of IR-A and IR-B showed no obvious differences between type I and type II fibers, as in the whole muscle tissue. In DM1 and DM2 patients, both fiber types showed a similar, relative increase of IR-A versus IR-B, as also evident in the whole muscle tissue. Our data suggest that the distinct fiber type involvement in DM1 and DM2 muscle tissues would not be related to qualitative differences in the expression of INSR. LCM can represent a powerful tool to give a better understanding of the pathogenesis of myotonic dystrophies, as well as other myopathies.

Santoro M, Piacentini R, Masciullo M, Bianchi ML, Modoni A, Podda MV, Ricci E, Silvestri G, Grassi C.

**Alternative splicing alterations of Ca(2+) handling genes are associated with Ca(2+) signal dysregulation in DM1 and DM2 myotubes.**

Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 Jul 29. [Epub ahead of print]

The pathogenesis of myotonic dystrophy type 1 (DM1) and type 2 (DM2) has been related to the aberrant splicing of several genes, including those encoding for ryanodine receptor 1 (RYR1), sarcoplasmic/endoplasmic Ca<sup>2+</sup> -ATPase (SERCA) and 1S subunit of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels (Cav 1.1). The aim of this study is to determine whether alterations of these genes are associated with changes in the regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis and signaling.

We analyzed the expression of RYR1, SERCA and Cav 1.1 and the intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in cultured myotubes isolated from DM1, DM2 and control muscle biopsies by semi-quantitative RT-PCR and confocal Ca<sup>2+</sup> imaging respectively.

The results show that: i) The alternative splicing of RYR1, SERCA and Cav 1.1 was more

severely affected in DM1 than in DM2 myotubes; ii) DM1 myotubes exhibited higher resting intracellular Ca<sup>2+</sup> levels than DM2; iii) the amplitude of intracellular Ca<sup>2+</sup> transients induced by sustained membrane depolarization was higher in DM1 myotubes than in controls, whereas DM2 showed opposite behaviour; iv) in both DM myotubes, Ca<sup>2+</sup> release from sarcoplasmic reticulum through RYR1 was lower than in controls. The aberrant splicing of RYR1, SERCA1 and Cav 1.1 may alter intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in DM1 and DM2 myotubes. The differing dysregulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> handling in DM1 and DM2 may explain their distinct sarcolemmal hyperexcitabilities.

Scrascia F, Curcio G, Ursini F, Trotta L, Quintiliani L, Migliore S, Altamura C, Pitocco F, Altavilla R, Melgari JM, Quattrocchi CC, Vernieri F.

**Relationship among diffusion tensor imaging, EEG Activity, and cognitive status in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease patients.**

J Alzheimers Dis. 2013 Oct 10. [Epub ahead of print]

Magnetic resonance (MR) diffusion tensor imaging (DTI) can detect microstructural alterations by means of fractional anisotropy (FA) in patients with dementia, also in relation to cognitive status. The present study aimed at investigating the possible relation among white matter damage in DTI, quantitative electroencephalography (EEG) spectral power, and cognitive status in Alzheimer's disease (AD) and mild cognitive impairment (MCI) patients. Forty-seven subjects (8 moderate AD, 18 mild AD, 12 MCI, and 9 healthy controls) underwent brain MR, neuropsychological evaluation, and resting EEG recording. A progressive increase of EEG delta and theta spectral power was observed from controls to patients, mainly in more anterior areas, with a parallel widespread decrease of beta power. Moreover, a progressive decrease of FA from controls to patients in frontal areas and in the corpus callosum (genu) was observed. Correlation analyses indicated convergence among EEG rhythms changes, DTI values, and cognitive status mainly over anterior areas. The decrease of FA values and EEG spectral power changes might represent markers of neurodegenerative dysfunction, possibly preceding macrostructural atrophy.

Squitti R, Polimanti R.

**Copper phenotype in Alzheimer's disease: dissecting the pathway.**

Am J Neurodegener Dis. 2013 Jun 21;2(2):46-56.

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia. Several hypotheses have been put forward to explain the basis of disease onset and progression. Unfortunately, none of these seems to clarify the complexity of the pathogenesis. In fact, diverse and independent pathogenetic pathways can be disrupted at the same time, and each contributes to disease etiology. In recent years, researchers have begun studying biometals more deeply. A number of studies have shown that metal dyshomeostasis may enhance AD onset and progression. Specifically, different authors have hypothesized that alterations in metal metabolism are associated with an increased in metal-related oxidative stress and beta-amyloid oligomer formation and precipitation. Studies conducted in vivo, in vitro, in living patients and in silico studies have demonstrated that local and systemic defects in copper metabolism are characteristic signs of AD. This strongly supports the hypothesis that copper pathways may be disrupted by the disease. More specifically, a copper phenotype can be proposed for AD, based on defects found in genes involved in copper metabolism. In this review, we describe cop-

per dyshomeostasis in AD patients and attempt to explain the basis of the AD copper phenotype. Dissecting copper pathways, we highlight mechanisms which may be at the basis of the disease. We also discuss various associated translation outcomes.

Squitti R, Simonelli I, Ventriglia M, Siotto M, Pasqualetti P, Rembach A, Doecke J, Bush AI.

**Meta-Analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease.**

J Alzheimers Dis. 2013 Sep 26. [Epub ahead of print]

The fraction of copper not bound to ceruloplasmin seems altered in Alzheimer's disease (AD). We have addressed this notion evaluating all the studies carried out from 1996 until March 2013 by means of meta-analysis. We performed our analysis on diverse indices evaluating the relationship between copper and ceruloplasmin in general circulation, namely 'Non-Cp copper', '% Non-Cp copper', and 'Adjusted copper'. For Non-Cp copper and % Non-Cp copper, the correct stoichiometry between copper and ceruloplasmin (6-8 atoms of copper for each ceruloplasmin molecule) in healthy controls has been adopted as criterion for the study to be included in the meta-analysis evaluating data with the canonic Walshe's formula for Non-Cp copper. Copper to ceruloplasmin ratio (Cu:Cp), which is an internal quality control check for ceruloplasmin calibration, was used as an index of the actual stoichiometry in the specimens. Adjusted (Adj-Cp) copper, even though less reliable, was calculated, allowing the evaluation of all the studies selected. An additional meta-analysis of systemic total copper was re-calculated accounting for all the studies carried out from 1983 to March 2013. Ten studies were analyzed in the meta-analysis for Non-Cp copper and % Non-Cp copper reaching a pooled total of 599 AD subjects and 867 controls. For Adj-Cp copper, 14 studies were analyzed with a pooled total of 879 AD and 1,712 controls. 27 studies were considered for systemic total copper meta-analysis, with a pooled total of 1,393 AD and 2,159 controls. All the copper indices analyzed were significantly higher in AD subjects compared to healthy controls.

Squitti R, Siotto M, Bucossi S, Polimanti R.

**In silico investigation of the ATP7B gene: insights from functional prediction of non-synonymous substitution to protein structure.**

Biometals. 2013 Nov 20. [Epub ahead of print]

ATP7B is a copper-transporting ATPase that plays a key role in the regulation of copper homeostasis. Mutations in the ATP7B gene are causative for Wilson's disease, and recent reports have suggested that genetic variants are associated with susceptibility to Alzheimer's disease. Unfortunately, it is difficult to profile experimentally novel genetic variants in the ATP7B gene, because the human protein X-ray structure is not yet entirely understood. In order to investigate ATP7B non-synonymous substitutions, we used an in silico amino acid sequence-based approach. Specifically, we analyzed 337 ATP7B non-synonymous substitutions, which included Wilson's disease-causing mutations (DVs) and non Wilson's disease-causing variants (NDVs), with an algorithm that estimated a combined probability (cPdel) of an amino acidic change to be deleterious for the protein function. This approach appeared to reliably identify the probability of DVs and NDVs to be deleterious and to profile still unknown gene variants. Specifically, after analyzing ATP7B protein domains with the cPdel method, we found results in line with the predicted-modeled domains and some new suggestions. In conclusion, a



functional survey of amino acid changes in the ATP7B protein is provided herein, and we suggest that this bioinformatic method can furnish information about novel ATP7B mutations. Furthermore, the same approach can be applied to other uncharacterized proteins.

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Tomasevic L, Devigus B, Zito G, Ercolani M, Carducci F.

**Regional personalized electrodes to select transcranial current stimulation target.**

Front Hum Neurosci. 2013 Apr 22;7:131.

Personalizing transcranial stimulations promises to enhance beneficial effects for individual patients. Objective: To stimulate specific cortical regions by developing a procedure to bend and position custom shaped electrodes; to probe the effects on cortical excitability produced when the properly customized electrode is targeting different cortical areas. Method: An ad hoc neuronavigation procedure was developed to accurately shape and place the personalized electrodes on the basis of individual brain magnetic resonance images (MRI) on bilateral primary motor (M1) and somatosensory (S1) cortices. The transcranial alternating current stimulation (tACS) protocol published by Feurra et al. (2011b) was used to test the effects on cortical excitability of the personalized electrode when targeting S1 or M1. Results: Neuronal excitability as evaluated by tACS was different when targeting M1 or S1, with the General Estimating Equation model indicating a clear tCS Effect ( $p < 0.001$ ), and post hoc comparisons showing solely M1 20Hz tACS to reduce M1 excitability with respect to baseline and other tACS conditions. Conclusions: The present work indicates that specific cortical regions can be targeted by tCS properly shaping and positioning the stimulating electrode. Significance: Through multimodal brain investigations continuous efforts in understanding the neuronal changes related to specific neurological or psychiatric diseases become more relevant as our ability to build the compensating interventions improves. An important step forward on this path is the ability to target the specific cortical area of interest, as shown in the present pilot work.

Tombini M, Squitti R, Cacciapaglia F, Ventriglia M, Assenza G, Benvenga A, Pellegrino G, Campana C, Assenza F, Siotto M, Pacifici L, Afeltra A, Rossini PM.

**Inflammation and iron metabolism in adult patients with epilepsy: does a link exist?**

Epilepsy Res. 2013 Sep 28. [Epub ahead of print]

Inflammation has been shown to play a key role in epilepsy, and may also affect both the iron status and metabolism. Consequently, a relationship between iron metabolism and neuronal excitability and seizures could be expected.

We aimed at characterizing in 37 adult patients affected by focal epilepsy during the interictal period serum inflammatory cytokines, such as interleukin 6 (IL-6), IL-6 soluble receptor (IL6-sR), interleukin 1 (IL-1), IL-1 receptor-antagonist (IL-1RA), tumor necrosis factor- (TNF- ), and markers of iron status and metabolism: hemoglobin concentration (Hgb), mean corpuscular volume (MCV), hematocrit (Hct) red blood cell (RBC) count, serum iron and copper concentrations, ceruloplasmin (iCp), the ceruloplasmin enzymatic activity (eCp), the specific ceruloplasmin activity (eCp/iCp), total ferroxidase activity, transferrin (Tf), serum ferritin (SF), Tf saturation (Sat-Tf), and ratio of ceruloplasmin to transferrin (Cp/Tf). We investigated the correlations between these biological markers as well their relationship with patients' clinical features. A group of 43 healthy subjects

had the same serologic measurements to serve as controls.

Our findings showed in the group of patients with epilepsy an increase of IL-6 ( $p=0.026$ ) and a decrease of TNF- ( $p=0.002$ ) with respect to healthy subjects. For the first time, we also detected significant changes in iron metabolism as an increase of Cp/Tf ( $p=0.011$ ) and a decrease of Tf ( $p=0.031$ ), possibly driven by cytokine modifications and consistent with inflammation as acute phase and antioxidant activity markers. Accordingly, TNF- positively correlated with Tf ( $p=0.005$ ). Finally, a significant positive correlation between seizures frequency and eCp ( $p=0.046$ ) and inversely with Hgb ( $p=0.038$ ) and Hct ( $p=0.041$ ), and an inverse correlation between TNF- and the duration of epilepsy ( $p=0.021$ ) was detected.

Our findings demonstrate a relevant relationship between epilepsy and systemic inflammation, with a consistent link between seizures, inflammatory cytokines (IL-6 and TNF-) and iron regulation and metabolism, as acute phase and antioxidant markers.

Zito G, Polimanti R, Panetta V, Ventriglia M, Salustri C, Siotto MC, Moffa F, Altamura C, Vernieri F, Lupoi D, Cassetta E, Rossini PM, Squitti R.

#### **Antioxidant status and APOE genotype as susceptibility factors for neurodegeneration in Alzheimer's disease and vascular dementia.**

Rejuvenation Res. 2013 Feb;16(1):51-56.

Different factors interact to develop neurodegeneration in patients with dementia and other neurodegenerative disorders. Oxidative stress and the  $\epsilon$ 4 allele of apolipoprotein E (ApoE) are associated with significant alteration in lipid metabolism, in turn connected to a variety of neurodegenerative diseases and aging. Thus, a better understanding of the pathogenetic pathways associated with lipid dyshomeostasis may elucidate the causes of neurodegenerative processes. To address this issue, we evaluated the effects of antioxidant status and APOE genotype on neurodegeneration in patients with dementia of the Alzheimer type (AD), with vascular dementia (VaD), and in elderly healthy controls. Eighty-two AD, 42 VaD patients, and 26 healthy controls were recruited and underwent medial temporal lobe atrophy (MTA) assessment, white matter hyperintensities rating (WMH), serum total antioxidant status assaying (TAS), and APOE genotyping. A logistic regression algorithm applied to our data revealed that a 0.01mmol/L decrease of TAS concentration increased the probability of MTA by 24% ( $p=0.038$ ) and that carriers of the APOE  $\epsilon$ 4 allele showed higher WMH scores ( $p=0.018$ ), confirming that small variations in antioxidant systems homeostasis are associated with relevant modifications of disease risk. Furthermore, in individuals with analogous TAS values, the presence of the  $\epsilon$ 4 allele increased the predicted probability of having MTA. These outcomes further sustain the interaction of oxidative stress and APOE genotype to neurodegeneration.

Tempesta D, Curcio G, De Gennaro L, Ferrara M.

#### **Long-term impact of earthquakes on sleep quality.**

PLoS One. 2013;8(2): e55936. Epub 2013 Feb 13.

We investigated the impact of the 6.3 magnitude 2009 L'Aquila (Italy) earthquake on standardized self-report measures of sleep quality (Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI) and frequency of disruptive nocturnal behaviours (Pittsburgh Sleep Quality Index-Addendum, PSQI-A) two years after the natural disaster. Self-reported sleep quality was assessed in 665 L'Aquila citizens exposed to the earthquake compared with a different sample ( $n=754$ ) of L'Aquila citizens tested 24 months before the earthquake. In addi-

tion, sleep quality and disruptive nocturnal behaviours (DNB) of people exposed to the traumatic experience were compared with people that in the same period lived in different areas ranging between 40 and 115 km from the earthquake epicenter (n=3574). The comparison between L'Aquila citizens before and after the earthquake showed a significant deterioration of sleep quality after the exposure to the trauma. In addition, two years after the earthquake L'Aquila citizens showed the highest PSQI scores and the highest incidence of DNB compared to subjects living in the surroundings. Interestingly, above-the-threshold PSQI scores were found in the participants living within 70 km from the epicenter, while trauma-related DNBs were found in people living in a range of 40 km. Multiple regressions confirmed that proximity to the epicenter is predictive of sleep disturbances and DNB, also suggesting a possible mediating effect of depression on PSQI scores.

The psychological effects of an earthquake may be much more pervasive and long-lasting of its building destruction, lasting for years and involving a much larger population. A reduced sleep quality and an increased frequency of DNB after two years may be a risk factor for the development of depression and posttraumatic stress disorder.

Alghatrif M, Strait JB, Morrell CH, Canepa M, Wright J, Elango P, Scuteri A, Najjar SS, Ferrucci L, Lakatta EG.

**Longitudinal trajectories of arterial stiffness and the role of blood pressure: the Baltimore longitudinal study of aging.**

Hypertension. 2013 Nov;62(5):934-941.

Carotid-femoral pulse wave velocity (PWV), a marker of arterial stiffness, is an established independent cardiovascular risk factor. Little information is available on the pattern and determinants of the longitudinal change in PWV with aging. Such information is crucial to elucidating mechanisms underlying arterial stiffness and the design of interventions to retard it. Between 1988 and 2013, we collected 2 to 9 serial measures of PWV in 354 men and 423 women of the Baltimore Longitudinal Study of Aging, who were 21 to 94 years of age and free of clinically significant cardiovascular disease. Rates of PWV increase accelerated with advancing age in men more than women, leading to sex differences in PWV after the age of 50 years. In both sexes, not only systolic blood pressure (SBP)  $\geq 140$  mmHg but also SBP of 120 to 139 mmHg was associated with steeper rates of PWV increase compared with SBP  $< 120$  mmHg. Furthermore, there was a dose-dependent effect of SBP in men with marked acceleration in PWV rate of increase with age at SBP  $\geq 140$  mmHg compared with SBP of 120 to 139 mmHg. Except for waist circumference in women, no other traditional cardiovascular risk factors predicted longitudinal PWV increase. In conclusion, the steeper longitudinal increase of PWV in men than women led to the sex difference that expanded with advancing age. Age and SBP are the main longitudinal determinants of PWV, and the effect of SBP on PWV trajectories exists even in the prehypertensive range.

Anker MS, von Haehling S, Springer J, Banach M, Anker SD.

**Highlights of the mechanistic and therapeutic cachexia and sarcopenia research 2010 to 2012 and their relevance for cardiology.**

Int J Cardiol. 2013 Jan 10;162(2):73-76.

Sarcopenia and cachexia are significant medical problems with a high disease related burden in cardiovascular illness. Muscle wasting and weight loss are very frequent par-

ticularly in chronic heart failure and they relate to poor prognosis. Although clinically largely underestimated, the fields of cachexia and sarcopenia are of great relevance to cardiologists. In cachexia and sarcopenia a significant number of research publications related to basic science questions of muscle wasting and lipolysis were published between 2010 and 2012. Recently, the two processes of muscle wasting and lipolysis were found to be closely linked. Treatment research in pre-clinical models involves studies on a number of different therapeutic entities, including ghrelin, selective androgen receptor modulators (SARMs), as well as drugs targeting myostatin or melanocortin-4. In the human setting, studies using enobosarm (a SARM) and anamorelin (ghrelin) are in phase III. The last 3 years has seen significant efforts to define the field using consensus statements. In the future, these definitions should also be considered for guidelines and treatment trials in cardiovascular medicine. The current review aims to summarize important information and development in the fields of muscle wasting, sarcopenia and cachexia focussing on findings in cardiovascular research, in order for cardiologists to have a better understanding of the progress in the still not well enough known field.

Baumgarten A, Bang C, Tschirner A, Engelmann A, Adams V, von Haehling S, Doehner W, Pregla R, Anker M, Blecharz K, Meyer R, Hetzer R, Anker SD, Thum T, Springer J.

**TWIST1 regulates the activity of ubiquitin proteasome system via the miR-199/124 cluster in human end-stage dilated cardiomyopathy.**

Int J Cardiol. 2013 Sep 30;168(2):1447-1452.

The transcription factor TWIST1 has been described to regulate the microRNA (miR)-199/214 cluster. Genetic disruption of TWIST1 resulted in a cachectic phenotype and early death of the knock-out mice. This might be connected to the activity of the ubiquitin-proteasome-system (UPS), as miR-199a has been suggested to regulate the ubiquitin E2 ligases Ube2i and Ube2g1.

Cardiac tissue from explanted hearts of 42 patients with dilated cardiomyopathy and 20 healthy donor hearts were analysed for protein expression of TWIST1 and its inhibitors Id-1, MuRF-1 and MAFbx, the expression of miR-199a, -199b and -214, as well as the activity of the UPS by using specific fluorogenic substrates.

TWIST1 was repressed in patients with dilated cardiomyopathy by 43% ( $p=0.003$ ), while Id1 expression was unchanged. This was paralleled by a reduced expression of miR-199a by  $38 \pm 9\%$  ( $p=0.053$ ), miR-199b by  $36 \pm 13\%$  ( $p=0.019$ ) and miR-214 by  $41 \pm 11\%$  ( $p=0.0158$ ) compared to donor hearts. An increased peptidylglutamyl-peptide-hydrolysing activity ( $p<0.0001$ ) was observed in the UPS, while the chymotrypsin-like and trypsin-like activities were unchanged. The protein levels of the rate limiting ubiquitin E3-ligases MuRF-1 and MAFbx were up-regulated ( $p=0.005$  and  $p=0.0156$ , respectively). Mechanistically silencing of TWIST1 using siRNA in primary rat cardiomyocytes led to a down-regulation of the miR-199/214 cluster and to a subsequent up-regulation of Ube2i.

The TWIST1/miR-199/214 axis is down-regulated in dilated cardiomyopathy, which is likely to play a role in the increased activity of the UPS. This may contribute to the loss of cardiac mass during dilatation of the heart.

Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, Thum T.

**Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction.**

Int J Cardiol. 2013 Jan 21. [Epub ahead of print]

Recent studies have suggested that the microRNAs miR-133a and miR-423-5p may serve as useful biomarkers in patients with left ventricular (LV) heart failure or with LV remodeling after myocardial infarction (MI). These results were however obtained in small series of patients and control subjects were used as reference groups. Whether these microRNAs may be indicators of the degree of LV remodeling after MI is unknown.

246 patients with a first anterior Q-wave MI were included. Serial echocardiographic studies were performed at hospital discharge, 3 months, and 1 year after MI and analyzed at a core laboratory. We investigated the temporal profile (baseline, 1, 3 and 12 months) of circulating miR-133a and miR-423-5p and their relations with cardiac biomarkers (B-type natriuretic peptide, C-reactive protein, and cardiac troponin I) and LV remodeling during the 1 year follow-up.

There were time-dependent changes in the levels of circulating miR-133a and miR-423-5p with significant increase of miR-133a at 12 months compared to 3 months and significant increase of miR-423-5p at 1, 3, and 12 months compared to baseline. However, miR-133a and miR-423-5p were not associated with indices of LV function and LV remodeling serially assessed during a 1 year period after an acute anterior MI, nor with B-type natriuretic peptide.

Bourge RC, Fleg JL, Fonarow GC, Cleland JG, McMurray JJ, van Veldhuisen DJ, Gheorghide M, Patel K, Aban IB, Allman RM, White-Williams C, White M, Filippatos GS, Anker SD, Ahmed A.

**Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in older patients with chronic systolic heart failure.**

Am J Med. 2013 Aug;126(8):701-708.

Heart failure is a leading cause of hospital admission and readmission in older adults. The new United States healthcare reform law has created provisions for financial penalties for hospitals with higher than expected 30-day all-cause readmission rates for hospitalized Medicare beneficiaries aged  $\geq 65$  years with heart failure. We examined the effect of digoxin on 30-day all-cause hospital admission in older patients with heart failure and reduced ejection fraction.

In the main Digitalis Investigation Group trial, 6800 ambulatory patients with chronic heart failure (ejection fraction  $\leq 45\%$ ) were randomly assigned to digoxin or placebo. Of these, 3405 were aged  $\geq 65$  years (mean age, 72 years; 25% were women; 11% were nonwhite). The main outcome in the current analysis was 30-day all-cause hospital admission.

In the first 30 days after randomization, all-cause hospitalization occurred in 5.4% (92/1693) and 8.1% (139/1712) of patients in the digoxin and placebo groups, respectively, (hazard ratio {HR} when digoxin was compared with placebo, 0.66; 95% confidence interval {CI}, 0.51-0.86;  $P=.002$ ). Digoxin also reduced both 30-day cardiovascular (3.5% vs 6.5%; HR, 0.53; 95% CI, 0.38-0.72;  $P<.001$ ) and heart failure (1.7 vs 4.2%; HR, 0.40; 95% CI, 0.26-0.62;  $P<.001$ ) hospitalizations, with similar trends for 30-day all-cause mortality (0.7% vs 1.3%; HR, 0.55; 95% CI, 0.27-1.11;  $P=.096$ ). Younger patients were at lower risk of events but obtained similar benefits from digoxin.

Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in ambulatory older patients with chronic systolic heart failure. Future studies need to examine its effect on 30-day all-cause hospital readmission in hospitalized patients with acute heart failure.

Bourge RC, Fleg JL, Fonarow GC, Cleland JG, McMurray JJ, van Veldhuisen DJ, Ghe-

orghide M, Patel K, Aban IB, Allman RM, White-Williams C, White M, Filippatos GS, Anker SD, Ahmed A.

**Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in older patients with chronic systolic heart failure.**

Am J Med. 2013 Aug;126(8):701-708.

Heart failure is a leading cause of hospital admission and readmission in older adults. The new United States healthcare reform law has created provisions for financial penalties for hospitals with higher than expected 30-day all-cause readmission rates for hospitalized Medicare beneficiaries aged  $\geq 65$  years with heart failure. We examined the effect of digoxin on 30-day all-cause hospital admission in older patients with heart failure and reduced ejection fraction.

In the main Digitalis Investigation Group trial, 6800 ambulatory patients with chronic heart failure (ejection fraction  $\leq 45\%$ ) were randomly assigned to digoxin or placebo. Of these, 3405 were aged  $\geq 65$  years (mean age, 72 years; 25% were women; 11% were nonwhite). The main outcome in the current analysis was 30-day all-cause hospital admission.

In the first 30 days after randomization, all-cause hospitalization occurred in 5.4% (92/1693) and 8.1% (139/1712) of patients in the digoxin and placebo groups, respectively, (hazard ratio {HR} when digoxin was compared with placebo, 0.66; 95% confidence interval {CI}, 0.51-0.86;  $P=.002$ ). Digoxin also reduced both 30-day cardiovascular (3.5% vs 6.5%; HR, 0.53; 95% CI, 0.38-0.72;  $P<.001$ ) and heart failure (1.7 vs 4.2%; HR, 0.40; 95% CI, 0.26-0.62;  $P<.001$ ) hospitalizations, with similar trends for 30-day all-cause mortality (0.7% vs 1.3%; HR, 0.55; 95% CI, 0.27-1.11;  $P=.096$ ). Younger patients were at lower risk of events but obtained similar benefits from digoxin.

Digoxin reduces 30-day all-cause hospital admission in ambulatory older patients with chronic systolic heart failure. Future studies need to examine its effect on 30-day all-cause hospital readmission in hospitalized patients with acute heart failure.

Castagna C, Iellamo F, Impellizzeri FM, Manzi V.

**Validity and reliability of the 45-15 test for aerobic fitness in young soccer players.**

Int J Sports Physiol Perform. 2013 Jan 4. [Epub ahead of print]

The aim of this study was to examine the reliability and validity of a popular field-test for aerobic fitness used in soccer (45-15) in Italy. Alternating progressive 45s runs with 15s passive recovery until exhaustion the test considers peak speed (PS) as reflection of maximal aerobic-speed (MAS). The validity and reliability of the 45-15 was assessed in 18 young male soccer players (age  $16.7 \pm 1.8$  years; body-mass  $70 \pm 7.45$  kg, height  $177 \pm 0.5$  cm,  $55.62 \pm 5.56$  ml $\cdot$ kg $^{-1}$  $\cdot$ min $^{-1}$ ) submitted to laboratory testing for aerobic fitness and repeatedly to 45-15. Results showed that 45-15 PS was significantly related to VO<sub>2</sub>max ( $r=0.80$ ,  $p<0.001$ , 95%CI 0.47-0.93) and MAS ( $r=0.78$ ,  $p=0.001$ , 95%CI 0.43-0.93). No significant bias between MAS 45-15 PS ( $p=0.11$ ) achieved during the measurement consistency study. Receiver operating characteristic (ROC) analysis showed that 45-15 PS was sensitive in detecting VO<sub>2</sub>max changes in subjects as revealed by area under the curve size (AUC=0.97; 95%CI 0.73-1). Players with peak 45-15 speed equal or above 16.5 km $\cdot$ h $^{-1}$  (i.e. ROC cut-off) may be considered as possessing good aerobic-fitness. In light of this study findings the 45-15 test may be considered as a reliable and valid test to evaluate meaningful information to direct generic aerobic training in soccer.

Deedwania P, Patel K, Fonarow GC, Desai RV, Zhang Y, Feller MA, Ovalle F, Love TE, Aban IB, Mujib M, Ahmed MI, Anker SD, Ahmed A.

**Prediabetes is not an independent risk factor for incident heart failure, other cardiovascular events or mortality in older adults: findings from a population-based cohort study.**

Int J Cardiol. 2013 May 31.[Epub ahead of print]

Whether prediabetes is an independent risk factor for incident heart failure (HF) in non-diabetic older adults remains unclear.

Of the 4602 Cardiovascular Health Study participants, age $\geq$ 65 years, without baseline HF and diabetes, 2157 had prediabetes, defined as fasting plasma glucose (FPG) 100-125 mg/dL. Propensity scores for prediabetes, estimated for each of the 4602 participants, were used to assemble a cohort of 1421 pairs of individuals with and without prediabetes, balanced on 44 baseline characteristics.

Participants had a mean age of 73 years, 57% were women, and 13% African American. Incident HF occurred in 18% and 20% of matched participants with and without prediabetes, respectively (hazard ratio {HR} associated with prediabetes, 0.90; 95% confidence interval {CI}, 0.76-1.07;  $p=0.239$ ). Unadjusted and multivariable-adjusted HRs (95% CIs) for incident HF associated with prediabetes among 4602 pre-match participants were 1.22 (95% CI, 1.07-1.40;  $p=0.003$ ) and 0.98 (95% CI, 0.85-1.14;  $p=0.826$ ), respectively. Among matched individuals, prediabetes had no independent association with incident acute myocardial infarction (HR, 1.02; 95% CI, 0.81-1.28;  $p=0.875$ ), angina pectoris (HR, 0.93; 95% CI, 0.77-1.12;  $p=0.451$ ), stroke (HR, 0.86; 95% CI, 0.70-1.06;  $p=0.151$ ) or all-cause mortality (HR, 0.99; 95% CI, 0.88-1.11;  $p=0.840$ ).

We found no evidence that prediabetes is an independent risk factor for incident HF, other cardiovascular events or mortality in community-dwelling older adults. These findings question the wisdom of routine screening for prediabetes in older adults and targeted interventions to prevent adverse outcomes in older adults with prediabetes.

Dobre D, Borer JS, Fox K, Swedberg K, Adams KF, Cleland JG, Cohen-Solal A, Gheorghide M, Gueyffier F, O'Connor CM, Fiuzat M, Patak A, Piña IL, Rosano G, Sabbah HN, Tavazzi L, Zannad F.

**Heart rate: a prognostic factor and therapeutic target in chronic heart failure. The distinct roles of drugs with heart rate-lowering properties.**

Eur J Heart Fail. 2013 Aug 7. [Epub ahead of print]

Heart rate not only predicts outcome but may also be a therapeutic target in patients with chronic heart failure. Several classes of pharmacological agents can be used to modulate heart rate, including beta-blockers, ivabradine, digoxin, amiodarone, and verapamil. Choice of agent will depend on heart rhythm, co-morbidities, and disease phenotype. Beneficial and harmful interactions may also exist. The aim of this paper is to summarize the current body of knowledge regarding the relevance of heart rate as a prognostic factor (risk marker) and particularly as a therapeutic target (risk factor) in patients with chronic heart failure, with a special focus on ivabradine, a novel agent that is currently the only available purely bradycardic agent.

Ebner N, Springer J, Kalantar-Zadeh K, Lainscak M, Doehner W, Anker SD, von Haehling S.

**Mechanism and novel therapeutic approaches to wasting in chronic disease.**

Maturitas. 2013 Jul;75(3):199-206.

Cachexia is a multifactorial syndrome defined by continuous loss of skeletal muscle mass - with or without loss of fat mass - which cannot be fully reversed by conventional nutritional support and which may lead to progressive functional impairment and increased death risk. Its pathophysiology is characterized by negative protein and energy balance driven by a variable combination of reduced food intake and abnormal metabolism. Muscle wasting is encountered in virtually all chronic disease states in particular during advanced stages of the respective illness. Several pre-clinical and clinical studies are ongoing to ameliorate this clinical problem. The mechanisms of muscle wasting and cachexia in chronic diseases such as cancer, chronic heart failure, chronic obstructive pulmonary disease and chronic kidney disease are described. We discuss therapeutic targets and such potential modulators as appetite stimulants, selective androgen receptor modulators, amino acids and naturally occurring peptide hormones.

Elkina Y, Palus S, Tschirner A, Hartmann K, von Haehling S, Doehner W, Mayer U, Coats AJS, Beadle J, Anker SD, Springer J.

**Tandospirone reduces wasting and improves cardiac function in experimental cancer cachexia.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 10;170(2):160-166. Epub 2013 Oct 12.

Cancer cachexia is thought to be the cause of >20% of cancer related deaths. Symptoms of cancer cachexia patients include depression and anorexia significantly worsening their quality of life. Moreover, in rodent models of cancer cachexia atrophy of the heart has been shown to impair cardiac function. Here, we characterize the effects of the antidepressant and anxiolytic drug tandospirone on wasting, cardiac function and survival in experimental cancer cachexia.

The well-established Yoshida hepatoma rat model was used and tumor-bearing rats were treated with 1mg/kg/d (LD), 10mg/kg/d (HD) tandospirone or placebo. Weight, body composition (NMR), cardiac function (echocardiography), activity and food intake were assessed. Noradrenalin and cortisol were measured in plasma and caspase activity in skeletal muscle.

Ten mg/kg/d tandospirone decreased the loss of body weight ( $p=0.0003$ ) compared to placebo animals, mainly due to preservation of muscle mass ( $p<0.001$ ), while 1mg/kg/d tandospirone was not effective. Locomotor activity ( $p=0.0007$ ) and food intake ( $p=0.0001$ ) were increased by HD tandospirone. The weight ( $p=0.0277$ ) and function of heart (left ventricular mass, fractional shortening, stroke volume, ejection fraction, all  $p<0.05$ ) were significantly improved. In the HD tandospirone group, plasma levels of noradrenalin and cortisol were significantly reduced by 49% and 52%, respectively, which may have contributed to the lower caspase activity in the gastrocnemius muscle. Most importantly, HD tandospirone significantly improved survival compared to placebo rats (HR: 0.34; 95% CI: 0.13-0.86;  $p=0.0495$ ).

Tandospirone showed significant beneficial effects in the Yoshida hepatoma cancer cachexia model and should be further examined as a prospective drug for this syndrome.

Farkas J, von Haehling S, Kalantar-Zadeh K, Morley JE, Anker SD, Lainscak M.

**Cachexia as a major public health problem: frequent, costly, and deadly.**

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013 Mar 29. [Epub ahead of print]



Perception of healthy body size and composition differs considerably across the globe, ethnic groups, cultures, and even inside medical community. Although the concept of ideal body weight has evolved over the past decades, the observation that weight loss can have more deleterious effects within a short-term period than weight gain has remained rather consistent. Weight loss, as a prelude to cachexia, occurs frequently in a variety of disease states and meets the requirements of a global public health problem. Consequently, interventions to prevent and control chronic diseases require a comprehensive approach that targets a population as a whole and includes both prevention and treatment strategies. Around the globe, cachexia awareness campaigns and expanding the current public health priorities to highlight the cachexia magnitude and areas of interventions is necessary. Simultaneously, scientific efforts should provide us with more reliable estimates of body wasting and cachexia as well as pathophysiology of cachexia-associated death. As certain proportion of patients will, irrespective of preventive measures, eventually develop cachexia, a quest for effective remedy remains vital.

Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirotta R, Guadagni F.

**Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Nov;108(6):387. Epub 2013 Sep 26.

Conventionally, ischemic heart disease (IHD) is equated with large vessel coronary disease. However, recent evidence has suggested a role of compromised microvascular regulation in the etiology of IHD. Because regulation of coronary blood flow likely involves activity of specific ion channels, and key factors involved in endothelium-dependent dilation, we proposed that genetic anomalies of ion channels or specific endothelial regulators may underlie coronary microvascular disease. We aimed to evaluate the clinical impact of single-nucleotide polymorphisms in genes encoding for ion channels expressed in the coronary vasculature and the possible correlation with IHD resulting from microvascular dysfunction. 242 consecutive patients who were candidates for coronary angiography were enrolled. A prospective, observational, single-center study was conducted, analyzing genetic polymorphisms relative to (1) NOS3 encoding for endothelial nitric oxide synthase (eNOS); (2) ATP2A2 encoding for the Ca<sup>2+</sup>/H-ATPase pump (SERCA); (3) SCN5A encoding for the voltage-dependent Na channel (Nav1.5); (4) KCNJ8 and KCNJ11 encoding for the Kir6.1 and Kir6.2 subunits of K-ATP channels, respectively; and (5) KCN5A encoding for the voltage-gated K channel (Kv1.5). No significant associations between clinical IHD manifestations and polymorphisms for SERCA, Kir6.1, and Kv1.5 were observed ( $p > 0.05$ ), whereas specific polymorphisms detected in eNOS, as well as in Kir6.2 and Nav1.5 were found to be correlated with IHD and microvascular dysfunction. Interestingly, genetic polymorphisms for ion channels seem to have an important clinical impact influencing the susceptibility for microvascular dysfunction and IHD, independent of the presence of classic cardiovascular risk factors.

Feraco A, Armani A, Mammi C, Fabbri A, Rosano GM, Caprio M.

**Role of mineralocorticoid receptor and renin-angiotensin-aldosterone system in adipocyte dysfunction and obesity.**

J Steroid Biochem Mol Biol. 2013 Sep;137:99-106.

The mineralocorticoid receptor (MR) classically mediates aldosterone effects on salt

homeostasis and blood pressure regulation in epithelial target tissues. In recent years, functional MRs have been identified in non classical targets of aldosterone actions, in particular in adipose tissue, where they mediate the effects of aldosterone and glucocorticoids in the control of adipogenesis, adipose expansion and its pro-inflammatory capacity. In this context, inappropriate MR activation has been demonstrated to be a causal factor in several pathologic conditions such as vascular inflammation, endothelial dysfunction, insulin resistance and obesity. The aim of this review is to summarize the latest developments in this rapidly developing field, and will focus on the role of MR and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) as potential leading characters in the early steps of adipocyte dysfunction and obesity. Indeed modulation of MR activity in adipose tissue has promise as a novel therapeutic approach to treat obesity and its related metabolic complications. This article is part of a Special Issue entitled 'CSR 2013'.

Ferraro E, Giammarioli AM, Caldarola S, Lista P, Feraco A, Tinari A, Salvatore AM, Malorni W, Berghella L, Rosano G.

**The metabolic modulator trimetazidine triggers autophagy and counteracts stress-induced atrophy in skeletal muscle myotubes.**

FEBS J. 2013 Oct;280(20):5094-5108.

It has recently been demonstrated that trimetazidine (TMZ), an anti-ischemic antianginal agent, is also able to improve exercise performance in patients with peripheral arterial disease. TMZ is a metabolic modulator, and the mechanisms underlying its cytoprotective anti-ischemic activity could be ascribed, at least in cardiomyocytes, to optimization of metabolism. However, regarding the cytoprotection exerted by TMZ on skeletal muscle and allowing the improvement of exercise performance, no information is yet available. In the present study, we investigated in detail the protective effects of this drug on in vitro skeletal muscle models of atrophy. Experiments carried out with murine C2C12 myotubes treated with TMZ revealed that this drug could efficiently counteract the cytopathic effects induced by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- $\alpha$  and by the withdrawal of growth factors. Indeed, TMZ significantly counteracted the reduction in myotube size induced by these treatments. TMZ also increased myosin heavy chain expression and induced hypertrophy in C2C12 myotubes, both effects strongly suggesting a role of TMZ in counteracting atrophy in vitro. In particular, we found that TMZ was able to activate the phosphoinositide 3-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin 2 pathway and to reduce the stress-induced transcriptional upregulation of atrogin-1, muscle ring finger protein 1, and myostatin, all of which are key molecules involved in muscle wasting. Moreover, this is the first demonstration that TMZ induces autophagy, a key mechanism involved in muscle mass regulation. On the basis of these results, it can be hypothesized that the improvement in exercise performance previously observed in patients could be ascribed to a cytoprotective mechanism exerted by TMZ on skeletal muscle integrity.

Filippatos G, Farmakis D, Colet JC, Dickstein K, Lüscher TF, Willenheimer R, Parissis J, Gaudesius G, Mori C, von Eisenhart Rothe B, Greenlaw N, Ford I, Ponikowski P, Anker SD.

**Intravenous ferric carboxymaltose in iron-deficient chronic heart failure patients with and without anaemia: a subanalysis of the FAIR-HF trial.**

Eur J Heart Fail. 2013 Nov;15(11):1267-1276.

Therapy with i.v. iron in patients with chronic heart failure (CHF) and iron deficiency (ID) improves symptoms, functional capacity, and quality of life. We sought to investigate whether these beneficial outcomes are independent of anaemia. FAIR-HF randomized 459 patients with CHF [NYHA class II or III, LVEF  $\leq$ 40% (NYHA II) or  $\leq$ 45% (NYHA III)] and ID to i.v. iron as ferric carboxymaltose (FCM) or placebo in a 2:1 ratio. We analysed the efficacy and safety according to the presence or absence of anaemia (haemoglobin  $\leq$ 120 g/L) at baseline. Of 459 patients, 232 had anaemia at baseline (51%). The effect of FCM on the primary endpoints of self-reported Patient Global Assessment (PGA) and NYHA class at week 24 was similar in patients with and without anaemia [odds ratio (OR) for improvement, 2.48 vs. 2.60,  $P = 0.97$  for PGA and 1.90 vs. 3.39,  $P = 0.51$  for NYHA]. Results were also similar for the secondary endpoints, including PGA and NYHA at weeks 4 and 12, 6 min walk test distance, Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire overall score, and European Quality of Life-5 Dimensions Visual Analogue Scale at most time points. Regarding safety, no differences were noticed in the rates of death or first hospitalization between FCM and placebo both in anaemic and in non-anaemic patients. Treatment of ID with FCM in patients with CHF is equally efficacious and shows a similar favourable safety profile irrespective of anaemia. Iron status should be assessed in symptomatic CHF patients both with and without anaemia and treatment of ID should be considered.

Fragasso G, Rosano G, Baek SH, Sisakian H, Di Napoli P, Alberti L, Calori G, Kang SM, Sahakyan L, Sanosyan A, Vitale C, Marazzi G, Margonato A, Belardinelli R.

**Effect of partial fatty acid oxidation inhibition with trimetazidine on mortality and morbidity in heart failure: Results from an international multicentre retrospective cohort study.**

Int J Cardiol. 2012 Oct 13. pii: S0167-5273(12)01244-2.[Epub ahead of print]

The aim of this cohort study was to retrospectively evaluate, in patients with chronic heart failure (CHF), the long term effect of trimetazidine (TMZ) on morbidity and mortality. Previous small studies in patients with CHF have shown that TMZ can improve left ventricular function, exercise capacity and NYHA class compared to placebo. However, no data on the effects of TMZ on survival in patients with CHF have ever been produced. In this international multicentre retrospective cohort study data from 669 patients were analyzed. 362 patients were on TMZ due to symptom persistence despite up-titration of optimal CHF therapy, while the remaining patients continued conventional CHF therapy alone. Propensity score analysis was performed in order to minimize selection bias between the two groups. Kaplan-Meier analysis for global mortality showed 11.3% improved global survival ( $p=0.015$ ) and 8.5% improved survival for cardiovascular (CVD) death ( $p=0.050$ ) in the TMZ group. Cox regression analysis for global mortality showed a significant risk reduction for TMZ treated patients with a hazard ratio (HR)=0.189 (confidence interval - CI 95%: 0.017-0.454;  $p=0.0002$ ). TMZ also showed a good risk reduction profile for CVD death causes (HR=0.072, CI 95%: 0.019-0.268,  $p=0.0001$ ). The rate of hospitalization for cardiovascular causes was reduced by 10.4% at 5 years ( $p<0.0005$ ) with increased hospitalization-free survival of 7.8 months. TMZ is effective in reducing mortality and event-free survival in patients with CHF. The addition of TMZ on top of optimal medical therapy improves long term survival in CHF patients.

Gheorghide M, Fonarow GC, van Veldhuisen DJ, Cleland JG, Butler J, Epstein AE, Patel K, Aban IB, Aronow WS, Anker SD, Ahmed A.

**Lack of evidence of increased mortality among patients with atrial fibrillation taking digoxin: findings from post hoc propensity-matched analysis of the AFFIRM trial.**

Eur Heart J. 2013 May;34(20):1489-1497.

Digoxin is recommended for long-term rate control in paroxysmal, persistent, and permanent atrial fibrillation (AF). While some analyses suggest an association of digoxin with a higher mortality in AF, the intrinsic nature of this association has not been examined in propensity-matched cohorts, which is the objective of the current study.

In Atrial Fibrillation Follow-up Investigation of Rhythm Management (AFFIRM), 4060 patients with paroxysmal and persistent AF were randomized to rate (n = 2027) vs. rhythm (n = 2033) control strategies. Of these, 1377 received digoxin as initial therapy and 1329 received no digoxin at baseline. Propensity scores for digoxin use were estimated for each of these 2706 patients and used to assemble a cohort of 878 pairs of patients receiving and not receiving digoxin, who were balanced on 59 baseline characteristics. Matched patients had a mean age of 70 years, 40% were women, and 11% non-white. During the 3.4 years of the mean follow-up, all-cause mortality occurred in 14 and 13% of matched patients receiving and not receiving digoxin, respectively [hazard ratio (HR) associated with digoxin use: 1.06; 95% confidence interval (CI): 0.83-1.37; P = 0.640]. Among matched patients, digoxin had no association with all-cause hospitalization (HR: 0.96; 95% CI: 0.85-1.09; P = 0.510) or incident non-fatal cardiac arrhythmias (HR: 0.90; 95% CI: 0.37-2.23; P = 0.827). Digoxin had no multivariable-adjusted or propensity score-adjusted associations with these outcomes in the pre-match cohort.

In patients with paroxysmal and persistent AF, we found no evidence of increased mortality or hospitalization in those taking digoxin as baseline initial therapy.

Gheorghide M, Patel K, Filippatos G, Anker SD, van Veldhuisen DJ, Cleland JG, Metra M, Aban IB, Greene SJ, Adams KF, McMurray JJ, Ahmed A.

**Effect of oral digoxin in high-risk heart failure patients: a pre-specified subgroup analysis of the DIG trial.**

Eur J Heart Fail. 2013 May;15(5):551-559.

In the Digitalis Investigation Group (DIG) trial, digoxin reduced mortality or hospitalization due to heart failure (HF) in several pre-specified high-risk subgroups of HF patients, but data on protocol-specified 2-year outcomes were not presented. In the current study, we examined the effect of digoxin on HF death or HF hospitalization and all-cause death or all-cause hospitalization in high-risk subgroups during the protocol-specified 2 years of post-randomization follow-up.

In the DIG trial, 6800 ambulatory patients with chronic HF, normal sinus rhythm, and LVEF  $\leq$ 45% (mean age 64 years, 26% women, 17% non-whites) were randomized to receive digoxin or placebo. The three high-risk groups were defined as NYHA class III-IV symptoms (n = 2223), LVEF <25% (n = 2256), and cardiothoracic ratio (CTR) >55% (n = 2345). In all three high-risk subgroups, compared with patients in the placebo group, those in the digoxin group had a significant reduction in the risk of the 2-year composite endpoint of HF mortality or HF hospitalization: NYHA III-IV [hazard ratio (HR) 0.65; 95% confidence interval (CI) 0.57-0.75; P < 0.001], LVEF <25% (HR 0.61; 95% CI 0.53-0.71; P < 0.001), and CTR >55% (HR 0.65; 95% CI 0.57-0.75; P < 0.001). Digoxin-associated HRs (95% CI) for 2-year all-cause mortality or all-cause hospitalization for subgroups with NYHA III-IV, LVEF <25%, and CTR >55% were 0.88 (0.80-0.97; P = 0.012), 0.84 (0.76-0.93; P = 0.001), and 0.85 (0.77-0.94; P = 0.002), respectively.

Digoxin improves outcomes in chronic HF patients with NYHA class III-IV, LVEF <25%, or CTR >55%, and should be considered in these patients.

Gheorghiade M, Shah AN, Vaduganathan M, Butler J, Bonow RO, Rosano GM, Taylor S, Kupfer S, Misselwitz F, Sharma A, Fonarow GC.

**Recognizing hospitalized heart failure as an entity and developing new therapies to improve outcomes: academics', clinicians', industry's, regulators', and payers'.**

Perspectives. *Heart Fail Clin.* 2013 Jul;9(3):285-290.

Hospitalized heart failure (HHF) is associated with unacceptably high postdischarge mortality and rehospitalization rates. This heterogeneous group of patients, however, is still treated with standard, homogenous therapies that are not preventing their rapid deterioration. The costs associated with HHF have added demands from society, government, and payers to improve outcomes. With coordinated and committed efforts in the development of new therapies, improvements may be seen in outcomes for patients with HHF. This article summarizes concepts in developing therapies for HHF discussed during a multidisciplinary panel at the Heart Failure Society of America's Annual Scientific Meeting, September 2012.

Gliozzi M, Walker R, Muscoli S, Vitale C, Gratteri S, Carresi C, Musolino V, Russo V, Janda E, Ragusa S, Aloe A, Palma E, Muscoli C, Romeo F, Mollace V.

**Bergamot polyphenolic fraction enhances rosuvastatin-induced effect on LDL-cholesterol, LOX-1 expression and protein kinase B phosphorylation in patients with hyperlipidemia.**

*Int J Cardiol.* 2013 Dec 10;170(2):140-145.

Statins are the most commonly prescribed drugs to reduce cardiometabolic risk. Besides the well-known efficacy of such compounds in both preventing and treating cardiometabolic disorders, some patients experience statin-induced side effects. We hypothesize that the use of natural bergamot-derived polyphenols may allow patients undergoing statin treatment to reduce effective doses while achieving target lipid values. The aim of the present study is to investigate the occurrence of an enhanced effect of bergamot-derived polyphenolic fraction (BPF) on rosuvastatin-induced hypolipidemic and vasoprotective response in patients with mixed hyperlipidemia.

A prospective, open-label, parallel group, placebo-controlled study on 77 patients with elevated serum LDL-C and triglycerides was designed. Patients were randomly assigned to a control group receiving placebo (n=15), two groups receiving orally administered rosuvastatin (10 and 20mg/daily for 30 days; n=16 for each group), a group receiving BPF alone orally (1000 mg/daily for 30 days; n=15) and a group receiving BPF (1000 mg/daily given orally) plus rosuvastatin (10mg/daily for 30 days; n=15).

Both doses of rosuvastatin and BPF reduced total cholesterol, LDL-C, the LDL-C/HDL-C ratio and urinary mevalonate in hyperlipidemic patients, compared to control group. The cholesterol lowering effect was accompanied by reductions of malondialdehyde, oxyLDL receptor LOX-1 and phosphoPKB, which are all biomarkers of oxidative vascular damage, in peripheral polymorphonuclear cells. Addition of BPF to rosuvastatin significantly enhanced rosuvastatin-induced effect on serum lipemic profile compared to rosuvastatin alone. This lipid-lowering effect was associated with significant reductions of biomarkers used for detecting oxidative vascular damage, suggesting a multi-action enhanced potential for BPF in patients on statin therapy.

Gorini S, Gatta L, Pontecorvo L, Vitiello L, la Sala A.

**Regulation of innate immunity by extracellular nucleotides.**

Am J Blood Res. 2013;3(1):14-28.

Extracellular ATP (eATP) is the most abundant among extracellular nucleotides and is commonly considered as a classical danger signal, which stimulates immune responses in the presence of tissue injury. In fact, increased nucleotide concentration in the extracellular space is generally closely associated with tissue stress or damage. However non-lytic nucleotide release may also occur in many cell types under a variety of conditions. Extracellular nucleotides are sensed by a class of plasma membrane receptors called P2 purinergic receptors (P2Rs). P2 receptors are expressed by all immunological cells and their activation elicits different responses. Extracellular ATP can act as an initiator or terminator of immune responses being able to induce different effects on immune cells depending on the pattern of P2 receptors engaged, the duration of the stimulus and its concentration in the extracellular milieu. Millimolar (high) concentrations of extracellular ATP, induce predominantly proinflammatory effects, while micromolar (low) doses exert mainly tolerogenic/immunosuppressive action. Moreover small, but significant differences in the pattern of P2 receptor expression in mice and humans confer diverse capacities of ATP in regulating the immune response.

Griffo R, Ambrosetti M, Tramarin R, Fattirolli F, Temporelli PL, Vestri AR, De Feo S, Tavazzi L; ICAROS investigators.

**Effective secondary prevention through cardiac rehabilitation after coronary revascularization and predictors of poor adherence to lifestyle modification and medication. Results of the ICAROS Survey.**

Int J Cardiol. 2013 Aug 20;167(4):1390-1395.

Secondary prevention is a priority after coronary revascularization. We investigate the impact of a cardiac rehabilitation (CR) program on lifestyle, risk factors and medication modifications and analyze predictors of poor behavioral changes and events in patients after coronary artery bypass grafting (CABG) or percutaneous coronary intervention (PCI).

Multicenter (n=62), prospective, longitudinal survey in post-CABG or -PCI consecutive patients after a comprehensive CR program. Cardiac risk factors, lifestyle habits, medication and 1 year cardiovascular events were collected. Logistic regression analyzed the association between risk factors, events and predictors of non-adherence to treatment and lifestyle.

At 1 year, of the 1262 patients ( $66 \pm 10$  years, CABG 69%, PCI 31%), 94% were taking antiplatelet agents (vs. 91.8% at CR admission and 91.7% at CR discharge,  $p=ns$ ), 87% statins (vs. 67.5%,  $p<.0001$ , and 86.3%,  $p=ns$ ), 80.7% beta-blockers (vs. 67.4%,  $p<.0001$ , and 88.8%,  $p=ns$ ), and 81.1% ACE inhibitors (vs. 57.5%  $p<.0001$ , and 77.7%,  $p=ns$ ). 89.9% of the patients showed good adherence to treatment, 72% adhered to diet and 51% to exercise recommendations; 74% of smokers stopped smoking. Younger age was predictive of smoking resumption (OR 8.9, CI 3.5-22.8). Pre-event sedentary lifestyle (OR 3.3, CI 1.3-8.7) was predictive of poor diet. Older patients with comorbidity (OR 3.1; CI, 1.8-5.2) tended to persist in sedentary lifestyle and discontinue therapy and diet recommendations. Age, diabetes, smoking and PCI indication were predictors of recurrent CV events which occurred in 142 patients.

Participation in CR results in excellent treatment after revascularization, as well as a

good lifestyle and medication adherence at 1 year and provides further confirmation of the benefit of secondary prevention. Several clinical characteristics may predict poor behavioral changes.

Gutzwiller FS, Pfeil AM, Comin-Colet J, Ponikowski P, Filippatos G, Mori C, Braunhofer PG, Szucs TD, Schwenkglenks M, Anker SD.

**Determinants of quality of life of patients with heart failure and iron deficiency treated with ferric carboxymaltose: FAIR-HF sub-analysis.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):3878-3883.

Heart failure (HF) is a burden to patients and health care systems. The objectives of HF treatment are to improve health related quality of life (HRQoL) and reduce mortality and morbidity. We aimed to evaluate determinants of health-related quality of life (HRQoL) in patients with iron deficiency and HF treated with intravenous (i.v.) iron substitution or placebo.

A randomised, double-blind, placebo-controlled trial (n = 459) in iron-deficient chronic heart failure (CHF) patients with or without anaemia studied clinical and HRQoL benefits of i.v. iron substitution using ferric carboxymaltose (FCM) over a 24-week trial period. Multivariate analysis was carried out with various clinical variables as independent variables and HRQoL measures as dependent variables.

Mean change from baseline of European Quality of Life - 5 Dimensions (EQ-5D) (value set-based) utilities (on a 0 to 100 scale) at week 24 was 8.91 (i.v. iron) and 0.68 (placebo;  $p < 0.01$ ). In a multivariate analysis excluding baseline HRQoL, a higher exercise tolerance and i.v. iron substitution positively influenced HRQoL, whereas impaired renal function and a history of stroke had a negative effect. The level of HRQoL was also influenced by country of residence. When baseline HRQoL was factored in, the multivariate model remained stable.

In this study, i.v. iron substitution, exercise tolerance, stroke, country of residence and renal function influenced measures of HRQoL in patients with heart failure and iron deficiency.

Habedank D, Meyer FJ, Hetzer R, Anker SD, Ewert R.

**Relation of respiratory muscle strength, cachexia and survival in severe chronic heart failure.**

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013 Dec;4(4):277-285.

Respiratory muscle (RM) function predicts prognosis in non-cachectic patients with chronic heart failure (CHF). We hypothesized that weakness of RM (maximum inspiratory mouth occlusion pressure, P<sub>imax</sub>) is a function of body mass index, and that outcome is more a function of BMI than of P<sub>imax</sub> or ventilatory drive (P<sub>0.1</sub>).

We enrolled 249 CHF patients (11.2 % female, median age 54.2 years) at the German Heart Institute Berlin. Patients were in NYHA classes I/II/III/IV by n=16/90/108/35. All patients underwent tests of pulmonary function, RM (P<sub>imax</sub>, P<sub>0.1</sub>), cardiopulmonary exercise testing (peakVO<sub>2</sub>, VE/VCO<sub>2</sub>-slope), and right heart catheterization.

Mean follow-up time was 18 (1-36) months, 47 patients (18.9 %) died or underwent cardiac assist implantation. P<sub>imax</sub> correlated weakly with BMI ( $r=0.19$ ), peakVO<sub>2</sub> ( $r=0.15$ ), and FEV<sub>1</sub> ( $r=0.34$ , all  $p<0.02$ ), and was lower in females compared to males ( $3.9\pm 1.7$  vs.  $6.6\pm 2.7$  kPa;  $p<0.001$ ). P<sub>0.1</sub> correlated with pulmonary pressure ( $\rho=0.2$ ;  $p<0.01$ ) and peakVO<sub>2</sub> ( $\rho=-0.14$ ;  $p<0.02$ ). Neither P<sub>imax</sub> [hazard ratio (HR) 0.98; confidence inter-

val (CI) 0.88-1.08] nor P0.1 (HR 0.52; 0.06-4.6) predicted survival. Multivariate regression analysis revealed gender, BMI, and FEV1 as cofactors of Pimax, with only BMI (HR 0.87; CI 0.80-0.95) predicting survival independently. The lowest quintile in BMI had the worst outcome (log-rank  $\chi^2=13.5$ ,  $p=0.009$ ). In CHF patients including cachexia and NYHA IV, Pimax does not predict survival. Pimax depends on gender, BMI, FEV1, and peakVO<sub>2</sub>, with only BMI and peakVO<sub>2</sub> predicting survival. The impaired Pimax in CHF might be a result of catabolism and weight loss and is not a predictive factor in itself.

Iellamo F, Caminiti G, Sposato B, Vitale C, Massaro M, Rosano G, Volterrani M.

### **Effect of High-Intensity interval training versus moderate continuous training on 24-h blood pressure profile and insulin resistance in patients with chronic heart failure.**

Intern Emerg Med. 2013 Jul 16. [Epub ahead of print]

In patients with chronic heart failure (CHF) blood pressure (BP) control, represents a relevant target of management. This study evaluated the effect of different intensities exercise training on 24-h ambulatory BP profile and insulin resistance in patients with CHF. Thirty-six CHF patients with left ventricular ejection fraction <40 %, were randomized to high-intensity interval training (HIT) or moderate continuous training (MIT) for 12 weeks. HIT consisted in treadmill exercise at ~75-80 % of heart rate reserve (HRR), alternated with active pauses at 45-50 % of HRR. MIT consisted in continuous treadmill at ~45-60 % of HRR. Peak VO<sub>2</sub> and anaerobic threshold increased significantly with both HIT and MIT, without significant differences between the two training programs. 24-h, systolic and diastolic BP decreased with both HIT and MIT. The same occurred for day-time and night-time systolic and diastolic BP. The decrease in day-time diastolic BP was slightly but significantly greater in HIT. Both HIT and MIT induced a significant decrease in fasting glucose and insulin, whereas HOMA-IR decreased significantly only after HIT. In patients with CHF exercise training reduces BP throughout the day, without substantial differences between moderate and more vigorous exercise intensity, with a small exception for day-time diastolic BP. HIT was more effective in improving insulin resistance.

Jehn M, Prescher S, Koehler K, von Haehling S, Winkler S, Deckwart O, Honold M, Sechtem U, Baumann G, Halle M, Anker SD\*, Koehler F.

### **Tele-accelerometry as a novel technique for assessing functional status in patients with heart failure: Feasibility, reliability and patient safety.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4723-4728.

The six-minute walk test (6MWT) is an established measure of functional exercise capacity associated with clinical prognosis in Chronic Heart Failure (CHF). The aim of this study is to evaluate the employment of tele-accelerometry for the remote assessment of 6MWT in CHF.

155 patients were subjected to tele-accelerometry in form of monthly 6MWTs in their home surroundings. Accelerometer output included steps/6 min and walking speed. Data was directly transferred via mobile network to the Telemedicine Centre subsequent to test completion. 6MWT distance was measured by hand wheel and steps were counted with a digital hand-counter at baseline (Test 1) and at 12 months follow-up (Test 2). Accelerometer accuracy was within the 99th percentile. There was a significant correlation between step count, walking speed and measured 6MWT distance (Test



1: steps:  $r=0.80$ ,  $P<0.001$ ; Test 2: steps:  $r=0.90$ ,  $P<0.001$  and Walking Speed Test 1:  $r=0.80$ ,  $P<0.001$ ; Walking Speed Test 2:  $r=0.86$ ,  $P<0.001$ ). The reproducibility of tele-accelerometry was within 95% margin for all performance parameters, which showed stronger associations to quality of life questionnaire (Short Form - 36) Physical Component Score (PCS) than New York Heart Association (NYHA) functional class.

Tele-accelerometry is feasible in patients with CHF and output parameters are indicative of exercise capacity. The benefit of this approach lies in its simplicity under every day circumstances by enabling routine performance testing to assess patients' functional status.

Kalici ska E, Wojtas K, Majda J, Doehner W, Haehling SV, Banasiak W, Ponikowska B, Borodulin-Nadziejka L, Anker SD, Ponikowski P, Jankowska EA.

### **Anabolic deficiencies in men with systolic heart failure: do co-morbidities and therapies really contribute significantly?**

Aging Male. 2013 Sep;16(3):123-131.

Deficiencies of anabolic hormones are common in men with heart failure (HF). It remains unclear whether the deranged metabolism of these hormones is the pathophysiological element of HF itself or is the consequence of co-morbidities or/and treatment in HF.

We examined 382 men with systolic HF. Serum hormones (i.e. total testosterone [TT], DHEAS, IGF-1) were assessed using immunoassays, serum free testosterone (eFT) - using the Vermeulen equation.

Prevalence of TT and eFT deficiencies was similar in men with HF aged  $<$  versus  $\geq 60$  years (23% and 32% for TT and eFT deficiencies). Deficiencies in DHEAS and IGF-1 were more common in younger (63% and 92%) than older patients (48% and 73%). In men  $< 60$  years, TT deficiency was accompanied by the therapy with digoxin, eFT deficiency - the therapy with digoxin and the presence of diabetes, DHEAS deficiency - the therapy with loop diuretic (all  $p < 0.05$ ). In men  $\geq 60$  years, TT deficiency - the therapy with loop diuretic, DHEAS deficiency - the therapy with spironolactone and digoxin, and hsCRP, IGF-1 deficiency - the high hsCRP (all  $p < 0.05$ ).

Deficiencies in anabolic hormones are common in younger and older men with HF. Some therapies (but not major co-morbidities) may contribute to anabolic deficiencies.

Kasner M, Aleksandrov AS, Westermann D, Lassner D, Gross M, von Haehling S, Anker SD, Schultheiss HP, Tschöpe C.

### **Functional iron deficiency and diastolic function in heart failure with preserved ejection fraction.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4652-4657.

Functional iron deficiency (FID) is an independent risk factor for poor outcome in advanced heart failure with reduced EF, but its role in heart failure with preserved EF (HFPEF) remains unclear. We aimed to investigate the impact of FID on cardiac performance determined by pressure-volume loop analysis in HFPEF.

26 HFPEF patients who showed an increase in LV stiffness by pressure-volume (PV) loop analysis obtained by conductance-catheterization, performed exercise testing, echocardiographic examination including tissue Doppler and determination of iron metabolism: serum iron, ferritin and transferrin saturation. HFPEF patients who provided ferritin  $< 100$   $\mu\text{g/l}$  or ferritin of 100-299  $\mu\text{g/l}$  in combination with transferrin saturation  $< 20\%$  were defined as having FID. In 14 patients the expression of transferrin receptor was

determined from available endomyocardial biopsies.

Fifteen out of 26 HFPEF patients showed FID without anemia. Compared to control subjects and HFPEF patients without FID, HFPEF patients with FID showed an up-regulation of the myocardial transferrin receptor expression ( $p < 0.05$ ). No differences between HFPEF patients with and without iron deficiency were found in heart dimensions, systolic and diastolic function obtained by PV-loop and echocardiography analysis. According to the linear regression analysis, LV stiffness was correlated with peak oxygen uptake ( $r = -0.636$ ,  $p < 0.001$ ) but not with the ferritin level or transferrin saturation. No relation was found between FID and exercise capacity. The association of LV stiffness with exercise performance was independent from the level of iron deficiency.

In non-anemic HFPEF patients, cardiac dysfunction and impaired exercise capacity occur independently of FID.

Knops M, Werner CG, Scherbakov N, Fiebach J, Dreier JP, Meisel A, Heuschmann PU, Jungehülsing GJ, von Haehling S, Dirnagl U, Anker SD, Doehner W.

**Investigation of changes in body composition, metabolic profile and skeletal muscle functional capacity in ischemic stroke patients: the rationale and design of the Body Size in Stroke Study (BoSSS).**

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2013 Sep;4(3):199-207.

Stroke is steadily increasing in prevalence. Muscle tissue wasting and functional changes are frequently observed in stroke, but this has not been studied in detail yet. There is a lack of data to support guideline recommendations on how to target muscle wasting in stroke patients. We hypothesise that pathophysiological metabolic profiles and muscle functional and structural impairment are developing in stroke patients, which are associated with stroke severity and outcome after stroke.

The Body Size in Stroke Study (BoSSS) is a prospective, longitudinal observation study that will explore associations between the metabolic profile, body tissue wasting and particular metabolic and functional changes in skeletal muscle tissue in stroke patients. Consecutive patients with acute stroke ( $n = 150$ ) will be enrolled due to lacunar or territorial ischemic infarct in the area of the middle cerebral artery. Patients will be studied at annual intervals after 12 and 24 months. For comparison, healthy controls of similar age and patients with chronic heart failure will be used as control groups. The main objective is to study changes in body composition in stroke patients. Secondary, the study will focus on changes in insulin sensitivity of adipose tissue and skeletal muscle. Furthermore, measurements of endothelial function and peripheral blood flow will provide insight in the vascular regulation in stroke patients.

This study will be the largest observational study providing insights into the metabolic and functional changes of muscle tissue in patients with acute ischemic stroke. The new data will increase our understanding of the pathophysiologic tissue wasting in stroke disease and help to develop new therapeutic strategies.

Lorenzen JM, Dietrich B, Fiedler J, Jazbutyte V, Fleissner F, Karpinski N, Weidemann F, Wanner C, Asan E, Caprio M, Ertl G, Bauersachs J, Thum T.

**Pathologic endothelial response and impaired function of circulating angiogenic cells in patients with Fabry disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Jan;108(1):311.

Fabry disease is an X-chromosomal recessive deficiency of the lysosomal hydrolase

alpha-galactosidase A (alpha-Gal). This results in an accumulation of globotriaosylceramide (GL-3) in a variety of cells often with subsequent functional impairment. Here, the impact of Fabry disease on the biology of circulating angiogenic cells (CACs) and the endothelial response to transient ischemia was investigated. Untreated patients with Fabry disease (n = 26), patients after initiation of alpha-Gal enzyme replacement therapy (ERT) (n = 16) and healthy controls (n = 26) were investigated. Endothelial function was assessed by the EndoPAT2000 device. CAC numbers were assessed by flow-cytometry, CAC function by a modified Boyden chamber assay. Fabry patients showed a pathologic endothelial response, which normalized after ERT. CACs were increased in number, but functionally impaired. Immunofluorescence and electron microscopy identified an accumulation of GL-3 in Fabry CACs. ERT attenuated CAC dysfunction and improved markers of oxidative stress response in Fabry patients via a reduction in GL-3 accumulation in vitro and in vivo. Silencing of alpha-Gal in healthy CACs impaired their migratory capacity underlining a key role of this enzyme for CAC function. CAC supernatant as well as CACs from Fabry patients impaired angiogenesis and migratory capacity of HUVECs providing a mechanistic link between CAC and endothelial dysfunction. CAC adhesion to TNF- $\alpha$  pre-stimulated HUVECs and tube formation was impaired by alpha-Gal knockdown. Fabry patients show a dysfunction of CAC and a pathologic endothelial response. ERT improves CAC and endothelial function and thus may attenuate development of cardiovascular disease in the long term in this patient population.

McGraw AP, Bagley J, Chen WS, Galayda C, Nickerson H, Armani A, Caprio M, Carmeliet P, Jaffe IZ.

**Aldosterone increases early atherosclerosis and promotes plaque inflammation through a placental growth factor-dependent mechanism.**

J Am Heart Assoc. 2013 Feb 22;2(1).

Aldosterone levels correlate with the incidence of myocardial infarction and mortality in cardiovascular patients. Aldosterone promotes atherosclerosis in animal models, but the mechanisms are poorly understood.

Aldosterone was infused to achieve pathologically relevant levels that did not increase blood pressure in the atherosclerosis-prone apolipoprotein E-knockout mouse (ApoE $^{-/-}$ ). Aldosterone increased atherosclerosis in the aortic root 1.8 $\pm$ 0.1-fold after 4 weeks and in the aortic arch 3.7 $\pm$ 0.2-fold after 8 weeks, without significantly affecting plaque size in the abdominal aorta or traditional cardiac risk factors. Aldosterone treatment increased lipid content of plaques (2.1 $\pm$ 0.2-fold) and inflammatory cell content (2.2 $\pm$ 0.3-fold), induced early T-cell (2.9 $\pm$ 0.3-fold) and monocyte (2.3 $\pm$ 0.3-fold) infiltration into atherosclerosis-prone vascular regions, and enhanced systemic inflammation with increased spleen weight (1.52 $\pm$ 0.06-fold) and the circulating cytokine RANTES (regulated and normal T cell secreted; 1.6 $\pm$ 0.1-fold). To explore the mechanism, 7 genes were examined for aldosterone regulation in the ApoE $^{-/-}$  aorta. Further studies focused on the proinflammatory placental growth factor (PlGF), which was released from aldosterone-treated ApoE $^{-/-}$  vessels. Activation of the mineralocorticoid receptor by aldosterone in human coronary artery smooth muscle cells (SMCs) caused the release of factors that promote monocyte chemotaxis, which was inhibited by blocking monocyte PlGF receptors. Furthermore, PlGF-deficient ApoE $^{-/-}$  mice were resistant to early aldosterone-induced increases in plaque burden and inflammation.

Aldosterone increases early atherosclerosis in regions of turbulent blood flow and promotes an inflammatory plaque phenotype that is associated with rupture in humans.

The mechanism may involve SMC release of soluble factors that recruit activated leukocytes to the vessel wall via PIGF signaling. These findings identify a novel mechanism and potential treatment target for aldosterone-induced ischemia in humans.

McMurray JJ, Packer M, Desai AS, Gong J, Lefkowitz MP, Rizkala AR, Rouleau J, Shi VC, Solomon SD, Swedberg K, Zile MR; PARADIGM-HF Committees and Investigators.

**Dual angiotensin receptor and neprilysin inhibition as an alternative to angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with chronic systolic heart failure: rationale for and design of the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF).**

Eur J Heart Fail. 2013 Sep;15(9):1062-73.

Although the focus of therapeutic intervention has been on neurohormonal pathways thought to be harmful in heart failure (HF), such as the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), potentially beneficial counter-regulatory systems are also active in HF. These promote vasodilatation and natriuresis, inhibit abnormal growth, suppress the RAAS and sympathetic nervous system, and augment parasympathetic activity. The best understood of these mediators are the natriuretic peptides which are metabolized by the enzyme neprilysin. LCZ696 belongs to a new class of drugs, the angiotensin receptor neprilysin inhibitors (ARNIs), which both block the RAAS and augment natriuretic peptides. Patients with chronic HF, NYHA class II-IV symptoms, an elevated plasma BNP or NT-proBNP level, and an LVEF of  $\leq 40\%$  were enrolled in the Prospective comparison of ARNI with ACEI to Determine Impact on Global Mortality and morbidity in Heart Failure trial (PARADIGM-HF). Patients entered a single-blind enalapril run-in period (titrated to 10 mg b.i.d.), followed by an LCZ696 run-in period (100 mg titrated to 200 mg b.i.d.). A total of 8436 patients tolerating both periods were randomized 1:1 to either enalapril 10 mg b.i.d. or LCZ696 200 mg b.i.d. The primary outcome is the composite of cardiovascular death or HF hospitalization, although the trial is powered to detect a 15% relative risk reduction in cardiovascular death.

PARADIGM-HF will determine the place of the ARNI LCZ696 as an alternative to enalapril in patients with systolic HF. PARADIGM-HF may change our approach to neurohormonal modulation in HF.

Mollace V, Gliozzi M, Carresi C, Musolino V, Oppedisano F.

**Re-assessing the mechanism of action of n-3 PUFAs.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 20;170(2 Suppl 1):S8-11.

Recent evidence has been accumulated showing that use of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFAs) produces significant benefits in counteracting many disease states, including coronary atherosclerosis, fatal arrhythmias and heart failure. Besides the mass of proposed pathophysiological mechanisms underlying the potential benefits of using n-3 PUFAs, identification of clear molecular targets or an appropriate dosing strategy for these compounds still remain to be better elucidated. On the other hand, whilst n-3 PUFAs have shown promise in all of these areas, results arising from clinical trials and 'real-world' evidence sometimes appear controversial. Here we report on recent advances in molecular targets identified for better assessment of the mode of action of these interesting compounds. In addition, some appealing hypotheses of their antioxidant properties will be discussed for better characterisation of their mode of action and potential use in health and disease.

Morley JE, Vellas B, Abellan van Kan G, Anker SD, Bauer JM, Bernabei R, Cesari M, Chumlea WC, Doehner W, Evans J, Fried LP, Guralnik JM, Katz PR, Malmstrom TK, McCarter RJ, Gutierrez Robledo LM, Rockwood K, von Haehling S, Vandewoude MF, Walston J.

**Frailty consensus: A call to action.**

Journal of the American Medical Directors Association. 2013 6;14(6):392-397.

Frailty is a clinical state in which there is an increase in an individual's vulnerability for developing increased dependency and/or mortality when exposed to a stressor. Frailty can occur as the result of a range of diseases and medical conditions. A consensus group consisting of delegates from 6 major international, European, and US societies created 4 major consensus points on a specific form of frailty: physical frailty. 1. Physical frailty is an important medical syndrome. The group defined physical frailty as "a medical syndrome with multiple causes and contributors that is characterized by diminished strength, endurance, and reduced physiologic function that increases an individual's vulnerability for developing increased dependency and/or death." 2. Physical frailty can potentially be prevented or treated with specific modalities, such as exercise, protein-calorie supplementation, vitamin D, and reduction of polypharmacy. 3. Simple, rapid screening tests have been developed and validated, such as the simple FRAIL scale, to allow physicians to objectively recognize frail persons. 4. For the purposes of optimally managing individuals with physical frailty, all persons older than 70 years and all individuals with significant weight loss (>5%) due to chronic disease should be screened for frailty.

Muscoli C, Dagostino C, Ilari S, Lauro F, Gliozzi M, Bardhi E, Palma E, Mollace V, Salve-mini D.

**Posttranslational nitration of tyrosine residues modulates glutamate transmission and contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated thermal hyperalgesia.**

Mediators Inflamm. 2013;2013. Epub 2013 Jun 20.

Activation of the N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) is fundamental in the development of hyperalgesia. Overactivation of this receptor releases superoxide and nitric oxide that, in turn, forms peroxynitrite (PN). All of these events have been linked to neurotoxicity. The receptors and enzymes involved in the handling of glutamate pathway--specifically NMDARs, glutamate transporter, and glutamine synthase (GS)--have key tyrosine residues which are targets of the nitration process causing subsequent function modification. Our results demonstrate that the thermal hyperalgesia induced by intrathecal administration of NMDA is associated with spinal nitration of GluN1 and GluN2B receptor subunits, GS, that normally convert glutamate into nontoxic glutamine, and glutamate transporter GLT1. Intrathecal injection of PN decomposition catalyst FeTM-4-PyP(5+) prevents nitration and overall inhibits NMDA-mediated thermal hyperalgesia. Our study supports the hypothesis that nitration of key proteins involved in the regulation of glutamate transmission is a crucial pathway used by PN to mediate the development and maintenance of NMDA-mediated thermal hyperalgesia. The broader implication of our findings reinforces the notion that free radicals may contribute to various forms of pain events and the importance of the development of new pharmacological tool that can modulate the glutamate transmission without blocking its actions directly.

Nasso G, Bonifazi R, Romano V, Brigiani MS, Fiore F, Bartolomucci F, Lamarra M, Fatouch K, Rosano G, Gaudio M, Spirito R, Gaudio C, Speziale G.

**Increased plasma homocysteine predicts arrhythmia recurrence after minimally invasive epicardial ablation for nonvalvular atrial fibrillation.**

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Oct;146(4):848-853.

Minimally invasive epicardial ablation via right minithoracotomy is an emerging option for patients with drug-refractory nonvalvular atrial fibrillation. To guide the development of rational treatment algorithms, factors predisposing to recurrence of arrhythmia need to be quantified and eventually treated. We addressed the association of the plasma levels of homocysteine and the recurrence of atrial fibrillation after minimally invasive ablation.

We obtained peripheral blood samples from 104 patients at follow-up after arrhythmia surgery; the homocysteine concentration was expressed as micromoles per liter. Prospective follow-up was conducted through electrocardiogram Holter monitoring (average  $18.5 \pm 5.8$  months). Stratified analysis (high vs low homocysteine) was based on the cutoff value for the last quartile of homocysteine concentration ( $16 \mu\text{mol/L}$ ). Time-to-event and diagnostic performance analyses were performed.

The rate of freedom from atrial fibrillation was 89.4% at the end of follow-up. Elevated circulating homocysteine level, persistent type of atrial fibrillation, and increased left atrial dimension independently predicted the recurrence of atrial fibrillation during the follow-up (adjusted Cox regression). Patients with a high homocysteine level were more likely to have atrial fibrillation recurrence (stratified Kaplan-Meier,  $P < .001$ ). The cutoff value for elevated homocysteine ( $16 \mu\text{mol/L}$ ) yielded a good diagnostic performance in the prediction of atrial fibrillation recurrence (area under the receiver operating characteristic curve, 0.807).

The homocysteine level measured during the follow-up reliably predicts the risk of recurrence after epicardial ablation of nonvalvular atrial fibrillation via minithoracotomy. Specific treatments to reduce plasma homocysteine could be considered in the future in these patients.

Nilsson PM, Boutouyrie P, Cunha P, Kotsis V, Narkiewicz K, Parati G, Rietzschel E, Scuteri A, Laurent S.

**Early vascular ageing in translation: from laboratory investigations to clinical applications in cardiovascular prevention.**

J Hypertens. 2013 Aug;31(8):1517-1526.

The ageing of the vascular tree is a fundamental reflection of biological ageing in general and a determinant of organ function. In the arterial wall this is characterized by a reduction in the elastin content, as well as by an increased content of collagen and its cross-linkages, leading to increased arterial stiffness and elevated central as well as brachial blood pressure, accompanied by increased SBP variability. In recent years a better understanding of these processes have led to the proposal of a condition named early vascular ageing (EVA) in patients with increased arterial stiffness for their age and sex. This is a condition that could increase cardiovascular risk and is associated with various degrees of cognitive dysfunction, as well as other features of biological ageing. This brief review aims to give an update on EVA and how the concept can be used in clinical practice.

Nistico S, Ventrice D, Dagostino C, Lauro F, Ilari S, Gliozzi M, Colica C, Musolino V, Carresi C, Strongoli MC, Vecchio I, Rizzo M, Mollace V, Muscoli C.

**Effect of Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin by photodynamically generated free radicals on SODs keratinocytes.**

J Biol Regul Homeost Agents. 2013 Jul-Sep;27(3):781-790.

Superoxide, a reactive form of oxygen, can be produced in vivo either in normal and under pathophysiologic conditions or by photosensitizing chemicals, as during photodynamic treatment. Photodynamic therapies (PDT), widely adopted in Dermatology and Oncology, are known to generate reactive oxygen species (ROS) and may contribute to structural alterations and oxidatively generated modifications of cellular antioxidants. We hypothesized that over-production of free radicals would decrease the enzymatic activities of endogenous cellular antioxidants. To test this hypothesis, keratinocytes were treated with the photosensitizer Photofrin plus visible light to produce free radicals and CuZnSOD and MnSOD activities were measured. Photodynamic treatment of keratinocytes increases malonylaldehyde production, nitrotyrosine staining and superoxide production. The enzymatic activities of CuZnSOD and MnSOD were significantly decreased after Photofrin plus visible light treatment. Our results suggest that the main cellular antioxidant system can be inactivated by photodynamically generated ROS. Pretreatment of keratinocytes with free radicals scavenger such as Mn (III) tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin (MnTBAP) was able to restore the endogenous antioxidant system activities, inhibiting the MDA formation, nitrotyrosine staining and superoxide formation. Antioxidant therapy could therefore be a useful tool in protecting healthy epidermal cells against common side effects induced by antitumor targeted therapies.

Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, Pani L, Pecorelli S, Sancarlo D, Scuteri A, Trifirò G, Vitale C, Zuccaro SM, Bernabei R, Fini M; the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA).

**High prevalence of poor quality drug prescribing in older individuals: a nationwide report from the Italian Medicines Agency (AIFA).**

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]

Poor quality of drug prescribing in older persons is often associated with increased drug-related adverse events, hospitalization, and mortality. The present study describes a set of prescribing quality indicators developed by the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA) and estimates their prevalence in the entire elderly ( $\geq 65$  years) population in Italy.

We performed a cross-sectional study using 2011 data from the OsMed (Osservatorio dei Medicinali) database, which comprises all prescribed drugs that are reimbursed by the Italian National Healthcare System. Yearly prevalence of drug prescribing quality indicators in the Italian older population ( $n = 12,301,537$ ) was determined.

Overall, 13 quality indicators addressing polypharmacy, adherence to treatment of chronic diseases, prescribing cascade, undertreatment, drug-drug interactions, and drugs to be avoided were identified. Polypharmacy was common, with more than 1.3 million individuals taking greater than or equal to 10 drugs (11.3% of the study population). The prevalence of low adherence and undertreatment was also elevated and increased with advancing age, with highest prevalence occurring in individuals aged 85 years and older. Prevalence was less than 3% for quality indicators assessing the prescribing cascade, drug-drug interactions, and drugs to be avoided.

These results confirm the high frequency of suboptimal drug prescribing in older adults, using a database that covers the whole Italian population. In general, this descriptive study may help in prioritizing strategies aimed at improving the quality of prescribing in elderly population.

Onder G, Liperoti R, Foebel A, Fialova D, Topinkova E, van der Roest HG, Gindin J, Cruz-Jentoft AJ, Fini M, Gambassi G, Bernabei R; SHELTER project.

**Polypharmacy and mortality among nursing home residents with advanced cognitive impairment: results from the shelter study.**

J Am Med Dir Assoc. 2013 Jun;14(6):450.e7-450.e12. Epub 2013 May 4.

Older adults with advanced cognitive impairment have a limited life expectancy and the use of multiple drugs is of questionable benefit in this population. The aim of the present study was to assess if, in a sample of nursing home (NH) residents with advanced cognitive impairment, the effect of polypharmacy on mortality differs depending on estimated life expectancy.

Data were from the Services and Health for Elderly in Long TERM care (SHELTER) project, a study collecting information on residents admitted to 57 NHs in 8 European countries. Polypharmacy was defined as the concomitant use of 10 or more drugs. Limited life expectancy was estimated based on an Advanced Dementia Prognostic Tool (ADEPT) score of 13.5 or more. A Cognitive Performance Scale score of 5 or more was used to define advanced cognitive impairment. Participants were followed for 1 year.

Mean age of 822 residents with advanced cognitive impairment entering the study was 84.6 (SD 8.0) years, and 630 (86.6%) were women. Overall, 123 participants (15.0%) had an ADEPT score of 13.5 or more (indicating limited life expectancy) and 114 (13.9%) were on polypharmacy. Relative to residents with ADEPT score less than 13.5, those with ADEPT score of 13.5 or higher had a lower use of benzodiazepines, antidementia drugs, and statins but a higher use of beta-blockers, digoxin, and antibiotics. Polypharmacy was associated with increased mortality among residents with ADEPT score of 13.5 or more (adjusted hazard ratio [HR] 2.19, 95% confidence interval [CI]: 1.15-4.17), but not among those with ADEPT score less than 13.5 (adjusted HR 1.10, 95% CI: 0.71-1.71).

Polypharmacy is associated with increased mortality in NH residents with advanced cognitive impairment at the end of life.

These findings underline the need to assess life expectancy in older adults to improve the prescribing process and to simplify drug regimens.

Palus S, von Haehling S, Doehner W, Datta R, Zhang J, Dong JZ, Culler MD, Anker SD, Springer J.

**Effect of application route of the ghrelin analog BIM-28131 (RM-131) on body weight and body composition in a rat heart failure model.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):2369-2374.

Chronic heart failure (CHF) remains one of the most challenging diseases in terms of numbers and disease management, particularly so, if the CHF patient develops cardiac cachexia. Ghrelin and its analogs have been suggested to improve body weight and cardiac function in heart failure models and exploratory human clinical studies. However, most ghrelin compounds are peptides and need to be injected several times per day, which affects the quality of life of patients. Here, we compared two application routes, three times daily subcutaneous (sc) injections to continuous infusion using osmotic



mini-pumps in a rat model of CHF. Moreover, the effects were also compared to three times daily sc injections of growth hormone (GH). Rats were treated for 28 d. The results show that treatment with 50 or 100 nmol/kg/d BIM-28131 (RM-131) potently induces body weight gain, fat and lean mass compared to placebo. The gain of lean mass was equal to the gain of lean mass in the 2mg/kg/d GH group and superior to 250 µg/kg/d GH. Both GH and BIM-28131 increased levels of insulin-like growth factor-1 to a similar extent. Little effect was seen on cardiac function; only cardiac output was improved by either high dose BIM-28131 or GH. Overall the effects of BIM-28131 were similar in both application routes.

Palus S, von Haehling S, Flach VC, Tschirner A, Doehner W, Anker SD, Springer J.  
**Simvastatin reduces wasting and improves cardiac function as well as outcome in experimental cancer cachexia.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):3412-3418.

Chronic inflammation is common in cancer cachexia (CC) and directly involved in the atrophy seen in this condition. Recently, several groups have described a form of cardiomyopathy in CC animal models. Hence, we investigated the effect of simvastatin with its known anti-inflammatory and cardioprotective effects in a rat model of CC. Juvenile Wister Han rats (weight approx. 200 g) were inoculated with Yoshida AH-130 hepatoma cells and treated once daily with 0.1, 1, 10 or 20 mg/kg/d simvastatin or placebo for 14 days. Body weight and body composition (NMR) were assessed at baseline and at the end of the study. Cardiac function was analysed by echocardiography at baseline and day 11. Tumour-bearing, placebo-treated rats lost  $47.9 \pm 3.8$  g of their initial body weight. Treatment with 0.1, 1, 10 or 20 mg/kg/d simvastatin significantly reduced wasting by 39.6%, 47.6%, 28.5% and 35.4%, respectively (all  $p < 0.05$  vs. placebo). This was mainly due to reduced atrophy of lean mass, i.e. muscle mass. Cardiac function was significantly improved, e.g. cardiac output (untreated sham: 78.9 mL/min) was severely impaired in tumour-bearing rats (42.4 mL/min) and improved by 1, 10 or 20 mg/kg/d simvastatin (62.2, 59.0 and 57.0 mL/min, respectively, all  $p < 0.05$  vs. placebo). Most importantly, 10 or 20 mg/kg/d simvastatin reduced mortality (HR:0.16, 95%CI:0.04-0.76,  $p=0.021$  and HR:0.16, 95%CI:0.03-0.72,  $p=0.017$  vs placebo, respectively). Simvastatin attenuated loss of body weight as well as muscle mass and improved cardiac function leading to improved survival in this CC model. Simvastatin may be beneficial in a clinical setting to treat CC.

Patel K, Sui X, Zhang Y, Fonarow GC, Aban IB, Brown CJ, Bittner V, Kitzman DW, Allman RM, Banach M, Aronow WS, Anker SD, Blair SN, Ahmed A.

**Prevention of heart failure in older adults may require higher levels of physical activity than needed for other cardiovascular events.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):1905-1909.

Little is known if the levels of physical activity required for the prevention of incident heart failure (HF) and other cardiovascular events vary in community-dwelling older adults. We studied 5503 Cardiovascular Health Study (CHS) participants, age  $\geq 65$  years, free of baseline HF. Weekly metabolic equivalent task-minutes (MET-minutes), estimated using baseline total leisure-time energy expenditure, were used to categorize participants into four physical activity groups: inactive (0 MET-minutes;  $n=489$ ; reference), low (1-499;  $n=1458$ ), medium (500-999;  $n=1086$ ) and high ( $\geq 1000$ ;  $n=2470$ ). Participants had a

mean ( $\pm$  SD) age of 73 ( $\pm$  6) years, 58% were women, and 15% African American. During 13 years of follow-up, centrally-adjudicated incident HF occurred in 26%, 23%, 20%, and 19% of participants with no, low, medium and high physical activity, respectively (trend  $p < 0.001$ ). Compared with inactive older adults, age-sex-race-adjusted hazard ratios (95% confidence intervals) for incident HF associated with low, medium and high physical activity were 0.87 (0.71-1.06;  $p = 0.170$ ), 0.68 (0.54-0.85;  $p = 0.001$ ) and 0.60 (0.49-0.74;  $p < 0.001$ ), respectively (trend  $p < 0.001$ ). Only high physical activity had significant independent association with lower risk of incident HF (HR, 0.79; 95% CI, 0.64-0.97;  $p = 0.026$ ). All levels of physical activity had significant independent association with lower risk of incident acute myocardial infarction (AMI), stroke and cardiovascular mortality. In community-dwelling older adults, high level of physical activity was associated with lower risk of incident HF, but all levels of physical activity were associated with lower risk of incident AMI, stroke, and cardiovascular mortality.

Pelliccia F, Marazzi G, Greco C, Franzoni F, Speziale G, Gaudio C.

### **Current evidence and future perspectives on n-3 PUFAs.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 20;170(2 Suppl 1):S3-7. Epub 2013 Jul 19.

The family of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which can be found in most lipid classes, includes n-3 PUFAs essential for mammals and whose deficiency is associated with multiple diseases. Because of their multiple physiological actions, n-3 PUFAs play a crucial role in normal human metabolism as well as maintenance of a healthy status, with clinical effects that are not limited to the cardiovascular system but also include maternal and offspring health, growth and development, immune system disorders, cancer, cognitive function and psychological status. Multiple health organisations and scientific societies recommend increasing food-derived n-3 PUFA intake and also suggest that patients with documented coronary heart disease receive a minimum of 1000 mg/day of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. The preventive and therapeutic effects of n-3 PUFAs appear to be largely dependent on the dosages employed and the characteristics of selected patients. So, in the era of personalised medicine, the time has come to move from generic advice to increase n-3 PUFA intake to a more evidence-based approach characterised by tailored indications to n-3 PUFA dietary or supplement consumption. This approach will require evaluation on a case-to-case basis the potential usefulness of n-3 PUFAs, taking into consideration their 'pleiotropic effects', the optimal dose for any given indication in relation to international guidelines, potential interactions with background therapy, possible side effects, differences in genetics and dietary response to supplementation, and the cost:benefit ratio, which is likely to vary as a function of differences in the range of fish intake in the diet.

Pelliccia F, Pasceri V, Rosano G, Pristipino C, Roncella A, Speciale G, Pannarale G, Schiavriti M, Greco C, Gaudio C.

### **Endothelial progenitor cells predict long-term prognosis in patients with stable angina treated with percutaneous coronary intervention.**

Circ J. 2013 Jun 25;77(7):1728-1735.

The association between endothelial progenitor cells (EPCs) at the time of percutaneous coronary intervention (PCI) and the subsequent long-term clinical outcome remains undefined. To address this issue, a pre-specified analysis of the PROgenitor Cells role in Restenosis and progression of coronary Atherosclerosis after percutaneous coronary

intervention (PROCREATION) study was done. total of 155 patients with stable angina treated with PCI had flow cytometry before PCI. Patients had a 5-year follow-up. Primary outcome was the composite of major adverse cardiac or cerebrovascular events (MACCE), that is, death, stroke, myocardial infarction, and revascularization. During follow-up, MACCE occurred in 65 of 155 patients (42%). There were no significant differences in clinical and angiographic variables between patients with or without MACCE, apart from a different extent of coronary atherosclerosis. The incidence of MACCE increased significantly over tertiles of CD34+/KDR+/CD45- cells and CD133+/KDR+/CD45- cells, with rates of 25%, 39%, and 69% ( $P=0.0001$ ), and 26%, 44%, and 59% ( $P=0.003$ ), respectively. On multivariate analysis it was estimated that the increase in CD34+/KDR+/CD45- cells was associated with a 35% higher risk for MACCE (hazard ratio [HR], 1.75; 95% confidence interval [CI]: 1.07-1.99;  $P=0.001$ ), and the increase in CD133+/KDR+/CD45- cells was associated with a 25% higher risk for MACCE (HR, 1.35; 95% CI: 1.01-1.74;  $P=0.03$ ). Assessment of subpopulations of circulating EPCs in patients with stable angina treated with PCI can improve characterization of long-term prognosis.

Pikilidou MI, Yavropoulou MP, Scuteri A.

### **Can antihypertensives interfere with the vicious cycle between hypertension and vascular calcification?**

Cardiovasc Drugs Ther. 2014 Feb;28(1):61-71.

Vascular calcification is a phenomenon of disturbed calcium deposition, as part of the calcium that is supposed to be deposited to our bones, is lodged to our vessels. There are two forms of vascular calcification, each with a distinct anatomical distribution and clinical relevance, namely the intimal and medial calcification. Studies have demonstrated that hypertension may cause vascular calcification but also that both types of calcification, especially medial, promote arterial rigidity and hence hypertension. Implications of this two-way road are largely unknown as there is no consensus yet on their exact clinical value. However, several antihypertensive medications seem to be able to interfere with the cycle of high blood pressure and vascular calcium deposits. The present review summarizes the up-to-date data regarding the effect of antihypertensive medication on vascular calcification.

Pullicino PM, Thompson JL, Sacco RL, Sanford AR, Qian M, Teerlink JR, Haddad H, Diek M, Freudenberger RS, Labovitz AJ, Di Tullio MR, Lok DJ, Ponikowski P, Anker SD, Graham S, Mann DL, Mohr JP, Homma S; WARCEF Investigators.

### **Stroke in heart failure in sinus rhythm: the Warfarin versus Aspirin in reduced cardiac ejection fraction trial.**

Cerebrovasc Dis. 2013 Jul 30;36(1):74-78. [Epub ahead of print]

The Warfarin versus Aspirin in Reduced Cardiac Ejection Fraction trial found no difference between warfarin and aspirin in patients with low ejection fraction in sinus rhythm for the primary outcome: first to occur of 84 incident ischemic strokes (IIS), 7 intracerebral hemorrhages or 531 deaths. Prespecified secondary analysis showed a 48% hazard ratio reduction ( $p = 0.005$ ) for warfarin in IIS. Cardioembolism is likely the main pathogenesis of stroke in heart failure. We examined the IIS benefit for warfarin in more detail in post hoc secondary analyses. We subtyped IIS into definite, possible and noncardioembolic using the Stroke Prevention in Atrial Fibrillation method. Statistical tests, stratified by prior ischemic stroke or transient ischemic attack, were the conditional binomial for

independent Poisson variables for rates, the Cochran-Mantel-Haenszel test for stroke subtype and the van Elteren test for modified Rankin Score (mRS) and National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) distributions, and an exact test for proportions.

Twenty-nine of 1,142 warfarin and 55 of 1,163 aspirin patients had IIS. The warfarin IIS rate (0.727/100 patient-years, PY) was lower than for aspirin (1.36/100 PY,  $p = 0.003$ ). Definite cardioembolic IIS was less frequent on warfarin than aspirin (0.22 vs. 0.55/100 PY,  $p = 0.012$ ). Possible cardioembolic IIS tended to be less frequent on warfarin than aspirin (0.37 vs. 0.67/100 PY,  $p = 0.063$ ) but noncardioembolic IIS showed no difference: 5 (0.12/100 PY) versus 6 (0.15/100 PY,  $p = 0.768$ ). Among patients experiencing IIS, there were no differences by treatment arm in fatal IIS, baseline mRS, mRS 90 days after IIS, and change from baseline to post-IIS mRS. The warfarin arm showed a trend to a lower proportion of severe nonfatal IIS [mRS 3-5; 3/23 (13.0%) vs. 16/48 (33.3%),  $p = 0.086$ ]. There was no difference in NIHSS at the time of stroke ( $p = 0.825$ ) or in post-IIS mRS ( $p = 0.948$ ) between cardioembolic, possible cardioembolic and noncardioembolic stroke including both warfarin and aspirin groups. The observed benefits in the reduction of IIS for warfarin compared to aspirin are most significant for cardioembolic IIS among patients with low ejection fraction in sinus rhythm. This is supported by trends to lower frequencies of severe IIS and possible cardioembolic IIS in patients on warfarin compared to aspirin

Rogler G, Rosano G.

### **The heart and the gut.**

Eur Heart J. 2013 Jul 17. [Epub ahead of print]

The heart and the gut seem to be two organs that do not have much in common. However, there is an obvious and clinically relevant impact of gut functions on the absorption of drugs and oral therapies on the one hand. On the other hand, the gut determines the quantity of nutrient uptake and plays a central role in metabolic diseases. Patients with inflammatory bowel diseases appear to have a higher risk for coronary heart disease despite a lower prevalence of 'classical' risk factors, indicating additional links between the gut and the heart. However, they certainly have a 'leaky' intestinal barrier associated with increased permeability for bacterial wall products. An impaired intestinal barrier function will be followed by bacterial translocation and presence of bacterial products in the circulation, which can contribute to atherosclerosis and chronic heart failure (CHF) as recent data indicate. Impaired cardiac function in CHF vice versa impacts intestinal microcirculation leading to a barrier defect of the intestinal mucosa and increased bacterial translocation. These pathways and the most recent insights into the impact of the gut on acute and chronic heart disease will be discussed in this review.

Salvemini D, Kim SF, Mollace V.

Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013 Apr 1;304(7):R473-487.

The nitric oxide (NO) and cyclooxygenase (COX) pathways share a number of similarities. Nitric oxide is the mediator generated from the NO synthase (NOS) pathway, and COX converts arachidonic acid to prostaglandins, prostacyclin, and thromboxane A<sub>2</sub>. Two major forms of NOS and COX have been identified to date. The constitutive isoforms critically regulate several physiological states. The inducible isoforms are overexpressed during inflammation in a variety of cells, producing large amounts of NO and prostaglandins, which may underlie pathological processes. The cross-talk between the

COX and NOS pathways was initially reported by Salvemini and colleagues in 1993, when they demonstrated in a series of in vitro and in vivo studies that NO activates the COX enzymes to produce increased amounts of prostaglandins. Those studies led to the concept that COX enzymes represent important endogenous "receptor" targets for amplifying or modulating the multifaceted roles of NO in physiology and pathology. Since then, numerous studies have furthered our mechanistic understanding of these interactions in pathophysiological settings and delineated potential clinical outcomes. In addition, emerging evidence suggests that the canonical nitroxidative species (NO, superoxide, and/or peroxynitrite) modulate biosynthesis of prostaglandins through non-COX-related pathways. This article provides a comprehensive state-of-the art overview in this area.

Savarese G, Costanzo P, Cleland JG, Vassallo E, Ruggiero D, Rosano G, Perrone-Filardi P.

**A meta-analysis reporting effects of Angiotensin-converting enzyme inhibitors and Angiotensin receptor blockers in patients without heart failure.**

J Am Coll Cardiol. 2013 Jan 15;61(2):131-142.

The goal of the study was to assess the effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACE-Is) and angiotensin receptor blockers (ARBs) on the composite of cardiovascular (CV) death, myocardial infarction (MI), and stroke, and on all-cause death, new-onset heart failure (HF), and new-onset diabetes mellitus (DM) in high-risk patients without HF. ACE-Is reduce CV events in high-risk patients without HF whereas the effects of ARBs are less certain. Twenty-six randomized trials comparing ARBs or ACE-Is versus placebo in 108,212 patients without HF were collected in a meta-analysis and analyzed for the risk of the composite outcome, all-cause death, new-onset HF, and new-onset DM. ACE-Is significantly reduced the risk of the composite outcome (odds ratio [OR]: 0.830 [95% confidence interval (CI): 0.744 to 0.927];  $p = 0.001$ ), MI (OR: 0.811 [95% CI: 0.748 to 0.879];  $p < 0.001$ ), stroke (OR: 0.796 [95% CI: 0.682 to 0.928];  $p < 0.004$ ), all-cause death (OR: 0.908 [95% CI: 0.845 to 0.975];  $p = 0.008$ ), new-onset HF (OR: 0.789 [95% CI: 0.686 to 0.908];  $p = 0.001$ ), and new-onset DM (OR: 0.851 [95% CI: 0.749 to 0.965];  $p < 0.012$ ). ARBs significantly reduced the risk of the composite outcome (OR: 0.920 [95% CI: 0.869 to 0.975],  $p = 0.005$ ), stroke (OR: 0.900 [95% CI: 0.830 to 0.977],  $p = 0.011$ ), and new-onset DM (OR: 0.855 [95% CI: 0.798 to 0.915];  $p < 0.001$ ). In patients at high CV risk without HF, ACE-Is and ARBs reduced the risk of the composite outcome of CV death, MI, and stroke. ACE-Is also reduced the risk of all-cause death, new-onset HF, and new-onset DM. Thus, ARBs represent a valuable option to reduce CV mortality and morbidity in patients in whom ACE-Is cannot be used.

Savarese G, Ferri C, Trimarco B, Rosano G, Dellegrottaglie S, Losco T, Casaretti L, D'Amore C, Gambardella F, Prastaro M, Rengo G, Leosco D, Perrone-Filardi P.

**Changes in serum uric acid levels and cardiovascular events: A meta-analysis.**

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2013 Aug;23(8):707-714.

The association between serum uric acid (SUA) levels and cardiovascular (CV) risk or all-cause death has been repeatedly reported. However, it has not been assessed whether reduction of SUA levels is associated with reduced CV risk. The aim of the current study was to evaluate the relationship between changes of SUA levels and CV events as well as all-cause death. Randomised trials reporting SUA at baseline and at the end

of follow-up and clinical end-points (all-cause death, myocardial infarction (MI), stroke, heart failure (HF) and CV death) were included in the study. Meta-regression analysis was performed to test the relationship between SUA changes and clinical end-points. Eleven trials enrolling 21,373 participants followed up for  $2.02 \pm 1.76$  years and reporting 4533 events were included. In meta-regression analysis, no relationship between SUA changes from baseline to end of follow-up and the composite outcome including CV death, stroke, MI and HF was found (change in Tau(2) (t) = -0.64; p Tau (p) = 0.541). Similarly, no relationship was found between SUA changes and single components of the composite outcome (MI: t = -0.83; p = 0.493; stroke: t = 0.46; p = 0.667; HF: t = 2.44; p = 0.162; CV death: t = -0.54; p = 0.614) and all-cause death (t = -0.72; p = 0.496). Results were confirmed by sensitivity analysis. No heterogeneity among studies or publication bias was detected. Changes in SUA levels observed during pharmacologic treatments do not predict the risk of all-cause death or CV events. As SUA levels are associated with increased CV risk, additional studies with direct xanthine-oxidase inhibitors are requested.

Savarese G, Rosano G, D'Amore C, Musella F, Della Ratta GL, Pellegrino AM, Formisano T, Vitagliano A, Cirillo A, Cice G, Fimiani L, Del Guercio L, Trimarco B, Perrone-Filardi P. **Effects of ranolazine in symptomatic patients with stable coronary artery disease. A systematic review and meta-analysis.**

Int J Cardiol. 2013 Nov 15;169(4):262-270.

Ranolazine (R), as add-on therapy in symptomatic patients with chronic stable coronary artery disease (CAD), has been tested in randomized clinical studies. Aim of the study was to assess in a meta-analysis the effects of R on angina, nitroglycerin consumption, functional capacity, electrocardiographic signs of ischemia and hemodynamic parameters in patients with chronic CAD.

Randomized trials assessing the effects of R compared to control on exercise duration, time to onset of angina, time to 1mm ST-segment depression, weekly nitroglycerin consumption and weekly angina frequency were included in the analysis. The effects of R compared to control on heart rate and blood pressure were also analyzed.

Six trials enrolling 9223 patients were included in the analysis. At trough and peak levels, R compared to control significantly improved exercise duration, time to onset of angina and time to 1mm ST-segment depression. Additionally, R compared to control significantly reduced weekly angina frequency and weekly nitroglycerin consumption. Finally, R compared to control did not significantly reduce supine systolic and diastolic blood pressure as well as heart rate, standing heart rate and diastolic blood pressure, whereas it modestly reduced standing systolic blood pressure. At sensitivity analysis, results were not influenced by concomitant background therapy.

In symptomatic patients with chronic CAD, R, added to conventional therapy, effectively reduces angina frequency and sublingual nitroglycerin consumption while prolonging exercise duration as well as time to onset of ischemia and to onset of angina with no substantial effects on blood pressure and heart rate.

Scherbakov N, Anker SD, Dirnagl U, Doehner W.

**Stroke induced sarcopenia: muscle wasting and disability after stroke.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 10;170(2):89-94.

Stroke is the second leading cause of death and the leading cause of disability in We-

stern countries. More than 60% of patients remain disabled, 50% of patients suffer from hemiparesis and 30% remain unable to walk without assistance. The skeletal muscle is the main effector organ accountable for disability in stroke. This disability is primarily attributed to the brain lesion; however less attention is paid to structural, metabolic and functional alterations of muscle tissue after stroke. Hemiparetic stroke leads to various muscle abnormalities: A combination of denervation, disuse, inflammation, remodelling and spasticity accounts for a complex pattern of muscle tissue phenotype change and atrophy. The molecular mechanisms of muscle degradation after stroke are only incompletely understood. Reinnervation, fibre-type shift, disuse atrophy, and local inflammatory activation are only some of the key features yet to be explained. Only limited data is available today on clinical muscle changes after stroke that results from few studies in a mere 500 patients. Despite its importance for optimum post stroke recovery, stroke-related sarcopenia is not considered in current guidelines for stroke therapy or rehabilitation and measurement tools to address sarcopenia are infrequently used. This lack of robust evidence on muscle pathology after stroke and on treatment strategies needs to be addressed in an interdisciplinary integrated approach. This review provides an overview on current pathophysiologic insights and on clinical relevance of sarcopenia in stroke patients and on measurement tools to address the problem in the clinical setting.

Scuteri A, Tesouro M, Guglini L, Lauro D, Fini M, Di Daniele N.

**Aortic stiffness and hypotension episodes are associated with impaired cognitive function in older subjects with subjective complaints of memory loss.**

Int J Cardiol. 2013 Nov 20;169(5):371-377.

Though CV risk factors and markers of arterial aging are recognized risky for cognition, no study has simultaneously investigated the impact of multiple cardiac, arterial (large and small vessels), and hemodynamic parameters on cognitive function in older subjects.

Two hundred eighty older subjects with subjective complaints of memory loss and no previous stroke (mean age  $78.3 \pm 6.3$  years) were studied. Global cognitive function was evaluated with the Mini-Mental State Examination (MMSE). Cognitive impairment was defined as a MMSE  $< 21$ . We measured: traditional CV risk factors; aorta stiffness (Pulse Wave Velocity, PWV); LV mass; presence of WML at neuroimaging; episodes of hypotension (SBP  $< 100$  mmHg during 24 h Ambulatory Blood Pressure Monitoring).

In both cross-sectional and longitudinal analyses PWV, WML, and episodes of hypotension were significantly associated with poorer cognitive function-controlling for age, sex, education, depression, traditional CV risk factors, and medications. LV mass was no longer associated with cognition in multiple regression. Older subjects with stiffer arteries or episodes of hypotension presented a 4-fold and an 11-fold, respectively, greater odds for progression from normal cognitive function to cognitive impairment. A synergistic effect between PWV, WML, and hypotension was observed: the occurrence of any two of PWV, WML, or hypotension was accompanied by lower MMSE; in the presence of all three factors, a further significant decline in cognitive function was observed. Systemic hemodynamic parameters (higher PWV and hypotension) together with cerebral microvascular damage (WML) are significantly associated with poorer cognitive function and may identify older subjects with subjective complaints of memory loss at higher risk of cognitive decline.

Shewan LG, Rosano G, Henein M, Coats AJ.

## **A statement on ethical standards in publishing scientific articles in the International Journal of Cardiology family of journals.**

Int J Cardiol. 2012 Nov 29;161(3):124-125.

All authors of manuscripts in the International Journal of Cardiology are required to make a binding statement that they as authors adhere to the following principles: 1. That the corresponding author has the approval of all other listed authors for the submission and publication of all versions of the manuscript. 2. That all people who have the right to be recognised as authors have been included on the list of authors and everyone listed as an author has made an independent material contribution to the manuscript. 3. That the work submitted in the manuscript is original and has not been published elsewhere and is not presently under consideration of publication by any other journal other than in oral, poster or abstract format. 4. That the material in the manuscript has been acquired according to modern ethical standards and has been approved by the legally appropriate ethical committee. 5. That the article does not contain material copied from anyone else without their written permission and that all material which derives from prior work, including from the same authors, is properly attributed to the prior publication by proper citation. 6. That all material conflicts of interest have been declared including the use of paid medical writers and their funding source. 7. That the manuscript will be maintained on the servers of the journal and held to be a valid publication by the journal only as long as all statements in these principles remain true. 8. That if any of the statements above ceases to be true the authors have a duty to notify the journal as soon as possible so that the manuscript can be withdrawn.

Szabó T, Scherbakov N, Sandek A, Kung T, von Haehling S, Lainscak M, Jankowska EA, Rudovich N, Anker SD, Frystyk J, Flyvbjerg A, Pfeiffer AF, Doehner W.

### **Plasma adiponectin in heart failure with and without cachexia: catabolic signal linking catabolism, symptomatic status, and prognosis.**

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2014 Jan;24(1):50-56.

Adiponectin (ADPN) as an adipose tissue hormone contributes to regulation of energy metabolism and body composition and is associated with cardiovascular risk profile parameters. Cardiac cachexia may develop as a result of severe catabolic derangement in chronic heart failure (CHF). We aimed to determinate an abnormal ADPN regulation as a link between catabolic signalling, symptomatic deterioration and poor prognosis. We measured plasma ADPN in 111 CHF patients (age  $65 \pm 11$ , 90% male, left ventricular ejection fraction (LVEF)  $36 \pm 11\%$ , peak oxygen consumption (peakVO<sub>2</sub>)  $18.1 \pm 5.7$  l/kg\*min, body mass index (BMI)  $27 \pm 4$  kg/m<sup>2</sup>, all mean  $\pm$  standard deviation) and 36 healthy controls of similar age and BMI. Body composition was assessed by dual energy X-ray absorptiometry, insulin sensitivity was evaluated by homoeostasis model assessment, exercise capacity by spiroergometry. Plasma ADPN did not differ between CHF vs. controls ( $13.5 \pm 11.0$  vs.  $10.5 \pm 5.3$  mg/l,  $p > 0.4$ ), but increased stepwise with NYHA functional class (I/II/III:  $5.7 \pm 1.4/10.7 \pm 8.3/19.2 \pm 14.0$  mg/l, ANOVA  $p < 0.01$ ). Furthermore, ADPN correlated with VO<sub>2</sub> at anaerobic threshold ( $r = -0.34$ ,  $p < 0.05$ ). ADPN was highest in cachectic patients (cCHF, 16%) vs. non-cachectic (ncCHF) ( $18.7 \pm 15.0$  vs.  $12.5 \pm 9.9$  mg/l;  $p < 0.05$ ). ADPN indicated mortality risk independently of established prognosticators (HR: 1.04 95% CI: 1.02-1.07;  $p < 0.0001$ ). ADPN above the mean (13.5 mg/l) was associated with a 3.4 times higher mortality risk in CHF vs. patients with ADPN levels below the mean.



Circulating ADPN is abnormally regulated in CHF. ADPN may be involved in impaired metabolic signalling linking disease progression, tissue wasting, and poor outcome in CHF.

Spoletini I, Caprio M, Vitale C, Rosano GM.

**Androgens and cardiovascular disease: gender-related differences.**

Menopause International. 2013 Jun;19(2):82-86.

Androgens are known to play a pivotal role in cardiovascular function. However, a definitive explanation as to how their impact differs between genders is yet to be provided. In this review, the existing studies on the link between androgens and cardiovascular disease have been analysed, with a particular focus on the gender-specific differences. Several studies agree that both direct and indirect effects of testosterone on cardiovascular function show a gender-related dimorphism. Consistently, men and women display different responses to androgen supplementation treatment. Post-menopausal women may particularly benefit from testosterone supplementation therapy. Future studies should further clarify the optimal dose and route of administration of testosterone, and more women should be included in clinical trials, in order to identify novel gender-specific targets, and finally to develop therapeutic strategies.

Springer J, Tschirner A, Haghikia A, von Haehling S, Lal H, Grzesiak A, Kaschina E, Palus S, Pötsch M, von Websky K, Hoher B, Latouche C, Jaisser F, Orawietz L, Coats AJ, Beadle J, Argiles JM, Thum T, Földes G, Doehner W, Hilfiker-Kleiner D, Force T, Anker SD.

**Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure.**

Eur Heart J. 2013 Aug 29. [Epub ahead of print]

Symptoms of cancer cachexia (CC) include fatigue, shortness of breath, and impaired exercise capacity, which are also hallmark symptoms of heart failure (HF). Herein, we evaluate the effects of drugs commonly used to treat HF (bisoprolol, imidapril, spironolactone) on development of cardiac wasting, HF, and death in the rat hepatoma CC model (AH-130).

Tumour-bearing rats showed a progressive loss of body weight and left-ventricular (LV) mass that was associated with a progressive deterioration in cardiac function. Strikingly, bisoprolol and spironolactone significantly reduced wasting of LV mass, attenuated cardiac dysfunction, and improved survival. In contrast, imidapril had no beneficial effect. Several key anabolic and catabolic pathways were dysregulated in the cachectic hearts and, in addition, we found enhanced fibrosis that was corrected by treatment with spironolactone. Finally, we found cardiac wasting and fibrotic remodelling in patients who died as a result of CC. In living cancer patients, with and without cachexia, serum levels of brain natriuretic peptide and aldosterone were elevated.

Systemic effects of tumours lead not only to CC but also to cardiac wasting, associated with LV-dysfunction, fibrotic remodelling, and increased mortality. These adverse effects of the tumour on the heart and on survival can be mitigated by treatment with either the  $\beta$ -blocker bisoprolol or the aldosterone antagonist spironolactone. We suggest that clinical trials employing these agents be considered to attempt to limit this devastating complication of cancer.

Giovannetti A, Maselli A, Colasanti T, Rosato E, Salsano F, Pisarri S, Mezzaroma I, Malorni W, Ortona E, Pierdominici M.

**Autoantibodies to estrogen receptor in Systemic Sclerosis (SSc) as pathogenetic determinants and markers of progression.**

PLoS One. 2013 Sep 18;8(9):e74332.

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem autoimmune disease of unknown etiology characterized by inflammation, autoantibody production, and fibrosis. It predominantly affects women, this suggesting that female sex hormones such as estrogens may play a role in disease pathogenesis. However, up to date, the role of estrogens in SSc has been scarcely explored. The activity of estrogens is mediated either by transcription activity of the intracellular estrogen receptors (ER), ER $\alpha$  and ER $\beta$ , or by membrane-associated ER. Since the presence of autoantibodies to ER $\alpha$  and their role as estrogen agonists interfering with T lymphocyte homeostasis were demonstrated in other autoimmune diseases, we wanted to ascertain whether anti-ER $\alpha$  antibodies were detectable in sera from patients with SSc. We detected anti-ER $\alpha$  antibody serum immunoreactivity in 42% of patients with SSc (30 out of 71 analyzed). Importantly, a significant association was found between anti-ER $\alpha$  antibody values and key clinical parameters of disease activity and severity. Fittingly, anti-ER $\alpha$  antibody levels were also significantly associated with alterations of immunological features of SSc patients, including increased T cell apoptotic susceptibility and changes in T regulatory cells (Treg) homeostasis. In particular, the percentage of activated Treg (CD4(+)CD45RA(-) FoxP3(bright)CD25(bright)) was significantly higher in anti-ER $\alpha$  antibody positive patients than in anti-ER $\alpha$  antibody negative patients. Taken together our data clearly indicate that anti-ER $\alpha$  antibodies, probably via the involvement of membrane-associated ER, can represent: i) promising markers for SSc progression but, also, ii) functional modulators of the SSc patients' immune system.

Pierdominici M, Barbati C, Vomero M, Locatelli SL, Carlo-Stella C, Ortona E, Malorni W.  
**Autophagy as a pathogenetic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders.**

FASEB J. 2014 Feb;28(2):524-535.

Autophagy represents a key mechanism of cytoprotection that can be activated by a variety of extracellular and intracellular stresses and allows the cell to sequester cytoplasmic components and damaged organelles, delivering them to lysosomes for degradation and recycling. However, the autophagy process has also been associated with the death of the cell. It has been demonstrated to be constitutive in some instances and inducible in others, and the idea that it could represent a pathogenetic determinant as well as a possible prognostic tool and a therapeutic target in a plethora of human diseases has recently been considered. Among these, cancer represents a major one. In this review, we recapitulate the critical implications of autophagy in the pathogenesis, progression, and treatment of lymphoproliferative disorders. Leukemias and lymphomas, in fact, represent paradigmatic human diseases in which advances have recently been made in this respect. Autophagy as a pathogenetic mechanism and drug target in lymphoproliferative disorders.

Springer J, Tschirner A, Hartman K, von Haehling S, Anker SD, Doehner W.

**The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 9;168(4):3527-3531.

Cachexia is a common complication of cancer and may be responsible for 22% of all cancer-related deaths. The exact cause of death in cancer cachexia patients is unknown. Recently, atrophy of the heart has been described in cancer cachexia animal models, which resulted in impaired cardiac function and is likely to contribute to mortality. In cancer patients hyperuricaemia independent of tumour lysis syndrome is often associated with a worse prognosis. Xanthine oxidase (XO) metabolizes purines to uric acid and its inhibition has been shown to improve clinical outcome in patients with chronic heart failure.

The rat Yoshida AH-130 hepatoma cancer cachexia model was used in this study. Rats were treated with 4 or 40 mg/kg/d oxypurinol or placebo starting one day after tumour-inoculation for maximal 15 days. Cardiac function was analyzed by echocardiography on day 11.

Here we show that inhibition of XO by oxypurinol significantly reduces wasting of the heart and preserves cardiac function. LVEF was higher in tumour-bearing rats treated with 4 mg/kg/d ( $61\pm 4\%$ ) or 40 mg/kg/d ( $64\pm 5\%$ ) oxypurinol vs placebo ( $51\pm 3\%$ , both  $p < 0.05$ ). Fractional shortening was improved by 4 mg/kg/d ( $43\pm 3\%$ ) oxypurinol vs placebo ( $30\pm 2$ ,  $p < 0.05$ ), while 40 mg/kg/d oxypurinol ( $41\pm 5\%$ ) did not reach statistical significance. Cardiac output was increased in the 4 mg/kg/d dose only ( $71\pm 11$  mL/min vs placebo  $38\pm 4$  mL/min,  $p < 0.01$ ).

Inhibition of XO with oxypurinol has beneficial effects on cardiac mass and function in a rat model of severe cancer cachexia, suggesting that XO might be a viable drug target in cancer cachexia.

Szabó T, Postrach E, Mähler A, Kung T, Turhan G, von Haehling S, Anker SD, Boschmann M, Doehner W.

**Increased catabolic activity in adipose tissue of patients with chronic heart failure.**

Eur J Heart Fail. 2013 Oct;15(10):1131-1137.

Patients with chronic heart failure (CHF) have an increased catabolic state that affects both muscle and adipose tissue (AT), and may ultimately result in cardiac cachexia. Increased plasma levels of ANP might contribute to increased lipid mobilization and oxidation in CHF. We tested the hypothesis that increased plasma ANP levels are associated with an increased catabolic (lipolytic) state of white AT in patients with CHF. After an overnight fast, AT metabolism was studied by microdialysis in patients with CHF and healthy controls of a similar age and body composition (both  $n = 8$ ). AT glycolytic and lipolytic activities were assessed at rest (fasting) and after an oral glucose load (oGL). Fasting and post-prandial profiles of serum glucose, insulin, and free fatty acids and of dialysate glucose did not differ significantly between patients and controls. In contrast, fasting dialysate lactate and glycerol levels were two-fold higher in patients vs. controls (lactate,  $0.51 \pm 0.10$  and  $0.26 \pm 0.06$  mmol/L,  $P < 0.01$ ; glycerol,  $116 \pm 18$  and  $50 \pm 8$   $\mu$ mol/L,  $P < 0.001$ ), indicating increased AT glycolytic and lipolytic rates in patients. After an oGL, dialysate lactate increased 2- and 2.5-fold, whereas dialysate glycerol decreased by 60% and 50% in patients vs. controls, but metabolite levels were always significantly higher in patients vs. controls (all  $P < 0.05$ ). Plasma ANP levels were increased in patients and significantly correlated with adipose tissue dialysate glycerol. In patients with CHF, there is a direct correlation between plasma ANP levels and increased AT catabolic (lipolytic) state. This might contribute to AT wasting and the development of cardiac cachexia in patients with CHF.

Tkaczyszyn M, Nega K, Majda J, Lopuszka M, Szklarska A, Ponikowska B, von Haehling S, Doehner W, Banasiak W, Anker SD, Ponikowski P, Jankowska EA.

**Andropausal syndrome in men with systolic heart failure.**

Pol Arch Med Wewn. 2013;123(4):156-169.

Andropausal syndrome (AS) is an element of male aging, being associated with the age-related decline in circulating androgens.

We investigated the prevalence of AS, the severity of andropausal symptoms, and their clinical and hormonal determinants in men with heart failure (HF) and healthy peers.

We examined 232 men with systolic HF aged from 40 to 80 years (New York Heart Association [NYHA] class I/II/III-IV: 17%/54%/29%, left ventricular ejection fraction:  $30\% \pm 8\%$ ) and 362 healthy peers. The severity of 17 andropausal symptoms were assessed using the Aging Males' Symptoms Rating Scale.

In men with HF aged from 40 to 59 years, the prevalence of AS and the severity of andropausal symptoms were greater than in healthy peers (28% vs. 7%;  $40 \pm 14$  vs.  $35 \pm 10$  points; both  $P < 0.001$ ), while in the age group of 60 to 80 years, there were no differences in the prevalence of AS and the severity of andropausal symptoms between men with HF and healthy peers (31% vs. 40%;  $44 \pm 12$  vs.  $46 \pm 10$  points; respectively; both  $P > 0.1$ ). In men with HF aged from 40 to 59 years, advanced NYHA class, low hemoglobin, increased platelet number, and low serum dehydroepiandrosterone sulphate were independently associated with the greater prevalence of AS (all  $P < 0.05$ ). In men aged from 60 to 80 years, only reduced hemoglobin was borderline related to the higher prevalence of AS ( $P = 0.07$ ).

AS affects almost one-third of men with HF regardless of the age group. The clinical and hormonal determinants of the severity of andropausal symptoms differ between younger and older male patients. Endocrinological and sexual counseling is recommended in men with HF.

Trippel TD, Anker SD, von Haehling S.

**The role of micronutrients and macronutrients in patients hospitalized for heart failure.**

Heart Fail Clin. 2013 Jul;9(3):345-357.

The detrimental pathophysiology of heart failure (HF) leaves room for physiologic and metabolomic concepts that include supplementation of micronutrients and macronutrients in these patients. Hence myocardial energetics and nutrient metabolism may represent relevant treatment targets in HF. This review focuses on the role of nutritive compounds such as lipids, amino acids, antioxidants, and other trace elements in the setting of HF. Supplementation of ferric carboxymaltose improves iron status, functional capacity, and quality of life in HF patients. To close the current gap in evidence further interventional studies investigating the role of micro- and macronutrients are needed in this setting.

Trobec K, Kerec Kos M, von Haehling S, Springer J, Anker SD, Lainscak M.

**Pharmacokinetics of drugs in cachectic patients: a systematic review.**

PLoS ONE. 2013 11/08;8(11):e79603.

Cachexia is a weight-loss process caused by an underlying chronic disease such as cancer, chronic heart failure, chronic obstructive pulmonary disease, or rheumatoid arthritis. It leads to changes in body structure and function that may influence the pharmacokinetics

tics of drugs. Changes in gut function and decreased subcutaneous tissue may influence the absorption of orally and transdermally applied drugs. Altered body composition and plasma protein concentration may affect drug distribution. Changes in the expression and function of metabolic enzymes could influence the metabolism of drugs, and their renal excretion could be affected by possible reduction in kidney function. Because no general guidelines exist for drug dose adjustments in cachectic patients, we conducted a systematic search to identify articles that investigated the pharmacokinetics of drugs in cachectic patients.

Van Craenenbroeck EM, Conraads VM, Greenlaw N, Gaudesius G, Mori C, Ponikowski P, Anker SD.

**The effect of intravenous ferric carboxymaltose on red cell distribution width: a subanalysis of the FAIR-HF study.**

Eur J Heart Fail. 2013 Jul;15(7):756-762.

Red cell distribution width (RDW), a measure of variability in red blood cell size, is a novel prognostic marker in chronic heart failure (CHF). Iron deficiency contributes to elevated RDW. In the FAIR-HF trial, i.v. ferric carboxymaltose (FCM) improved the 6 min walk test (6MWT) distance in iron-deficient CHF patients. We studied the effect of FCM on RDW and the relationship between RDW and 6MWT distance. In FAIR-HF, iron-deficient CHF patients were randomized to FCM or placebo in a 2:1 ratio. From the total cohort (n = 459), we included 415 patients in whom RDW values and 6MWT distance were available for baseline and at least one follow-up visit (after 4, 12, and 24 weeks). Baseline RDW was higher in anaemic (haemoglobin <12 g/dL) compared with non-anaemic patients [15.2% (14.0-16.8) vs. 14.2% (13.4-15.4),  $P < 0.0001$ , median (interquartile range)]. In multivariate analysis, RDW was significantly associated with transferrin saturation ( $P < 0.001$ ) and C-reactive protein levels ( $P = 0.002$ ). Treatment with FCM led to a biphasic response; RDW increased within 4 weeks (+0.54% absolute change from baseline,  $P = 0.01$ ) but fell to values below the placebo group after 24 weeks (-1.0 %,  $P = 0.03$ ). The 6MWT distance and RDW were inversely related at baseline ( $r = -0.30$ ,  $P < 0.0001$ ). In all patients, the increase in 6MWT distance after 24 weeks was significantly correlated with a decrease in RDW ( $r = -0.25$ ,  $P < 0.0001$ ), even after adjustment for changes in haemoglobin. Iron deficiency in CHF is associated with high RDW, even after adjustment for the presence of anaemia. Treatment with i.v. FCM in iron-deficient CHF patients decreases RDW.

Villanova L, Vernucci E, Pucci B, Pellegrini L, Nebbioso M, Mauri C, Marfe G, Spataro A, Fini M, Banfi G, Russo MA, Tafani M.

**Influence of age and physical exercise on Sirtuin activity in humans.**

J Biol Regul Homeost Agents. 2013 Apr-Jun;27(2):497-507.

The sirtuin family of proteins consists of seven members in mammals (SirT1-T7). Sirtuins share NAD dependency for their enzymatic activity, but some show NAD-dependent deacetylase activity, others exhibit ADP ribosyltransferase activity or both. Sirtuins have gained considerable attention due to their impact as physiological targets for treating diseases associated with aging. Sirtuins interact with metabolic pathways and may serve as entry points for drugs. This review discusses the biology of sirtuins and their potential as mediators of caloric restriction and pharmacological targets. Reduced insulin sensitivity, mitochondrial dysfunction, and others are consequences of aging or secondary to

physical inactivity. Moreover, understanding human energy metabolism through sirtuins may provide a novel approach to exercise physiology. Quercetin, a natural polyphenolic flavonoid that has been widely investigated for its other health benefits, may act as an inducer of SirT1. The benefits of quercetin for exercise performance may have implications for athletes and extended to disease prevention.

Vodo S, Bechi N, Petroni A, Muscoli C, Aloisi AM.

**Testosterone-induced effects on lipids and inflammation.**

Mediators Inflamm. 2013;2013:183041.

Chronic pain has to be considered in all respects a debilitating disease and 10-20% of the world's adult population is affected by this disease. In the most general terms, pain is symptomatic of some form of dysfunction and (often) the resulting inflammatory processes in the body. In the study of pain, great attention has been paid to the possible involvement of gonadal hormones, especially in recent years. In particular, testosterone, the main androgen, is thought to play a beneficial, protective role in the body. Other important elements to be related to pain, inflammation, and hormones are lipids, heterogenic molecules whose altered metabolism is often accompanied by the release of interleukins, and lipid-derived proinflammatory mediators. Here we report data on interactions often not considered in chronic pain mechanisms.

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; on behalf of the SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) Investigators.

**Anticoagulation in "real world" patients with atrial fibrillation in Italy: results from the ISPAF (Indagine Sicoa Paziente Con Fibrillazione Atriale) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4729-4733.

Atrial fibrillation (AF) is associated with a high risk of stroke and other thrombo-embolic events and their prevention relies on antithrombotic therapy, at present mainly with vitamin K antagonists (VKA). The aim of this study was to provide an overall picture on the extent to which current recommendations on oral anticoagulation (OAC) therapy with VKA in AF correspond to actually prescribed OAC in an unselected, real world, population of consecutive patients with AF in Italy. Secondary objective was to assess the rate of "optimal" anticoagulation. Sixty-three cardiology units located in different geographic areas of Italy enrolled a total of 2046 outpatients with nonvalvular AF (54% males and 46% females, age  $73.3 \pm 10.2$  years). OAC with VKAs was prescribed in 1394 (68%) of patients and was progressively more frequent on going from paroxysmal (46%) to persistent (71%) and permanent AF (78%)( $P < 0.001$ ). A high prescription rate (88%) occurred in patients with CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc  $> 2$ . In patients with CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc = 0 and HAS-BLED  $< 3$ , still 59% were on OAC, whereas in 33% of patients with CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc  $\geq 2$  and HAS-BLED  $< 3$ , OAC therapy was not prescribed. In patients with CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc  $\geq 2$  and HAS-BLED  $> 3$ , the preference was towards OAC prescription. 66% of patients were at target for INR. The ISPAF study shows that in an Italian population of real world patients with AF adherence to current guidelines on OAC therapy based on stroke-risk scoring system is rather high, although rate of prescription should be increased. However, contrary to recommendations, in a high proportion of low-risk patients OAC therapy is still prescribed, and this might expose patients to unjustified risks.

von Haehling S, Anker SD, Doehner W, Morley JE, Vellas B.

**Frailty and heart disease.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 3;168(3):1745-1747.

Frailty is emerging as a syndrome of pre-disability that can identify persons at risk for negative outcomes. Its presence places the individual at risk for rapid deterioration when a major event such as myocardial infarction or hospitalization occurs. In patients with cardiovascular disease, frailty is about three times more prevalent than among elderly persons without. Screening for frailty in heart disease is important not only because of its prognostic value, but also because a variety of therapeutic interventions are available.

von Haehling S, Lainscak M, Kung T, Cramer L, Fülster S, Pelzer U, Hildebrandt B, Sandek A, Schefold JC, Rauchhaus M, Doehner W, Anker SD.

**Non-invasive assessment of cardiac hemodynamics in patients with advanced cancer and with chronic heart failure: A pilot feasibility study.**

Arch Med Sci. 2013;9(2):261-267.

Relationships between cardiac pressure and volume have been suggested as markers of cardiac contractility; parameters include stroke work and the maximal rate of pressure rise during isovolumic contraction (dP/dtmax). Patients with cancer often display dyspnea and fatigue. These are also frequent symptoms in patients with chronic heart failure (HF). The reasons for similar symptoms in cancer patients are unknown. Using the novel Nexfin Finapres technique, we sought to assess measures of cardiac performance in patients with cancer and compare these values with those from control subjects and patients with chronic HF. We prospectively studied 98 patients (control n = 18, chronic HF n = 37, advanced pancreatic or colorectal cancer n = 43) and assessed blood pressure (BP), stroke volume (SV), cardiac output (CO), and dP/dtmax at rest. All parameters of interest could be assessed using the Nexfin Finapres technique with SV and CO being significantly higher in patients with cancer than in controls (both  $p < 0.05$ ). The SV was significantly higher in patients with chronic HF than in controls ( $p < 0.05$ ). In patients with cancer, SV correlated with age ( $r = -0.45$ ,  $p < 0.01$ ) and body weight ( $r = +0.55$ ,  $p = 0.0001$ ). In chronic HF, SV declined with increasing age ( $r = -0.49$ ,  $p < 0.01$ ); in control subjects, SV increased with increasing body weight ( $r = +0.57$ ,  $p = 0.01$ ). Patients with cancer tended to display elevated BP, CO, SV, and dP/dtmax as compared to control subjects and patients with HF. These findings may reveal an elevated risk for cardiovascular diseases in this group.

von Haehling S, Doehner W, Jankowska EA, Ponikowski P, Stellos K, Puntmann VO, Nagel E, Anker SD, Gawaz M, Bigalke B.

**Value of serum pregnancy-associated plasma protein A for predicting cardiovascular events among patients presenting with cardiac chest pain.**

CMAJ. 2013 Apr 16;185(7):E295-303.

Pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) has been suggested as a candidate marker for the identification of unstable plaques in coronary arteries. We assessed the value of PAPP-A for predicting short-term cardiovascular events in a large cohort of patients presenting with cardiac chest pain.

We included consecutive patients who presented to a teaching hospital in Germany with

chest pain of cardiac origin confirmed by coronary angiography. We analyzed PAPP-A levels from serum samples drawn within 30 minutes after arrival in the emergency department or in the catheterization laboratory. Patients were followed for 90 days or until death for major adverse cardiovascular events, defined as the combined outcome of stent thrombosis, myocardial (re)infarction, ischemic stroke or cardiovascular-related death.

A total of 2568 patients (mean age [ $\pm$  standard deviation (SD)]  $68 \pm 11$  years; 74% male) presented with cardiac chest pain: 55% had stable angina and 45% had acute coronary syndrome. The PAPP-A levels ranged from 4 to 2154 mIU/L (median 14.0 mIU/L, interquartile range 9.3-25.2 mIU/L). Major adverse cardiovascular events occurred in 203 patients (7.9%). The mean PAPP-A level was higher among patients who had an event than among those who did not ( $62 \pm 156$  v.  $21 \pm 23$  mIU/L,  $p < 0.001$ ). In a multivariable analysis, PAPP-A remained a significant independent predictor of the primary outcome within 90 days (hazard ratio per 1 SD increase in PAPP-A level 1.96, 95% confidence interval 1.74-2.21). The optimal prognostic cutoff value was a PAPP-A level of 34.6 mIU/L. Higher levels of serum PAPP-A were independently associated with an increased short-term risk of cardiovascular events in patients presenting with cardiac chest pain. Further studies are required to validate the use of PAPP-A in routine clinical practice to predict future cardiovascular events.

von Haehling S, Steinbeck L, Doehner W, Springer J, Anker SD.

**Muscle wasting in heart failure: an overview.**

Int J Biochem Cell Biol. 2013 Oct;45(10):2257-2265.

Patients with heart failure are frequently limited in their exercise capacity. Although this clinical phenomenon is mostly attributed to the failing myocardium, the effects of skeletal muscle wasting should not be underestimated. Muscle wasting may present in the form of loss of muscle mass and function, termed sarcopenia in healthy aging, or in the form of cachexia. Only cachexia is associated with loss of body weight. The mechanisms involved embrace an anabolic-/catabolic imbalance with increased degradation of myofibrils and myocyte apoptosis. Clinical effects include reduced muscle mass, strength and consequently reduced exercise capacity. This article describes the terminology, molecular pathways, prevalence, clinical implications and possible treatment approaches to muscle wasting in patients with heart failure. This article is part of a Directed Issue entitled: Molecular basis of muscle wasting.

Schaefer A, Tallone EM, Tutarel O, Mertins R, Wilmlink LM, Anker SD, Bauersachs J, Roentgen P.

**Aerobic training in adults after atrial switch procedure for transposition of the great arteries improves exercise capacity without impairing systemic right ventricular function.**

Int J Cardiol. 2013 Dec 5;170(1):24-29.

Exercise training safely and efficiently improves symptoms in patients with heart failure due to left ventricular dysfunction. However, studies in congenital heart disease with systemic right ventricle are scarce and results are controversial. In a randomised controlled study we investigated the effect of aerobic exercise training on exercise capacity and systemic right ventricular function in adults with d-transposition of the great arteries after atrial redirection surgery ( $28.2 \pm 3.0$  years after Mustard procedure).



48 patients (31 male, age  $29.3 \pm 3.4$  years) were randomly allocated to 24 weeks of structured exercise training or usual care. Primary endpoint was the change in maximum oxygen uptake (peak VO<sub>2</sub>). Secondary endpoints were systemic right ventricular diameters determined by cardiac magnetic resonance imaging (CMR). Data were analysed per intention to treat analysis.

At baseline peak VO<sub>2</sub> was  $25.5 \pm 4.7$  ml/kg/min in control and  $24.0 \pm 5$  ml/kg/min in the training group ( $p=0.3$ ). Training significantly improved exercise capacity (treatment effect for peak VO<sub>2</sub> 3.8 ml/kg/min, 95% CI: 1.8 to 5.7;  $p=0.001$ ), work load ( $p=0.002$ ), maximum exercise time ( $p=0.002$ ), and NYHA class ( $p=0.046$ ). Systemic ventricular function and volumes determined by CMR remained unchanged. None of the patients developed signs of cardiac decompensation or arrhythmias while on exercise training. Aerobic exercise training did not detrimentally affect systemic right ventricular function, but significantly improved exercise capacity and heart failure symptoms. Aerobic exercise training can be recommended for patients following atrial redirection surgery to improve exercise capacity and to lessen or prevent heart failure symptoms.

Zannad F, Garcia AA, Anker SD, Armstrong PW, Calvo G, Cleland JG, Cohn JN, Dickstein K, Domanski MJ, Ekman I, Filippatos GS, Gheorghiade M, Hernandez AF, Jaarsma T, Koglin J, Konstam M, Kupfer S, Maggioni AP, Mebazaa A, Metra M, Nowack C, Pie-ske B, Piña IL, Pocock SJ, Ponikowski P, Rosano G, Ruilope LM, Ruschitzka F, Severin T, Solomon S, Stein K, Stockbridge NL, Stough WG, Swedberg K, Tavazzi L, Voors AA, Wasserman SM, Woehrle H, Zalewski A, McMurray JJ.

**Clinical outcome endpoints in heart failure trials: a European Society of Cardiology Heart Failure Association consensus document.**

Eur J Heart Fail. 2013 Oct;15(10):1082-1894.

Endpoint selection is a critically important step in clinical trial design. It poses major challenges for investigators, regulators, and study sponsors, and it also has important clinical and practical implications for physicians and patients. Clinical outcomes of interest in heart failure trials include all-cause mortality, cause-specific mortality, relevant non-fatal morbidity (e.g., all-cause and cause-specific hospitalization), composites capturing both morbidity and mortality, safety, symptoms, functional capacity, and patient-reported outcomes. Each of these endpoints has strengths and weaknesses that create controversies regarding which is most appropriate in terms of clinical importance, sensitivity, reliability, and consistency. Not surprisingly, a lack of consensus exists within the scientific community regarding the optimal endpoint(s) for both acute and chronic heart failure trials. In an effort to address these issues, the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology (HFA-ESC) convened a group of expert heart failure clinical investigators, biostatisticians, regulators, and pharmaceutical industry scientists (Nice, France, 12-13 February 2012) to evaluate the challenges of defining heart failure endpoints in clinical trials and to develop a consensus framework. This report summarizes the group's recommendations for achieving common views on heart failure endpoints in clinical trials.

Cacciatore F, Della-Morte D, Basile C, Mazzella F, Mastrobuoni C, Salsano E, Gargiulo G, Galizia G, Rengo F, Bonaduce D, Abete P.

**Long-term mortality in frail elderly subjects with osteoarthritis.**

Rheumatology (Oxford). 2013 Oct 23. [Epub ahead of print]

Elderly subjects are characterized by a high prevalence of OA and clinical frailty. This study aimed to examine the predictive role of clinical frailty on long-term mortality in elderly subjects with and without OA.

Mortality was evaluated after a 12-year follow-up in 698 subjects with and 590 subjects without OA recruited in 1992. Clinical frailty was assessed according to the Frailty Staging System and stratified in tertiles.

After a 12-year follow-up, mortality was 42.2% in subjects without and 55.8% in subjects with OA ( $P = 0.256$ ). With increasing frailty, mortality increased by 30.5% ( $P$  for trend  $< 0.001$ ) in subjects without and by 45.6% in subjects with OA ( $P$  for trend  $< 0.001$ ). Multivariate analysis showed that frailty [hazard ratio (HR) = 1.49 for each unit of increase, 95% CI 1.32, 1.94,  $P < 0.001$ ] but not OA (HR = 1.28, 95% CI 0.987, 1.39,  $P = 0.412$ ) was predictive of long-term mortality. Moreover, when Cox regression analysis was performed, frailty enhanced the risk of long-term mortality for each unit of increase by 32% (HR = 1.32, 95% CI 1.06, 1.65,  $P = 0.03$ ) in the absence of OA and by 98% in the presence (HR = 1.98, 95% CI 1.63, 2.95,  $P < 0.01$ ) of OA.

Clinical frailty significantly predicts mortality in subjects without OA and even more in those with OA. Thus clinical frailty may be considered a new prognostic factor to identify subjects with OA at high risk of mortality.

Dave KR, Della-Morte D, Saul I, Prado R, Perez-Pinzon MA.

#### **Ventricular fibrillation-induced cardiac arrest in the rat as a model of global cerebral ischemia.**

Transl Stroke Res. 2013 Oct;4(5):571-578.

Cardiopulmonary arrest remains one of the leading causes of death and disability in Western countries. Although ventricular fibrillation (VF) models in rodents mimic the "square wave" type of insult (rapid loss of pulse and pressure) commonly observed in adult humans at the onset of cardiac arrest (CA), they are not popular because of the complicated animal procedure, poor animal survival and thermal injury. Here we present a modified, simple, reliable, ventricular fibrillation-induced rat model of CA that will be useful in studying mechanisms of CA-induced delayed neuronal death as well as the efficacy of neuroprotective drugs. CA was induced in male Sprague Dawley rats using a modified method of von Planta et al. In brief, VF was induced in anesthetized, paralyzed, mechanically ventilated rats by an alternating current delivered to the entrance of the superior vena cava into the heart. Resuscitation was initiated by administering a bolus injection of epinephrine and sodium bicarbonate followed by mechanical ventilation and manual chest compressions and countershock with a 10-J DC current. Neurologic deficit score was higher in the CA group compared to the sham group during early reperfusion periods, suggesting brain damage. Significant damage in CA1 hippocampus (21% normal neurons compared to control animals) was observed following histopathological assessment at seven days of reperfusion. We propose that this method of VF-induced CA in rat provides a tool to study the mechanism of CA-induced neuronal death without compromising heart functions.

Della-Morte D, Cacciatore F, Salsano E, Pirozzi G, Gargiulo G, Palmirotta R, Guadagni F, Rundek T, Del Genio MT, D'Antonio I, Abete P.

#### **Age-related reduction of cerebral ischemic preconditioning: myth or reality?**

Clinical Interventions in Aging. 2013;8:1055-1061.

Stroke is one of the leading causes of death in industrialized countries for people older than 65 years of age. The reasons are still unclear. A reduction of endogenous mechanisms against ischemic insults has been proposed to explain this phenomenon. The "cerebral" ischemic preconditioning mechanism is characterized by a brief episode of ischemia that renders the brain more resistant against subsequent longer ischemic events. This ischemic tolerance has been shown in numerous experimental models of cerebral ischemia. This protective mechanism seems to be reduced with aging both in experimental and clinical studies. Alterations of mediators released and/or intracellular pathways may be responsible for age-related ischemic preconditioning reduction. Agents able to mimic the "cerebral" preconditioning effect may represent a new powerful tool for the treatment of acute ischemic stroke in the elderly. In this article, animal and human cerebral ischemic preconditioning, its age-related difference, and its potential therapeutical applications are discussed.

Della-Morte D, Ricordi C, Guadagni F, Rundek T.

**Measurement of subclinical carotid atherosclerosis may help in predicting risk for stroke in patients with diabetes.**

Metab Brain Dis. 2013 Sep;28(3):337-339.

Diabetes is one of the most important risk factor for stroke and cardiovascular disease (CVD), especially in young patients. The control of classical vascular risk factors failed in terms of prevention of stroke in patients with diabetes. In addition, in these patients the glycemic control showed a benefit on microvascular disease but lacked an established benefit in macrovascular disease. Therefore, implementations of effective stroke prevention strategies appear necessary in patients with diabetes. Ultrasound surrogate or intermediate markers of carotid atherosclerosis include carotid intima-media thickness (cIMT), carotid plaque (CP), and carotid stiffness (STIFF) have been demonstrated to increase in patients with diabetes and to be able to predict risk for stroke. In this editorial we discuss the opportunity to prevent the onset of vascular disease in their "preclinical or subclinical" stage in patients with higher risk for stroke such as diabetic patients.

Fedele F, Mancone M, Chilian WM, Severino P, Canali E, Logan S, De Marchis ML, Volterrani M, Palmirotta R, Guadagni F.

**Role of genetic polymorphisms of ion channels in the pathophysiology of coronary microvascular dysfunction and ischemic heart disease.**

Basic Res Cardiol. 2013 Nov;108(6):387.

Conventionally, ischemic heart disease (IHD) is equated with large vessel coronary disease. However, recent evidence has suggested a role of compromised microvascular regulation in the etiology of IHD. Because regulation of coronary blood flow likely involves activity of specific ion channels, and key factors involved in endothelium-dependent dilation, we proposed that genetic anomalies of ion channels or specific endothelial regulators may underlie coronary microvascular disease. We aimed to evaluate the clinical impact of single-nucleotide polymorphisms in genes encoding for ion channels expressed in the coronary vasculature and the possible correlation with IHD resulting from microvascular dysfunction. 242 consecutive patients who were candidates for coronary angiography were enrolled. A prospective, observational, single-center study was conducted, analyzing genetic polymorphisms relative to (1) NOS3 encoding for endothelial

nitric oxide synthase (eNOS); (2) ATP2A2 encoding for the Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPase pump (SERCA); (3) SCN5A encoding for the voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel (Nav1.5); (4) KCNJ8 and KCNJ11 encoding for the Kir6.1 and Kir6.2 subunits of K-ATP channels, respectively; and (5) KCN5A encoding for the voltage-gated K<sup>+</sup> channel (Kv1.5). No significant associations between clinical IHD manifestations and polymorphisms for SERCA, Kir6.1, and Kv1.5 were observed ( $p > 0.05$ ), whereas specific polymorphisms detected in eNOS, as well as in Kir6.2 and Nav1.5 were found to be correlated with IHD and microvascular dysfunction. Interestingly, genetic polymorphisms for ion channels seem to have an important clinical impact influencing the susceptibility for microvascular dysfunction and IHD, independent of the presence of classic cardiovascular risk factors.

Ferroni P, Della-Morte D, Pileggi A, Riondino S, Rundek T, Ricordi C, Guadagni F.

**Pleiotropic effects of PPAR agonist on hemostatic activation in type 2 diabetes mellitus.**

Curr Vasc Pharmacol. 2013 May 1;11(3):338-351.

Thiazolidinediones (TZDs) represent a class of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists widely used as insulin-sensitizers in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM). The beneficial effects of hypoglycemic drugs, including TZDs, on the hemostatic abnormalities associated to T2DM have been formerly related to improved metabolic control, rather than to direct effects. However, in recent years the pleiotropic effects of PPAR agonists on hemostatic function have become evident. In particular, the role of platelets as a pivotal player in diabetes complications by stimulating and sustaining inflammation has been lately acknowledged. Upon activation platelets synthesize and release many bioactive substances such as thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) or pro-inflammatory mediators including CD40 ligand (CD40L) that exert autocrine and paracrine activation processes in vascular inflammation leading to cardiovascular disease (CVD). Although PPAR is a nuclear hormone receptor, anucleate platelets also highly express this receptor and treatment with synthetic PPAR ligands dampens the release of soluble(s)CD40L and TXA<sub>2</sub> in thrombin-activated platelets. Moreover, PPAR through Sirtuin1 pathway has been implicated in modulating inflammatory and atherosclerotic processes in patients with T2DM. Therefore, in T2DM, where platelet activation contributes to the pathogenesis of CVD, TZDs may have an enhanced therapeutic role, despite some potentially serious adverse side effects. This review will discuss the pleiotropic effects of PPAR treatment on the hemostatic abnormalities associated with T2DM, with particular focus on platelet activation.

Formica V, Cereda V, di Bari MG, Grenga I, Tesauro M, Palmirotta R, Ferroni P, Guadagni F, Roselli M.

**Peripheral CD45RO, PD-1, and TLR4 expression in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab, fluorouracil, and irinotecan (FOLFIRI-B).**

Med Oncol. 2013 Dec;30(4):743.

CD45RO, PD-1, and TLR4 immune pathways have proven pivotal in regulating anti-tumor response and correlate with survival for localized colorectal cancer (CRC). We evaluated if their peripheral expression was associated with outcome in metastatic CRC (mCRC). Thirty-one mCRC patients were eligible for this prospective study (clinicaltrial.gov NCT01533740) and treated with first-line FOLFIRI-B. Blood was drawn before the first and third cycle and analyzed by flow cytometry for frequency (%) of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,

CD45RO+, and PD1+ mononuclear cells and for TLR4 expression on neutrophils. Two cycles of chemotherapy determined changes in immune variables that were prognostically meaningful. Pre-third-cycle (ptc) CD45RO+CD8+cell% displayed a statistically significant association with progression-free survival (PFS) (median PFS 22.4 vs. 9.4 months for patients with CD45RO+CD8+cell% > vs. < the median value of 12%, respectively,  $p$  0.02) and overall survival (OS) (2-year OS rate 62 vs. 44%, respectively,  $p$  0.04). Surprisingly, ptc-PD1 overexpression was also associated with improved PFS of borderline statistical significance (HR 0.42,  $p$  0.06). A Cox regression multivariate analysis for PFS including ptc-CD45RO+CD8+cell%, ptc-PD1+cell%, CEA, LDH, and Köhne risk class demonstrated CD45RO+CD8+cell% to be the only independent prognostic factor (HR 0.23,  $p$  0.04). TLR4 and CD4 were not associated with the outcome. Peripheral CD8+CD45RO+ cells were confirmed to be of independent prognostic value in mCRC patients. Overexpression of the PD-1 immunosuppressor after two cycles of therapy may be a negative feedback mechanism, and therefore, an indirect sign of chemotherapy induced antitumor immune response with a favorable association with outcome. Enhancement of CD8+CD45RO+ cell response may be a fascinating therapeutic target to improve the efficacy of FOLFIRI-B.

Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Mazzella F, Galizia G, Della-Morte D, Langellotto A, Pirozzi G, Ferro G, Ferrara N, Rengo F, Abete P.

**Moderate alcohol consumption predicts long-term mortality in elderly subjects with chronic heart failure.**

J Nutr Health Aging. 2013;17(5):480-485.

Moderate alcohol consumption is related to a reduction of mortality. However, this phenomenon is not well established in the elderly, especially in the presence of chronic heart failure (CHF). The aim of the study was to verify the effect of moderate alcohol consumption on 12-year mortality in elderly community-dwelling with and without CHF. Settings: community-dwelling from 5 regions of Italy. Participants: a cohort of 1332 subjects aged 65 and older.

Mortality after 12-year follow-up in elderly subjects ( $\geq 65$  years old) with and without CHF was studied. Moderate alcohol consumption was considered  $\leq 250$  ml/day (drinkers).

In the absence of CHF ( $n=947$ ), mortality was 42.2% in drinkers vs. 53.7% in non-drinker elderly subjects ( $p=0.021$ ). In contrast, in the presence of CHF ( $n=117$ ), mortality was 86.5% in drinkers vs. 69.7% in non-drinker elderly subjects ( $p=0.004$ ). Accordingly, Cox regression analysis shows that a moderate alcohol consumption is protective of mortality in the absence (HR=0.79; CI 95% 0.66-0.95;  $p<0.01$ ) but it is predictive of mortality in the presence of CHF (HR=1.29; CI 95% 1.05-1.97;  $p<0.05$ ).

Our data demonstrates that moderate alcohol consumption is associated with an increased long-term mortality risk in the elderly in the presence of CHF.

Palmirota R, Barbanti P, Ludovici G, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Spila A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F.

**Establishment of a biorepository for migraine research: the experience of Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM).**

Neurol Sci. 2013 Jan 26. [Epub ahead of print]

The development of Biobanks and recent advances in molecular biology have enhanced the possibility to accelerate translational research studies. The Interinstitutional

Multidisciplinary BioBank (BioBIM) is organized in a large healthy donors collection and pathology-based biobanks with the aim to provide a service for development of interdisciplinary studies. A new pathology-based biobank has been organized to specifically collect biospecimen from patients affected by migraine, with the final goal to centralize data, collect blood, plasma, serum, DNA and RNA of patients with this disease. The BioBIM is fully equipped for the automation of sampling/processing, storage and tracking of biospecimens. Standard Operating Procedures have been developed for processing and storage phases as well as archive of clinical data. The availability of biospecimens and clinical data will constitute a resource for various research projects.

Palmirotta R, De Marchis ML, Ludovici G, Ialongo C, Leone B, Lopez N, Valente MG, Spila A, Ferroni P, Della-Morte D, Guadagni F.

**A reliable and reproducible technique for DNA fingerprinting in biorepositories: a pilot study from BioBIM.**

Int J Biol Markers. 2013 Jul 19:0. [Epub ahead of print]

Standard operating procedures (SOPs) optimization for nucleic acid extraction from stored samples is of crucial importance in a biological repository, considering the large number of collected samples and their future downstream molecular and biological applications. However, the validity of molecular studies using stored specimens depends not only on the integrity of the biological samples, but also on the procedures that ensure the traceability of the same sample, certifying its uniqueness, and ensuring the identification of potential sample contaminations. With this aim, we have developed a rapid, reliable, low-cost, and simple DNA fingerprinting tool for a routine use in quality control of biorepositories samples. The method consists of a double ALU insertion/deletion genotyping panel suitable for uniqueness, identification of sample contaminations, and gender validation. Preliminary data suggest that this easy-to-use DNA fingerprinting protocol could routinely provide assurances of DNA identity and quality in a biorepository setting.

Palmirotta R, DE Marchis ML, Ludovici G, Leone B, Covello R, Conti S, Costarelli L, Della-Morte D, Ferroni P, Roselli M, Guadagni F.

**Mutational analysis of gastrointestinal stromal tumors (GISTs): procedural approach for diagnostic purposes.**

Cancer Genomics Proteomics. 2013 May-Jun;10(3):115-123.

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are the most common mesenchymal tumors in the digestive tract characterized, in the majority of cases, by activating mutations in the KIT (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) or PDGFRA (*platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide*) genes. Mutations affecting these tyrosine kinase receptors are also responsible for the mechanisms of primary and secondary drug resistance during the treatment with tyrosine kinase inhibitors. We performed mutational analysis to evaluate the pharmacotherapy susceptibility of GISTs, adopting a comprehensive procedural approach, in order to optimize the identification of mutations that may result in cellular resistance to conventional therapy.

DNA from paraffin-embedded tumor sections from 40 GISTs were analyzed using microdissection, direct sequencing analysis and allelic separation by cloning.

KIT mutations were found in 55.0% of the tumor samples. PDGFRA mutations were present in 5.0% of cases. Allelic cloning assay allowed for better definition of the extent of

the mutations and clarification of the exact nucleotidic position of complex mutations. Our experience suggests that sequential microdissection, direct sequencing and allelic separation by PCR cloning of large variants may improve the approach to mutational analysis and interpretation of sequence data of KIT and PDGFRA in patients with GIST.

Palmirotta R, Ludovici G, Egeo G, Ialongo C, Aurilia C, Fofi L, De Marchis ML, Della-Morte D, Barbanti P, Guadagni F.

**Prion protein gene M129V polymorphism and variability in age at migraine onset.** Headache. 2013 Mar;53(3):540-545.

Prion protein, a sialoglycoprotein with neuroprotective properties on oxidative stress damage, has been related with the mechanisms leading to migraine. In the present case-control study, we investigated the correlation between the common methionine/valine polymorphism at codon 129 within the prion protein gene (PRNP) and migraine. Genotyping of PRNP V129M variant was performed in 384 migraine patients and 185 age-, sex-, and race-ethnicity-matched healthy controls. The frequencies of the PRNP V129M genotype did not differ significantly between migraineurs and controls. The frequencies of 129VV genotype were significantly higher in patients with earlier age at migraine onset. No correlation was found between PRNP 129 genotype and demographics, and other clinical migraine features. Our data suggest that the PRNP 129VV polymorphism is not a direct migraine risk factor but is significantly associated with an earlier onset of the disease.

Roselli M, Cereda V, di Bari MG, Formica V, Spila A, Jochems C, Farsaci B, Donahue R, Gulley JL, Schlom J, Guadagni F.

**Effects of conventional therapeutic interventions on the number and function of regulatory T cells.**

Oncoimmunology. 2013 Oct 1;2(10).

Several lines of investigation have revealed the apparent interplay between the immune system of the host and many conventional, "standard-of-care" anticancer therapies, including chemotherapy and small molecule targeted therapeutics. In particular, pre-clinical and clinical studies have demonstrated the important role of regulatory T cells (Tregs) in inhibiting immune responses elicited by immunotherapeutic regimens such as those based on anticancer vaccines or checkpoint inhibitors. However, how the number and immunosuppressive function of Tregs change in cancer patients undergoing treatment with non-immune anticancer therapies remains to be precisely elucidated. To determine whether immunostimulatory therapies can be employed successfully in combination with conventional anticancer regimens, we have investigated both the number and function of Tregs obtained from the peripheral blood of carcinoma patients before the initiation and during the course of chemotherapeutic and targeted agent regimens. Our studies show that the treatment of breast cancer patients with tamoxifen plus leuprolide, a gonadotropin releasing hormone agonist, has minimal effects on Tregs, while sunitinib appears to exert differential effects on Tregs among patients with metastatic renal carcinoma. However, the administration of docetaxel to patients with metastatic prostate or breast cancer, as well as that of cisplatin plus vinorelbine to non-small cell lung cancer patients, appears to significantly increase the ratio between effector T cells and Tregs and to reduce the immunosuppressive activity of the latter in the majority of patients. These studies provide the rationale for the selective use of active immunothe-

rapy regimens in combination with specific standard-of-care therapies to achieve the most beneficial clinical outcome among carcinoma patients.

Roselli M, Ferroni P, Riondino S, Mariotti S, Laudisi A, Vergati M, Cavaliere F, Palmirotta R, Guadagni F.

**Impact of chemotherapy on activated protein C-dependent thrombin generation - association with VTE occurrence.**

Int J Cancer. 2013 Sep 1;133(5):1253-1258.

Chemotherapy has been associated with an increased risk of venous thromboembolism (VTE). However, the prevalence of coagulation abnormalities or VTE occurrence as a consequence of different anti-cancer agents or treatment schemes is largely uncharacterized. Thus, this study was aimed at analyzing the impact of different anticancer drugs on the prothrombotic status of cancer out-patients scheduled for chemotherapy. To this purpose, a mono-institutional study was prospectively conducted to monitor serial changes of activated protein C (APC) function in 505 consecutive cancer out-patients with primary or relapsing solid cancer at the start of a new chemotherapy regimen. The results obtained showed that age >65 years ( $p = 0.01$ ), ECOG performance status ( $p = 0.01$ ), platinum-based ( $p = 0.035$ ) and fluoropyrimidine-based regimens ( $p = 0.008$ ) were independent predictors of an acquired APC resistance during the first chemotherapy cycle. Multivariate model of Cox proportional hazards survival analysis demonstrated that a decline in APC functionality ( $HR = 2.4$ ;  $p = 0.013$ ) and platinum-based regimens ( $HR = 2.2$ ;  $p = 0.042$ ) were both capable of predicting the occurrence of a first VTE episode during chemotherapy. Indeed, 14% of patients with platinum-associated APC impairment had VTE over a 1-year follow-up, compared to 3% of patients treated with other regimens and in whom APC functionality remained stable ( $HR = 1.5$ ;  $p = 0.003$ ). We may, thus, conclude that use of platinum-based regimens is responsible for induction of an acquired thrombophilic condition and represents a predictor for VTE even after adjustment for other risk factors.

Roselli M, Ferroni P, Rolfo C, Peeters M, Palmirotta R, Formica V, Ludovici G, Laudisi A, De Marchis ML, La Farina F, Russo A, Guadagni F.

**TNF- gene promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism in gastrointestinal cancer patients undergoing chemotherapy.**

Ann Oncol. 2013 Jul 12. [Epub ahead of print]

TNF- has been proposed as a predictive factor for venous thromboembolism (VTE). Genetic polymorphisms could regulate TNF- production. However, the relationship between TNFA gene variants and VTE is not clarified. This study aims to investigate the predictive role of five different TNFA gene promoter SNPs, or their haplotype combination(s), for a first VTE episode in gastrointestinal cancer out-patients treated with chemotherapy. Serum TNF- levels and TNFA -863C/A, -857C/T, -376G/A, -308G/A and -238G/A gene promoter polymorphisms were retrospectively evaluated in 314 subjects, including 157 controls and 157 Caucasian patients with histologically diagnosed GI cancers beginning chemotherapy delivery (5-fluorouracil either as monotherapy or in combination with platinum compounds or irinotecan). Haplotype analysis showed that a five-loci haplotype (CTGGG haplotype) has higher frequency in GI cancer patients who developed VTE ( $n = 15$ ) during chemotherapy [odds ratio = 2.7, 95% confidence interval (CI) 1.04-7.11,  $P = 0.04$ ]. GI patients who remained VTE-free did not differ in



CTGGG haplotype frequency from controls. No association was observed between serum TNF- levels and TNFA haplotype, but both were independent predictors of VTE. Approximately 20% of GI cancer patients carrying the CTGGG haplotype developed VTE compared with 4% of the remaining 101 patients (hazard ratio = 5.6, 95% CI 1.8-17.6,  $P = 0.003$ ). These results suggest that TNFA might represent a candidate gene contributing to VTE pathogenesis in GI cancer patients and suggest that VTE risk during chemotherapy might be genetically identified. Validation studies are needed for translation into clinical practice.

Testa G, Cacciatore F, Della-Morte D, Mazzella F, Mastrobuoni C, Galizia G, Gargiulo G, Rengo F, Bonaduce D, Abete P.

**Atenolol use is associated with long-term mortality in community-dwelling older adults with hypertension.**

Geriatr Gerontol Int. 2013 Apr 15. [Epub ahead of print]

The role of atenolol, a non-vasodilating beta-blocker drug, on long-term mortality in hypertensive older adults is still unclear. The aim of the present study was to evaluate long-term mortality in community-dwelling hypertensive older adults taking atenolol. Long-term mortality after 12-year follow up in isolated hypertensive older adults ( $n=972$ ) was analyzed. The patients were stratified in the presence and absence of atenolol use. Systolic, diastolic and pulse arterial pressure were measured.

Older adults taking atenolol showed a greater mortality and higher pulse arterial pressure values than those not taking atenolol (73.9% vs 55.0%;  $P=0.047$  and  $74.7\pm 14.1$  vs  $63.0\pm 14.2$  mmHg,  $P<0.001$ , respectively). Cox regression analysis showed that atenolol use (hazard risk 1.91; 95% confidence interval 1.04-4.31;  $P=0.04$ ) and pulse arterial pressure (hazard risk 1.02; 95% confidence interval 1.01-1.03;  $P=0.032$ ) were predictive of long-term mortality.

Atenolol use was related to increased mortality in community-dwelling hypertensive Older adults. This increase in mortality risk seems to be related to an increase of pulse arterial pressure.

Vergati M, Della-Morte D, Ferroni P, Cereda V, Toso L, La Farina F, Guadagni F, Roselli M.

**Increased risk of chemotherapy-associated venous thromboembolism in elderly patients with cancer.**

Rejuvenation Res. 2013 Jun;16(3):224-231.

Data on the relationship between aging, chemotherapy, and risk for venous thromboembolism (VTE) are controversial. We sought to evaluate the risk of chemotherapy-associated VTE in young to middle-aged (YMA) and elderly cancer patients and to analyze the VTE-free survival time in both groups. Patients with histologically confirmed diagnosis of solid malignancy receiving any type of systemic chemotherapy, no clinical diagnosis of VTE before chemotherapy initiation, and Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS)  $\leq 2$  were enrolled in this study. Of the 486 consecutive patients included in the study, 380 (78%) were classified as YMA ( $\leq 70$  years of age) and 106 (22%) as elderly ( $>70$  years of age). At a median follow-up of 1 year, the incidence of VTE events was almost two-fold greater in elderly than in YMA (11% vs. 6%). Age ( $\leq 70$  years vs.  $>70$  years (hazard ratio [HR], 2.42; 95% confidence interval [CI] 1.15-5.06;  $p=0.020$ ), ECOG-PS (HR, 6.54; 95% CI 3.10-13.8;  $p<0.0001$ ), and platinum-based

chemotherapy (HR, 2.46; 95% CI 1.06-5.69;  $p=0.035$ ) were independent risk factors for VTE. In the elderly subset, a trend toward an increased risk of VTE in patients receiving a platinum-based chemotherapy when compared with a non-platinum-containing regimen was observed (15% vs. 9.1%). The Kaplan-Meier analysis showed that elderly patients had a significantly shorter VTE-free survival time compared with younger cancer patients (log-rank test=2.0;  $p=0.045$ ). Our study reports an increase incidence of VTE in elderly cancer patients treated with chemotherapy compared with the younger group, suggesting that aging is one of the most important risk factors for VTE. On the basis of the results of this study, we believe that a validated predictive model including age, ECOG-PS, and type of chemotherapy (platinum- vs. non-platinum containing regimen) would enable clinicians to target thromboprophylaxis to those patients considered to be at greatest risk.

Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR.

**Punctum on two different transcription factors regulated by PGC-1 : Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 and nuclear respiratory factor 2.**

Biochim Biophys Acta. 2013 Aug;1830(8):4137-4146.

The transcription factor nuclear factor-erythroid-derived 2-like 2 (official symbol: NFE2L2, alias: Nrf2) is a master regulator of antioxidant defense system, which makes it an attractive target for manipulations that aim to increase cellular resistance to oxidative stress. Nuclear respiratory factor 2 or GA binding protein transcription factor alpha (official symbol: GABPA, alias: NRF2) functions as a transcription factor that activates the expression of some key metabolic genes regulating cellular growth and nuclear genes required for mitochondrial respiration as well as mitochondrial DNA transcription and replication. Despite the evident structural and functional differences, confusion has occurred in bibliographic databases due to the shared symbol NRF2 for these transcription factors. Such confusion has worsened after the discovery that the transcriptional co-activator peroxisome proliferator activated receptor gamma co-activator 1 alpha (PGC-1 ) could control the signaling pathway of both NFE2L2 and GABPA through distinct molecular mechanisms. This review will summarize the implications of NFE2L2 and GABPA in various human patho-physiological conditions and how PGC-1 can regulate their different signaling axis. This review underlines the overlapping functions between PGC-1 , NFE2L2 and GABPA, which alteration could induce the development of human pathological states. The comprehension of molecular mechanisms that modulate the intersection between these proteins will be important to identify new signaling axis involved in lifespan extension as well as novel targets for therapeutic interventions.

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Cioccolo S, Scrivo R, Morreale M, Pontecorvo S, Ferrari F, Di Nardo G, Nencioni L, Carluccio S, Valesini G, Francia A, Cucchiara S, Palamara AT, Pietropaolo V.

**Human Polyomavirus JC monitoring and noncoding control region analysis in dynamic cohorts of individuals affected by immune-mediated diseases under treatment with biologics: an observational study.**

Virol J. 2013 Sep 30;10(1):298.

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) onset, caused by Polyomavirus JC (JCPyV) in patients affected by immune-mediated diseases during biological treatment, raised concerns about the safety profile of these agents. Therefore, the aims of this stu-

dy were the JCPyV reactivation monitoring and the noncoding control region (NCCR) and viral protein 1 (VP1) analysis in patients affected by different immune-mediated diseases and treated with biologics. We performed JCPyV-specific quantitative PCR of biological samples collected at moment of recruitment (t0) and every 4 months (t1, t2, t3, t4). Subsequently, rearrangements' analysis of NCCR and VP1 was carried out. Data were analyzed using  $\chi^2$  test. Results showed that at t0 patients with chronic inflammatory rheumatic diseases presented a JCPyV load in the urine significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than in patients with multiple sclerosis (MS) and Crohn's disease (CD). It can also be observed a significant association between JC viruria and JCPyV antibodies after 1 year of natalizumab ( $p = 0.04$ ) in MS patients. Finally, NCCR analysis showed the presence of an archetype-like sequence in all urine samples, whereas a rearranged NCCR Type IR was found in colon-rectal biopsies collected from 2 CD patients after 16 months of infliximab. Furthermore, sequences isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 2 MS patients with JCPyV antibody at t0 and t3, showed a NCCR Type IIR with a duplication of a 98 bp unit and a 66 bp insert, resulting in a boxB deletion and 37 T to G transversion into the Spi-B binding site. In all patients, a prevalence of genotypes 1A and 1B, the predominant JCPyV genotypes in Europe, was observed. It has been important to understand whether the specific inflammatory scenario in different immune-mediated diseases could affect JCPyV reactivation from latency, in particular from kidneys. Moreover, for a more accurate PML risk stratification, testing JC viruria seems to be useful to identify patients who harbor JCPyV but with an undetectable JCPyV-specific humoral immune response. In these patients, it may also be important to study the JCPyV NCCR rearrangement: in particular, Spi-B expression in PBMCs could play a crucial role in JCPyV replication and NCCR rearrangement.

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Palamara AT, Nencioni L, Pietropaolo V.

**New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal eukoencephalopathy.**

Clin Dev Immunol. 2013;2013:839719. Epub 2013 Apr 17.

John Cunningham virus (JCV) is a member of the Polyomaviridae family. It was first isolated from the brain of a patient with Hodgkin disease in 1971, and since then the etiological agent of the progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) was considered. Until the human immunodeficiency virus (HIV) pandemic, PML was rare: in fact HIV-induced immunodeficiency is the most common predisposing factor accounting for 85% of all instances of PML. This data led to intense research on JCV infection and resulted in better understanding of epidemiology and clinic-pathologic spectrum. Recently, cases of PML have been observed after the introduction of monoclonal antibodies, such as natalizumab, rituximab, efalizumab, and infliximab, in the treatment of autoimmune disease, underlining the important role of host immunity in PML pathogenesis. In this review current understanding of the JCV infection and the new findings relating to the pathogenesis of PML has been comprehensively revised, focusing our attention on the interaction between the cellular and viral molecular pathways implicated in the JCV infection and the modulating role of host immune surveillance in the viral reactivation from a latent state.

Bozzini T, Botta G, Delfino M, Onofri S, Saladino R, Amatore D, Sgarbanti R, Nencioni L, Palamara AT.

**Tyrosinase and layer-by-layer supported tyrosinases in the synthesis of lipophilic**

### **catechols with antiinfluenza activity.**

Bioorg Med Chem. 2013 Oct 30. [Epub ahead of print]

Catechol derivatives with lipophilic properties have been selectively synthesized by tyrosinase in high yield avoiding long and tedious protection/deprotection steps usually required in traditional procedures. The synthesis was effective also with immobilized tyrosinase able to perform for more runs. The novel catechols were evaluated against influenza A virus, that continue to represent a severe threat worldwide. A significant antiviral activity was observed in derivatives characterized by antioxidant activity and long carbon alkyl side-chains, suggesting the possibility of a new inhibition mechanism based on both redox and lipophilic properties.

Checconi P, Sgarbanti R, Celestino I, Limongi D, Amatore D, Iuvara A, Alimonti A, Garaci E, Palamara AT, Nencioni L.

### **The environmental pollutant cadmium promotes influenza virus replication in MDCK cells by altering their redox state.**

Int J Mol Sci. 2013 Feb 19;14(2):4148-4162.

Cadmium (Cd) is a toxic heavy metal that is considered an environmental contaminant. Several sources of human exposure to Cd, including employment in primary metal industries, production of certain batteries, foods, soil and cigarette smoke, are known. Its inhalation has been related to different respiratory diseases and toxic effects, among which alterations of the physiological redox state in individuals exposed to the metal have been described. Host-cell redox changes characteristic of oxidative stress facilitate the progression of viral infection through different mechanisms. In this paper, we have demonstrated that pre-treatment with CdCl<sub>2</sub> of MDCK cells increased influenza virus replication in a dose-dependent manner. This phenomenon was related to increased viral protein expression (about 40% compared with untreated cells). The concentration of CdCl<sub>2</sub>, able to raise the virus titer, also induced oxidative stress. The addition of two antioxidants, a glutathione (GSH) derivative or the GSH precursor, N-acetyl-L-cysteine, to Cd pre-treated and infected cells restored the intracellular redox state and significantly inhibited viral replication. In conclusion, our data demonstrate that Cd-induced oxidative stress directly increases the ability of influenza virus to replicate in the host-cell, thus suggesting that exposure to heavy metals, such as this, could be a risk factor for individuals exposed to a greater extent to the contaminant, resulting in increased severity of virus-induced respiratory diseases.

Chirullo B, Sgarbanti R, Limongi D, Shytaj IL, Alvarez D, Das B, Boe A, Dafonseca S, Chomont N, Liotta L, Iii Petricoin E, Norelli S, Pelosi E, Garaci E, Savarino A, Palamara AT.

### **A candidate anti-HIV reservoir compound, auranofin, exerts a selective 'anti-memory' effect by exploiting the baseline oxidative status of lymphocytes.**

Cell Death Dis. 2013 Dec 5;4:e944.

Central memory (T(CM)) and transitional memory (T(TM)) CD4(+) T cells are known to be the major cellular reservoirs for HIV, as these cells can harbor a transcriptionally silent form of viral DNA that is not targeted by either the immune system or current antiretroviral drug regimens. In the present study, we explored the molecular bases of the anti-HIV reservoir effects of auranofin (AF), a pro-oxidant gold-based drug and a candidate

compound for a cure of AIDS. We here show that T(CM) and T(TM) lymphocytes have lower baseline antioxidant defenses as compared with their naive counterpart. These differences are mirrored by the effects exerted by AF on T-lymphocytes: AF was able to exert a pro-differentiating and pro-apoptotic effect, which was more pronounced in the memory subsets. AF induced an early activation of the p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) followed by mitochondrial depolarization and a final burst in intracellular peroxides. The pro-differentiating effect was characterized by a downregulation of the CD27 marker expression. Interestingly, AF-induced apoptosis was inhibited by pyruvate, a well-known peroxide scavenger, but pyruvate did not inhibit the pro-differentiating effect of AF, indicating that the pro-apoptotic and pro-differentiating effects involve different pathways. In conclusion, our results demonstrate that AF selectively targets the T(CM)/T(TM) lymphocyte subsets, which encompass the HIV reservoir, by affecting redox-sensitive cell death pathways.

Fraternale A, Crinelli R, Casabianca A, Paoletti MF, Orlandi C, Carloni E, Smietana M, Palamara AT, Magnani M.

**Molecules altering the intracellular thiol content modulate NF- $\kappa$ B and STAT-1/IRF-1 signalling pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 production in murine macrophages.**

PLoS ONE. 2013 03/11;8(3):e57866.

The aim of this study was to investigate the molecular mechanisms involved in the production of Th1 cytokines, namely IL-12 and IL-27, when the intra-macrophage redox state was altered by different chemical entities such as GSH-C4, which is reduced glutathione carrying an aliphatic chain, or I-152, a pro-drug of N-acetyl-cysteine (NAC) and beta-mercaptoethylamine. We had already demonstrated that GSH-C4 and I-152 could shift the immune response towards Th1 in Ovalbumin-immunized mice as well as enhance Th1 response in HIV-1 Tat-immunized mice. By a new high performance liquid chromatography method, we found that 20 mM GSH-C4 provided a number of thiol species in the form of GSH, while 20 mM I-152 decreased GSH and increased the thiols in the form of NAC and I-152. Under these experimental conditions, GSH-C4 and I-152 enhanced and suppressed respectively the mRNA expression levels of IL-12 p40 induced by LPS/IFN- $\gamma$  as assessed by Real-Time PCR. The protein production of IL-12 p40 was increased by GSH-C4 and decreased by I-152 as determined by Enzyme-linked immunosorbent assay. Western immunoblot and electrophoretic mobility shift assays revealed that Nuclear Factor - $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation was inhibited by I-152 and prolonged by GSH-C4. Twenty mM I-152 stimulated IL-27 p28 gene expression and sustained Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)-mediated interferon regulator factor 1 (IRF-1) de novo synthesis. By contrast, 20 mM GSH-C4 did not exert any effect on IL-27 p28 gene expression. An increase in the intra-macrophage redox state by GSH-C4 and I-152 enhances Th1 cytokine production although the chemical structure and the intra-cellular metabolism influence differently signalling pathways involved in IL-27 or IL-12 production. GSH-C4 and I-152 may be used as Th1 immunomodulators in some pathologies and in ageing where GSH depletion may contribute to the Th1/Th2 imbalance, and in new immunization strategies.

Lettieri Barbato D, Aquilano K, Baldelli S, Cannata SM, Bernardini S, Rotilio G, Ciriolo MR. **Proline oxidase-adipose triglyceride lipase pathway restrains adipose cell death and tissue inflammation.**

Cell Death Differ. 2013 Oct 4. [Epub ahead of print]

The nutrient-sensing lipolytic enzyme adipose triglyceride lipase (ATGL) has a key role in adipose tissue function, and alterations in its activity have been implicated in many age-related metabolic disorders. In adipose tissue reduced blood vessel density is related to hypoxia state, cell death and inflammation. Here we demonstrate that adipocytes of poorly vascularized enlarged visceral adipose tissue (i.e. adipose tissue of old mice) suffer from limited nutrient delivery. In particular, nutrient starvation elicits increased activity of mitochondrial proline oxidase/dehydrogenase (POX/PRODH) that is causal in triggering a ROS-dependent induction of ATGL. We demonstrate that ATGL promotes the expression of genes related to mitochondrial oxidative metabolism (peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1), thus setting a metabolic switch towards fat utilization that supplies energy to starved adipocytes and prevents cell death, as well as adipose tissue inflammation. Taken together, these results identify ATGL as a stress resistance mediator in adipocytes, restraining visceral adipose tissue dysfunction typical of age-related metabolic disorders.

Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR.

**FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment.**

Cell Death Dis. 2013 Oct 17;4:e861.

Finding new molecular pathways and strategies modulating lipolysis in adipocytes is an attractive goal of the current research. Indeed, it is becoming clear that several human age-related pathologies are caused by adipose tissue expansion and altered lipid metabolism. In the present work, we show that transcription factor forkhead homeobox type protein O1 (FoxO1) is upregulated by nutrient restriction (NR) in adipocytes and exerts the transcriptional control of lipid catabolism via the induction of lysosomal acid lipase (Lipa). An increased autophagy and colocalization of lipid droplets (LDs) with lysosomes was observed implying lipophagy in Lipa-mediated LDs degradation. Interestingly, we found that metformin (Metf), a biguanide drug commonly used to treat type-2 diabetes, exerts effects comparable to that of NR. Actually, it was able to elicit FoxO1-dependent Lipa induction as well as LDs degradation through lipophagy. Moreover, we demonstrate that, during NR or Metf treatment, free fatty acids released by Lipa are directed toward AMP-activated protein kinase-mediated mitochondrial oxidation, thus maintaining energetic homeostasis in adipocytes. In conclusion, our data show that lysosomal-mediated lipid catabolism is activated by NR in adipocytes and give further support to the use of Metf as a NR mimetic to combat age-related diseases associated with altered lipid metabolism.

Lettieri-Barbato D, Tomei F, Sancini A, Morabito G, Serafini M.

**Effect of plant foods and beverages on plasma non-enzymatic antioxidant capacity in human subjects: a meta-analysis.**

Br J Nutr. 2013 May;109(9):1544-1556.

Non-enzymatic antioxidant capacity (NEAC) represents a sensitive biomarker measuring the in vivo antioxidant potential of vegetable foods. To evaluate the effectiveness of plant-derived foods and beverages on the plasma non-enzymatic antioxidant system,

we analysed all literature published upto May 2010. Data were extracted by two authors independently, and the effect size was summarised using standardised mean differences by a random-effects model. For the analysis, eighty-eight studies were included, reporting a total number of 122 interventions and involving 2890 subjects. There was overall evidence of the effectiveness of fruit, vegetables, dietary patterns based on plant foods, red wine and tea in increasing plasma NEAC. No changes were found for chocolate and fruit juices. We observed an overall effect size three times higher in subjects with risk factors when compared with healthy subjects. Total radical-trapping antioxidant parameter, oxygen radical absorbance capacity and ferric-reducing antioxidant power methods showed a similar increase in plasma NEAC following dietary supplementation, whereas Trolox equivalent antioxidant capacity did not respond to dietary supplementation. Data from the present meta-analysis show that plant-derived foods represent an effective strategy to enhance an endogenous antioxidant network in humans. This is particularly evident in the presence of oxidative stress-related risk factors.

Magrone T, Perez de Heredia F, Jirillo E, Morabito G, Marcos A, Serafini M.

**Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases.**

Can J Physiol Pharmacol. 2013 Jun;91(6):387-396.

In Western societies, the incidence of diet-related diseases is progressively increasing due to greater availability of hypercaloric food and a sedentary lifestyle. Obesity, diabetes, atherosclerosis, and neurodegeneration are major diet-related pathologies that share a common pathogenic denominator of low-grade inflammation. Functional foods and nutraceuticals may represent a novel therapeutic approach to prevent or attenuate diet-related disease in view of their ability to exert anti-inflammatory responses. In particular, activation of intestinal T regulatory cells and homeostatic regulation of the gut microbiota have the potential to reduce low-grade inflammation in diet-related diseases. In this review, clinical applications of polyphenol-rich functional foods and nutraceuticals in postprandial inflammation, obesity, and ageing will be discussed. We have placed special emphasis on polyphenols since they are broadly distributed in plants.

Miglio C, Peluso I, Raguzzini A, Villaño DV, Cesqui E, Catasta G, Toti E, Serafini M.

**Fruit juice drinks prevent endogenous antioxidant response to high-fat meal ingestion.**

Br J Nutr. 2013 Aug 12:1-7. [Epub ahead of print]

High-fat meals (HFM) induce metabolic stress, leading to the activation of protective mechanisms, including inflammation and endogenous antioxidant defences. In the present study, we investigated the effects of antioxidant-rich fruit juice drinks on the endogenous antioxidant response induced by HFM. In a double-blind, cross-over design (10 d washout), fourteen overweight volunteers were randomly assigned to one of the following interventions: HFM+500 ml placebo beverage (HFM-PB, free from fruit); HFM+500 ml antioxidant beverage 1 (HFM-AB1; apple, grape, blueberry and pomegranate juices and grape skin, grape seed and green tea extracts); HFM+500 ml antioxidant beverage 2 (HFM-AB2; pineapple, black currant and plum juices). HFM-PB consumption increased the plasma levels of thiols (SH) (4 h,  $P < 0.001$ ) and uric acid (UA) (2 h,  $P < 0.01$ ) and total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) (4 h,  $P < 0.01$ ). Following the consumption of drinks, UA production was significantly reduced

with respect to placebo beverage consumption 8 h after HFM-AB2 consumption ( $P < 0.05$ ). SH levels were reduced 0.5 ( $P < 0.05$ ), 1 ( $P < 0.05$ ) and 2 h ( $P < 0.01$ ) after HFM-AB1 consumption and 2, 4 and 8 h ( $P < 0.05$ ) after HFM-AB2 consumption. Plasma TRAP (2 h,  $P < 0.001$ ) and urinary ferric reducing antioxidant power (0-8 h,  $P < 0.01$ ) were increased by HFM-AB1 consumption, the drink with the highest in vitro antioxidant capacity, but not by HFM-AB2 consumption. In urine, UA levels were significantly increased from basal levels after the consumption of HFM-PB and HFM-AB2. However, neither of the beverages increased the urinary excretion of UA with respect to the placebo beverage. In conclusion, the increase in UA and SH levels induced by HFM as part of an endogenous antioxidant response to postprandial stress can be prevented by the concomitant ingestion of antioxidant-rich fruit juice drinks.

Ruggieri A, Anticoli S, Nencioni L, Sgarbanti R, Garaci E, Palamara AT.

### **Interplay between hepatitis C virus and redox cell signaling.**

Int J Mol Sci. 2013 Feb 26;14(3):4705-21.

Hepatitis C virus (HCV) infects approximately 3% of the world's population. Currently licensed treatment of HCV chronic infection with pegylated-interferon- and ribavirin, is not fully effective against all HCV genotypes and is associated to severe side effects. Thus, development of novel therapeutics and identification of new targets for treatment of HCV infection is necessary. Current opinion is orienting to target antiviral drug discovery to the host cell pathways on which the virus relies, instead of against viral structures. Many intracellular signaling pathways manipulated by HCV for its own replication are finely regulated by the oxido-reductive (redox) state of the host cell. At the same time, HCV induces oxidative stress that has been found to affect both virus replication as well as progression and severity of HCV infection. A dual role, positive or negative, for the host cell oxidized conditions on HCV replication has been reported so far. This review examines current information about the effect of oxidative stress on HCV life cycle and the main redox-regulated intracellular pathways activated during HCV infection and involved in its replication.

Shytaj IL, Chirullo B, Wagner W, Ferrari MG, Sgarbanti R, Corte AD, Labranche C, Lopalco L, Palamara AT, Montefiori D, Lewis MG, Garaci E, Savarino A.

### **Investigational treatment suspension and enhanced cell-mediated immunity at rebound followed by drug-free remission of simian AIDS.**

Retrovirology. 2013 Jul 16;10:71.

HIV infection persists despite antiretroviral treatment (ART) and is reignited as soon as therapies are suspended. This vicious cycle is fueled by the persistence of viral reservoirs that are invulnerable to standard ART protocols, and thus therapeutic agents able to target these reservoirs are needed. One such agent, auranofin, has recently been shown to decrease the memory T-cell reservoir in chronically SIVmac251-infected macaques. Moreover, auranofin could synergize with a fully suppressive ART protocol and induce a drug-free post-therapy containment of viremia.

We administered buthionine sulfoximine (BSO), an inhibitor of glutathione synthesis currently in clinical trials for cancer, in combination with auranofin to chronically SIVmac251-infected macaques under highly-intensified ART (H-iART). The ART/auranofin/BSO therapeutic protocol was followed, after therapy suspension, by a significant decrease of viral RNA and DNA in peripheral blood as compared to pre-therapy levels.



Drug-free post-therapy control of the infection was achieved in animals with pre-therapy viral loads ranging from values comparable to average human set points to levels largely higher. This control was dependent on the presence CD8+ cells and associated with enhanced levels of cell-mediated immune responses.

The level of post-therapy viral set point reduction achieved in this study is the largest reported so far in chronically SIVmac251-infected macaques and may represent a promising strategy to improve over the current "ART for life" plight.

Barneda D, Frontini A, Cinti S, Christian M.

**Dynamic changes in lipid droplet-associated proteins in the "Browning" of white adipose tissues.**

Biochim Biophys Acta. 2013 May;1831(5):924-933.

The morphological and functional differences between lipid droplets (LDs) in brown (BAT) and white (WAT) adipose tissues will largely be determined by their associated proteins. Analysing mRNA expression in mice fat depots we have found that most LD protein genes are expressed at higher levels in BAT, with the greatest differences observed for Cidea and Plin5. Prolonged cold exposure, which induces the appearance of brown-like adipocytes in mice WAT depots, was accompanied with the potentiation of the lipolytic machinery, with changes in ATGL, CGI-58 and G0S2 gene expression. However the major change detected in WAT was the enhancement of Cidea mRNA. Together with the increase in Cidec, it indicates that LD enlargement through LD-LD transference of fat is an important process during WAT browning. To study the dynamics of this phenotypic change, we have applied 4D confocal microscopy in differentiated 3T3-L1 cells under sustained  $\beta$ -adrenergic stimulation. Under these conditions the cells experienced a LD remodelling cycle, with progressive reduction on the LD size by lipolysis, followed by the formation of new LDs, which were subjected to an enlargement process, likely to be CIDE-triggered, until the cell returned to the basal state. This transformation would be triggered by the activation of a thermogenic futile cycle of lipolysis/lipogenesis and could facilitate the molecular mechanism for the unilocular to multilocular transformation during WAT browning. This article is part of a Special Issue entitled Brown and White Fat: From Signaling to Disease.

Frontini A, Vitali A, Perugini J, Murano I, Romiti C, Ricquier D, Guerrieri M, Cinti S.

**White-to-brown transdifferentiation of omental adipocytes in patients affected by pheochromocytoma.**

Biochim Biophys Acta. 2013 May;1831(5):950-959.

In all mammals, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) are found together in several fat depots, forming a multi-depot organ. Adrenergic stimulation induces an increase in BAT usually referred to as "browning". This phenomenon is important because of its potential use in curbing obesity and related disorders; thus, understanding its cellular mechanisms in humans may be useful for the development of new therapeutic strategies. Data in rodents have supported the direct transformation of white into brown adipocytes. Biopsies of pure white omental fat were collected from 12 patients affected by the catecholamine-secreting tumor pheochromocytoma (pheo-patients) and compared with biopsies from controls. Half of the omental fat samples from pheo-patients contained uncoupling protein 1 (UCP1)-immunoreactive-(ir) multilocular cells that were often arranged in a BAT-like pattern endowed with noradrenergic

fibers and dense capillary network. Many UCP1-ir adipocytes showed the characteristic morphology of paucilocular cells, which we have been described as cytological marker of transdifferentiation. Electron microscopy showed increased mitochondrial density in multi- and paucilocular cells and disclosed the presence of perivascular brown adipocyte precursors. Brown fat genes, such as UCP1, PR domain containing 16 (PRDM16) and  $\beta$ -3-adrenoreceptor, were highly expressed in the omentum of pheo-patients and in those cases without visible morphologic re-arrangement. Of note, the brown determinant PRDM16 was detected by immunohistochemistry only in nuclei of multi- and paucilocular adipocytes. Quantitative electron microscopy and immunohistochemistry for Ki67 suggest an unlikely contribution of proliferative events to the phenomenon. The data support the idea that, in adult humans, white adipocytes of pure white fat that are subjected to adrenergic stimulation are able to undergo a process of direct transformation into brown adipocytes. This article is part of a Special Issue entitled Brown and White Fat: From Signaling to Disease.

Carpi A, Cini G, Russo M, Antonelli A, Gaudio C, Galetta F, Franzoni F, Rossi G.

**Subclinical hyperthyroidism and cardiovascular manifestations: a reevaluation of the association.**

Internal and Emergency Medicine. 2013 04/01;8(1):75-77.

Subclinical hyperthyroidism (SH) has been reported associated with atrial fibrillation (AF), heart failure (HF) and coronary heart disease events, including mortality. An expert opinion indicates that AF is the possible link between SH and the other important cardiovascular (CV) manifestations. We analyzed the data of three recent studies including 60,883 subjects of whom 2,284 SH patients. In these subjects, the ratio between the AF events and each of the other above reported CV events varied from 0.14 to 0.4 in SH and from 0.2 to 2.4 in euthyroidism (ET). The general pattern of this ratio in 6 comparisons performed was not significantly higher for SH than ET. This data suggest that AF is not the major link between SH and the related CV manifestations. We suggest that a further link to be considered is the higher frequency of the early atherosclerosis manifestations such as carotid intima media thickness or carotid integrated back scatter, observed in SH. This atherogenic effect of SH can affect the occurrence of all the above clinical CV manifestations.

Carpi A, Rossi G, Nicolini A, Iervasi G, Russo M, Mechanick J.

**Does large needle aspiration biopsy add pain to the thyroid nodule evaluation?**

PLoS One. 2013;8(3):e58016. Epub 2013 Mar 11.

Thyroid large needle aspiration biopsy is disregarded because it is thought to be associated with pain. This is in contrast with our 32 years long experience. We surveyed reports of pain in patients examined with fine needle aspiration biopsy (78, 87.2% women, mean age 59 years) or FNAB+large needle aspiration biopsy (48, 87.5% women, mean age 60 years). Each patient was questioned regarding a) no unpleasant sensation (score "0"); b) unpleasant sensation ("1"); c) mild pain (no analgesic used; "2"); or d) pain (analgesic used; "3"). The mean size of the needle used was for FNAB  $22.3 \pm 0.7$  or  $20.8 \pm 1$  gauge in the fine needle aspiration or fine needle aspiration plus large needle aspiration biopsy group, respectively ( $p < .0001$ ). The number of percutaneous punctures was higher in the fine needle aspiration plus large needle aspiration biopsy group. However, the pain score in the fine needle aspiration biopsy or fine needle aspiration

biopsy plus large needle aspiration biopsy group was not significantly different. Large needle aspiration biopsy after fine needle aspiration biopsy does not add any discomfort or pain and therefore in light of the demonstrable benefits, should be included in clinical algorithms for the evaluation of thyroid nodules.

Chimenti C, Frustaci A.

**Contribution and risks of left ventricular endomyocardial biopsy in patients with cardiomyopathies: a retrospective study over a 28-year period.**

Circulation. 2013 Oct 1;128(14):1531-1541.

Use of left ventricular (LV) endomyocardial biopsy (EMB) to investigate cardiomyopathies is currently discouraged because it is considered riskier than and as contributive as right ventricular (RV) biopsy. The aim of our study is to report our experience with this option and to discuss its advantages and disadvantages. In our center from 1983 to 2010, 4221 patients underwent diagnostic EMB. In particular, 2396 (56.8%) underwent biventricular EMB, 1153 (27.3%) underwent selective LVEMB, and 672 (15.9%) underwent selective RVEMB. The rate of complications and histological findings were retrospectively analyzed. The periprocedural major complication rate (perforation with or without cardiac tamponade, embolization) was 0.33% for LVEMB and 0.45% for RVEMB, with a significant decrease in the rate of major complications with time (from 1.6% and 1.9% in 1983-1988 to 0% and 0.3% in 2007-2013, respectively;  $P < 0.001$  for both), denoting a steep learning curve. No patients died. When the structural and functional abnormalities affected exclusively the LV, the diagnostic yield of LVEMB was 97.8% compared with 53% for RVEMB. Conversely, when the echocardiographic presence of increased wall thickness, local or global ventricular dilation, or dysfunction also involved the RV, the diagnosis was reached in 98.1% of LVEMBs and 96.5% of RVEMBs. This discrepancy was particularly evident for myocarditis, whereas in infiltrative and storage diseases, the histological abnormalities were always detectable in both ventricles. LVEMB is a safe procedure with very low transient complications, comparable to RVEMB. It appears diagnostically more contributive than RVEMB in patients with cardiomyopathies and clinically preserved RV.

De Girolamo L, Stanco D, Salvatori L, Coroniti G, Arrigoni E, Silecchia G, Russo MA, Niada S, Petrangeli E, Brini AT.

**Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors.**

Int J Immunopathol Pharmacol. 2013 Jan-Mar;26(1 Suppl):11-21.

Today adipose tissue is not just considered as the primary energy storage organ, but it is also recognized as an important endocrine tissue and an abundant source of mesenchymal stem cells (adipose-derived stem cells, ASCs). During the last decade, several studies have provided preclinical data on the safety and efficacy of ASCs, supporting their use in cell-based therapy for regenerative medicine purposes. Little is known about the effect of obesity on ASCs properties. Since ASCs differentiation and proliferation are determined by their niche, the differences in body fat distribution and the obesity-related co-morbidities may have several consequences. In this study we compared ASCs of subcutaneous adipose tissue from obese (obS-ASCs) and non-obese (nS-ASCs) donors in order to compare their immunophenotype and osteogenic and adipogenic

potential. Moreover, in order to evaluate the possible difference between subcutaneous and visceral fat, obS-ASCs were also compared to ASCs derived from visceral adipose tissue of the same obese donors (obV-ASCs). Our results show that subcutaneous and visceral ASCs derived from obese donors have an impaired cell proliferation, clonogenic ability and immunophenotype. Nevertheless, obS-ASCs are able to differentiate toward osteogenic and adipogenic lineages, although to a small extent with respect to non-obese donors, whereas obV-ASCs lose most of their stem cell characteristics, including multi-differentiation potential. Taken together our findings confirm that not all ASCs present the same behavior, most likely due to their biological microenvironment in vivo. The specific stimuli which can play a key role in ASCs impairment, including the effects of the obesity-related inflammation, should be further investigated to have a complete picture of the phenomenon.

Limana F, Esposito G, Fasanaro P, Foglio E, Arcelli D, Voellenkle C, Di Carlo A, Avitabile D, Martelli F, Russo MA, Pompilio G, Germani A, Capogrossi MC.

**Transcriptional profiling of HMGB1-induced myocardial repair identifies a key role for Notch signalling.**

Mol Ther. 2013 Oct;21(10):1841-1851.

Exogenous high-mobility group box 1 protein (HMGB1) administration to the mouse heart, during acute myocardial infarction (MI), results in cardiac regeneration via resident c-kit(+) cell (CPC) activation. Aim of the present study was to identify the molecular pathways involved in HMGB1-induced heart repair. Gene expression profiling was performed to identify differentially expressed genes in the infarcted and bordering regions of untreated and HMGB1-treated mouse hearts, 3 days after MI. Functional categorization of the transcripts, accomplished using Ingenuity Pathway Analysis software (IPA), revealed that genes involved in tissue regeneration, that is, cardiogenesis, vasculogenesis and angiogenesis, were present both in the infarcted area and in the peri-infarct zone; HMGB1 treatment further increased the expression of these genes. IPA revealed the involvement of Notch signaling pathways in HMGB1-treated hearts. Importantly, HMGB1 determined a 35 and 58% increase in cardiomyocytes and CPCs expressing Notch intracellular cytoplasmic domain, respectively. Further, Notch inhibition by systemic treatment with the -secretase inhibitor DAPT, which blocked the proteolytic activation of Notch receptors, reduced the number of CPCs, their proliferative fraction, and cardiomyogenic differentiation in HMGB1-treated infarcted hearts. The present study gives insight into the molecular processes involved in HMGB1-mediated cardiac regeneration and indicates Notch signaling as a key player.

Nebbioso M, Rusciano D, Pucci B, Zicari A, Grenga R, Pescocolido N.

**Treatment of glaucomatous patients by means of food supplement to reduce the ocular discomfort: a double blind randomized trial.**

Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013;17(8):1117-1122.

Chronic use of multi-dose eye drops containing preservatives, such as it may happen in patients affected by primary open angle glaucoma, often results in a damage of the ocular surface due to the inherent toxicity of preservatives, that with time may lead to a lacrimal dysfunction syndrome and eye dryness. This double blind, randomized, pilot study was conducted on 38 glaucomatous patients suffering from dry eye induced by long-term use of eye drops preserved with BAK. Treatment of these patients with a

food supplement containing an association of forskolin, rutin and vitamins B1 and B2 for 30 days increased significantly their OPI values and improved the symptoms of dry eye with respect to a placebo-treated control group. The association of forskolin, rutin and vitamins B1 and B2 appears to be protective for the ocular surface, contributing to restore a normal equilibrium of the tear film in those subjects in which toxic agents such as BAK had determined alterations of its homeostasis.

Pucci B, Villanova L, Sansone L, Pellegrini L, Tafani M, Carpi A, Fini M, Russo MA.

**Sirtuins: the molecular basis of beneficial effects of physical activity.**

Intern Emerg Med. 2013 Apr;8 Suppl 1:23-25.

The research of the last decade highlighted the existence of a family of genes activated by cellular stresses that allow the cells to reactivate defense and repair activities regardless of age. The prolonged activation of these genes enhances the organism health and lifespan. Members of this gene family are called sirtuins (SIRT). The founding member of the SIRT protein family, Sir2 is a limiting component of yeast longevity. Many members of this family have been also identified as key longevity regulators in species ranging from yeast to fly. On the other hand, the role of SIRT in the regulation of mammalian ageing has been questioned. While SIRT's effects on lifespan are still a matter of scientific debate, the beneficial effects of SIRT in terms of physical health and quality of aging are widely accepted. Increasing evidence suggests a pivotal role for SIRT in mediating the adaptive response to physical exercise. The following review summarizes the knowledge so far acquired on sirtuins' role in mediating beneficial effects of physical exercise. In particular, the first paragraph gives an overture on mammalian sirtuins defining their localization, function when possible, and substrates. In the second paragraph, we discuss recent data regarding alteration of sirtuins expression and activity after physical exercise collected by our laboratory and others'.

Sansone L, Reali V, Pellegrini L, Villanova L, Aventaggiato M, Marfe G, Rosa R, Nebbioso M, Tafani M, Fini M, Russo MA, Pucci B.

**SIRT1 silencing confers neuroprotection through IGF-1 pathway activation.**

J Cell Physiol. 2013 Aug;228(8):1754-1761.

The following study demonstrated that, in in vitro differentiated neurons, SIRT1 silencing induced an increase of IGF-1 protein expression and secretion and of IGF-1R protein levels which, in turn, prolonged neuronal cell survival in presence of an apoptotic insult. On the contrary, SIRT1 overexpression increased cell death. In particular, IGF-1 and IGF-1R expression levels were negatively regulated by SIRT1. In SIRT1 silenced cells, the increase in IGF-1 and IGF-1R expression was associated to an increase in AKT and ERK1/2 phosphorylation. Moreover, neuronal differentiation was reduced in SIRT1 overexpressing cells and increased in SIRT1 silenced cells. We conclude that SIRT1 silenced neurons appear more committed to differentiation and more resistant to cell death through the activation of IGF-1 survival pathway.

Tafani M, De Santis E, Coppola L, Perrone GA, Carnevale I, Russo A, Pucci B, Carpi A, Bizzarri M, Russo MA.

**Bridging hypoxia, inflammation and estrogen receptors in thyroid cancer progression.**

Biomedicine & Pharmacotherapy 2013 [Epub ahead of print]

Thyroid cancer is a common endocrine-related cancer with a higher incidence in women than in men. Thyroid tumors are classified on the basis of their histopathology as papillary, follicular, medullary, and undifferentiated or anaplastic. Epidemiological and in vitro or in vivo studies have suggested a correlation between incidence of thyroid malignancies and hormones. In particular, growing evidence indicates a role of estrogens and estrogen receptors (ERs) in thyroid tumorigenesis, reprogramming and progression. In this scenario, estrogens are hypothesized to contribute to the observed female predominance of thyroid cancer in reproductive years. However, the precise contribution of estrogens in thyroid proliferative disease initiation and progression is not well understood. HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B are two transcription factors very frequently activated in tumors and involved in tumor growth, progression and resistance to chemotherapy. In fact, HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B together regulate transcription of over a thousand genes that, in turn, control vital cellular processes such as adaptation to the hypoxia, metabolic and differentiation reprogramming, inflammatory-reparative response, extracellular matrix digestion, migration and invasion, adhesion, etc. Because of this wide involvement, they could control in an integrated manner the origin of the malignant phenotype. Interestingly, hypoxia and inflammation have been sequentially bridged in tumors by the discovery that alarmin receptors genes such as RAGE, P2X7 and some TLRs are activated by HIF-1 $\alpha$ ; and that, in turn, alarmin receptors strongly activate NF- $\kappa$ B and proinflammatory gene expression, evidencing all the hallmarks of the malignant phenotype. Recently, a large number of drugs have been identified that inhibit one or both transcription factors with promising results in terms of controlling tumor progression. In addition, many of these inhibitors are natural compounds or off-label drugs already used to cure other pathologies. Some of them are undergoing clinical trials and soon they will be used alone or in combination with standard anti-tumoral agents to achieve a better treatment of tumors to achieve a reduction of metastasis formation and, more importantly, a net increase in survival. This review highlights the central role of HIF-1 $\alpha$  activated in hypoxic regions of the tumor, of NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression in transformed thyroid cells to understand their progression toward malignancy. The role of ER- $\alpha$  will be underlined, considering also its role in reprogramming cancer cells.

Tafani M, Perrone GA, Pucci B, Russo A, Bizzarri M, Mechanick JI, Carpi A, Russo MA. **Reprogramming cancer cells in endocrine-related tumors: open issues.** *Current Medicinal Chemistry*, 2014, 21 (Epub ahead of print)

Reprogramming technologies have been developed to revert somatic differentiated cells into pluripotent stem cells that can be differentiated into different lineages potentially useful in stem cell therapy. Reprogramming methods have been progressively refined to increase their efficiency, to obtain a cell population suitable for differentiation, and to eliminate viral plasmid which could be responsible for many unwanted side-effects when used in personalized medicine. All these methods are aimed to introduce into the cell genes or mRNAs encoding a set of four transcription factors (OCT-4, SOX-2, KLF-4 and c-MYC) or a set of three lincRNAs (large intragenic non-coding RNAs) acting downstream of the reprogramming transcription factors OCT-4, SOX-2 and NANOG. Translational clinical applications in human pathologies and in developmental, repair and cancer biology have been numerous. Cancer cells can be, at least in principle, reprogrammed into a normal phenotype. This is a recently raised issue, rapidly advancing in many human tumors, especially endocrine-related cancers, such as breast,

prostate and ovarian ca. The present review aims to describe basic phenomena observed in reprogramming tumor cells and solid tumors and to discuss their meaning in human hormone-related cancers. We will also discuss the fact that some of the targeted transcription factors are "normally" activated in a number of physiological processes, such as morphogenesis, hypoxia and wound healing, suggesting an *in vivo* role of reprogramming for development and homeostasis. Finally, we will review concerns and warnings raised for *in vivo* reprogramming of human tumors and for the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in human therapy.

Tafari M, Pucci B, Russo A, Schito L, Pellegrini L, Perrone GA, Villanova L, Salvatori L, Ravenna L, Petrangeli E, Russo MA.

### **Modulators of HIF1 $\alpha$ and NF $\kappa$ B in cancer treatment: is it a rational approach for controlling malignant progression?**

Front Pharmacol. 2013;4:13.

HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B are two transcription factors very frequently activated in tumors and involved in tumor growth, progression, and resistance to chemotherapy. In fact, HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B together regulate transcription of over a thousand genes that, in turn, control vital cellular processes such as adaptation to the hypoxia, metabolic reprogramming, inflammatory reparative response, extracellular matrix digestion, migration and invasion, adhesion, etc. Because of this wide involvement they could control in an integrated manner the origin of the malignant phenotype. Interestingly, hypoxia and inflammation have been sequentially bridged in tumors by the discovery that alarmin receptors genes such as RAGE, P2X7, and some TLRs, are activated by HIF1 $\alpha$ ; and that, in turn, alarmin receptors strongly activate NF $\kappa$ B and proinflammatory gene expression, evidencing all the hallmarks of the malignant phenotype. Recently, a large number of drugs have been identified that inhibit one or both transcription factors with promising results in terms of controlling tumor progression. In addition, many of these molecules are natural compounds or off-label drugs already used to cure other pathologies. Some of them are undergoing clinical trials and soon they will be used alone or in combination with standard anti-tumoral agents to achieve a better treatment of tumors with reduction of metastasis formation and, more importantly, with a net increase in survival. This review highlights the central role of HIF1 $\alpha$  activated in hypoxic regions of the tumor, of NF $\kappa$ B activation and proinflammatory gene expression in transformed cells to understand their progression toward malignancy. Different molecules and strategies to inhibit these transcription factors will be reviewed. Finally, the central role of a new class of deacetylases called Sirtuins in regulating HIF1 $\alpha$  and NF $\kappa$ B activity will be outlined.

Villanova L, Vernucci E, Pucci B, Pellegrini L, Nebbioso M, Mauri C, Marfe G, Spataro A, Fini M, Banfi G, Russo MA, Tafari M.

### **Influence of age and physical exercise on sirtuin activity in humans.**

J Biol Regul Homeost Agents. 2013 Apr-Jun;27(2):497-507.

Sirtuins are NAD<sup>+</sup>-dependent lysine deacetylases. Sirtuins acquired worldwide attention because of their ability to increase yeast, flies, worms and mice lifespan. Recently, this assumption has been challenged. However, their beneficial role on the quality of ageing is widely accepted. In this work we aimed to study how and if sirtuins expression and activity levels varies in function of age and, in the case of young subjects, of exercise. Fifteen blood donors of different ages and fifteen athletes of the Italian rowing male

team were enrolled and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolated from blood samples. Our results show that sirtuins deacetylases activity measured in PBMCs increases from 18 to 40 years of age and then decreases during the following 20 years. Moreover, physical exercise in professional athletes can upregulate sirtuin activity. Thus, for the first time in humans, we demonstrate that sirtuin activity is a function of age and can be altered through physical exercise.

Antonicelli A, Cafarotti S, Indini A, Galli A, Russo A, Cesario A, Lococo FM, Russo P, Mainini AF, Bonifati LG, Nosotti M, Santambrogio L, Margaritora S, Granone PM, Dutly AE. **EGFR-targeted therapy for non-small cell lung cancer: focus on EGFR oncogenic mutation.**

Int J Med Sci. 2013;10(3):320-330.

The two essential requirements for pathologic specimens in the era of personalized therapies for non-small cell lung carcinoma (NSCLC) are accurate subtyping as adenocarcinoma (ADC) versus squamous cell carcinoma (SqCC) and suitability for EGFR molecular testing, as well as for testing of other oncogenes such as EML4-ALK and KRAS. Actually, the value of EGFR expressed in patients with NSCLC in predicting a benefit in terms of survival from treatment with an epidermal growth factor receptor targeted therapy is still in debate, while there is a convincing evidence on the predictive role of the EGFR mutational status with regard to the response to tyrosine kinase inhibitors (TKIs). This is a literature overview on the state-of-the-art of EGFR oncogenic mutation in NSCLC. It is designed to highlight the preclinical rationale driving the molecular footprint assessment, the progressive development of a specific pharmacological treatment and the best method to identify those NSCLC who would most likely benefit from treatment with EGFR-targeted therapy. This is supported by the belief that a rationale for the prioritization of specific regimens based on patient-tailored therapy could be closer than commonly expected.

Bonassi S, Taioli E, Vermeulen R.

**Omics in population studies: a molecular epidemiology perspective.**

Environ Mol Mutagen. 2013 Aug;54(7):455-460.

The convergence of striking developments in (bio)-technology, increasing availability of biobanked samples, and advances in biostatistics and bio-informatics allow an optimistic outlook for epidemiological research. In this special issue on Omics in Population Studies: A Molecular Epidemiology Perspective we explore and reflect on the potential of these new developments in both exposure science and clinical research since they provide the essential link between exposure and disease and may enable scientists to improve their understanding of disease origin and progression. As noted in this special issue, this is an exciting time for epidemiology. While cancer and other noncommunicable diseases rise in number worldwide, various new tools can be applied effectively to increase understanding of the underlying causes and potential for progression to improve their prevention and treatment.

Cadby G, Mukherjee S, Musk AW, Reid A, Garlepp M, Dick I, Robinson C, Hui J, Fiorito G, Guarrera S, Beilby J, Melton PE, Moses EK, Ugolini D, Mirabelli D, Bonassi S, Magnani C, Dianzani I, Matullo G, Robinson B, Creaney J, Palmer LJ.

**A genome-wide association study for malignant mesothelioma risk.**



Lung Cancer. 2013 Oct;82(1):1-8.

Malignant mesothelioma (MM) is a uniformly fatal tumour of mesothelial cells. MM is caused by exposure to asbestos however most individuals with documented asbestos exposure do not develop MM. Although MM appears to aggregate within families, the genetics of MM susceptibility is a relatively unexplored area. The aim of the current study was to identify genetic factors that contribute to MM risk. A genome-wide association analysis of 2,508,203 single nucleotide polymorphisms (SNPs) from 428 MM cases and 1269 controls from Western Australia was performed. Additional genotyping was performed on a sample of 778 asbestos-exposed Western Australian controls. Replication of the most strongly associated SNPs was undertaken in an independent case-control study of 392 asbestos-exposed cases and 367 asbestos-exposed controls from Italy. No SNPs achieved formal genome-wide statistical significance in the Western Australian study. However, suggestive results for MM risk were identified in the SDK1, CRTAM and RASGRF2 genes, and in the 2p12 chromosomal region. These findings were not replicated in the Italian study, although there was some evidence of replication in the region of SDK1. These suggestive associations will be further investigated in sequencing and functional studies.

Cafarotti S, Cesario A, Porziella V, Leuzzi G, Vita ML, Meacci E, Congedo MT, Granone P. **Post-esophagectomy anastomotic leaks The role of the anastomotic location.** Ann Ital Chir. 2013;84:137-141.

Esophageal anastomotic leaks are associated with significant morbidity and mortality. The purpose of this study was to retrospectively assess the role of the anastomotic positioning (thoracic or cervical) on the incidence of the anastomotic leak and its severity. In the period 2002-07, we have performed extended esophagectomy with a curative-intent in 63 patients with esophageal cancer. The clinical outcome of the 46 patients where a cervical anastomosis was performed (Group A) has been compared with that of the 17 with thoracic anastomosis (Group B), in terms of leak incidence, pattern of healing, morbidity, and mortality.

Leaks occurred in 11% patients of the in group A and in 8% of the group B. When the dehiscence has occurred in the cervical region 1/4th of patients died before the 30th post-operative day compared to the 3/5th of those where the leak occurred at the level of the thorax.

On the basis of our findings we suggest the adopt the cervical anastomosis due to lower mortality rate related when leaks occur.

Calzetta L, Page CP, Spina D, Cazzola M, Rogliani P, Facciolo F, Matera MG. **Effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor RPL554 on human isolated bronchial smooth muscle tone.** J Pharmacol Exp Ther. 2013 Sep;346(3):414-423.

The phosphodiesterase (PDE) enzyme family hydrolyzes cAMP and cGMP, second messengers that regulate a variety of cellular processes, including airway smooth muscle (ASM) relaxation and the inhibition of inflammatory cells. We investigated the activity of RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one], a dual PDE3/PDE4 inhibitor that exhibits bifunctional activity for its effects on the tone of human isolated ASM

and any potential synergistic interactions with muscarinic receptor antagonists or a 2-agonist. We evaluated the influence of RPL554 on the contractile response induced by electrical field stimulation (EFS), acetylcholine (ACh), or histamine on human isolated bronchi. We also analyzed the potential synergistic effect of RPL554 in combination with atropine, glycopyrrolate, or salbutamol by using the Berenbaum Bliss Independence (BI), or the dose equivalence methods. RPL554 inhibited the contraction induced by EFS [maximal effectiveness (Emax)  $91.33 \pm 3.37\%$ ,  $P < 0.001$ ], relaxed bronchi precontracted with ACh (Emax  $94.62 \pm 2.63\%$ , pD2  $4.84 \pm 0.12$ ,  $P < 0.001$ ), and abolished the contraction induced by histamine. Analysis of interactions indicated a weak synergism between RPL554 and salbutamol (interaction index:  $0.25 \pm 0.06$ ; BI effect:  $0.29 \pm 0.11$ ; dose equivalence: no synergism) but significant synergism between RPL554 and atropine (interaction index:  $0.09 \pm 0.07$ ; BI effect:  $0.54 \pm 0.09$ ; dose equivalence: synergism for low concentrations) or glycopyrrolate (ACh: BI effect  $0.46 \pm 0.03$ , Berenbaum effect  $0.42 \pm 0.02$ ; histamine: BI effect  $0.46 \pm 0.03$ , Berenbaum effect  $0.42 \pm 0.03$ ). This study demonstrates that RPL554 relaxes human bronchi and that it can interact with a muscarinic receptor antagonist to produce a synergistic inhibition of ASM tone. These results suggest that RPL554 may provide a novel treatment of airway diseases, either alone or in combination with antimuscarinic drugs.

Calzetta L, Passeri D, Kanabar V, Rogliani P, Page C, Cazzola M, Matera MG, Orlandi A. **Brain natriuretic peptide protects against hyperreactivity of human asthmatic airway smooth muscle via an epithelial cell dependent mechanism.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014 Mar;50(3):493-501.

Brain natriuretic peptide (BNP) relaxes airways by activating natriuretic peptide receptor-A and elevating cyclic guanosine monophosphate. BNP is more effective in passively sensitized human bronchi compared with control airways. The molecular and cellular patterns involved in this signaling are unknown. The aim of this study was to investigate the influence of BNP on airway smooth muscle (ASM) cells obtained from donors with asthma and healthy donors and to identify the mechanisms involved in BNP-mediated relaxation. The contractile response of ASM cells was microscopically assessed in vitro in the presence of  $1 \mu\text{M}$  BNP or with supernatant from human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells pretreated with  $1 \mu\text{M}$  BNP. We investigated the role of muscarinic M2 receptors and inducible nitric oxide synthase (iNOS), quantified the release of acetylcholine and nitric oxide (NO), and assessed the gene/protein expression of iNOS and myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1). Supernatant from BEAS-2B cells treated with BNP reduced the hyperreactivity of asthmatic ASM cells by shifting the potency of histamine by 1.19-fold but had no effect in healthy ASM cells. BNP was not effective directly on ASM cells. Blocking muscarinic M2-receptors and iNOS abolished the protective role of supernatant from BEAS-2B treated with BNP. BNP stimulated the release of acetylcholine ( $210.7 \pm 11.1\%$ ) from BEAS-2B cells that in turn increased MYPT1 and iNOS gene/protein expression and enhanced NO levels in asthmatic ASM supernatant ( $35.0 \pm 13.0\%$ ). This study provides evidence that BNP protects against bronchial hyperresponsiveness via an interaction between respiratory epithelium and ASM in subjects with asthma.

Calzetta L, Spina D, Page C, Rogliani P, Facciolo F, Cazzola M, Matera MG. **The effect of the mixed phosphodiesterase 3/4 inhibitor rpl554 on human isolated bronchial smooth muscle tone.**

J Pharmacol Exp Ther. 2013 Sep;346(3):414-423.

The phosphodiesterase (PDE) enzyme family hydrolyzes cAMP and cGMP, second messengers that regulate a variety of cellular processes, including airway smooth muscle (ASM) relaxation and the inhibition of inflammatory cells. We investigated the activity of RPL554 [9,10-dimethoxy-2(2,4,6-trimethylphenylimino)-3-(n-carbamoyl-2-aminoethyl)-3,4,6,7-tetrahydro-2H-pyrimido[6,1-a]isoquinolin-4-one], a dual PDE3/PDE4 inhibitor that exhibits bifunctional activity for its effects on the tone of human isolated ASM and any potential synergistic interactions with muscarinic receptor antagonists or a  $\beta_2$ -agonist. We evaluated the influence of RPL554 on the contractile response induced by electrical field stimulation (EFS), acetylcholine (ACh), or histamine on human isolated bronchi. We also analyzed the potential synergistic effect of RPL554 in combination with atropine, glycopyrrolate, or salbutamol by using the Berenbaum Bliss Independence (BI), or the dose equivalence methods. RPL554 inhibited the contraction induced by EFS [maximal effectiveness ( $E_{max}$ )  $91.33 \pm 3.37\%$ ,  $P < 0.001$ ], relaxed bronchi precontracted with ACh ( $E_{max}$   $94.62 \pm 2.63\%$ ,  $pD_2$   $4.84 \pm 0.12$ ,  $P < 0.001$ ), and abolished the contraction induced by histamine. Analysis of interactions indicated a weak synergism between RPL554 and salbutamol (interaction index:  $0.25 \pm 0.06$ ; BI effect:  $0.29 \pm 0.11$ ; dose equivalence: no synergism) but significant synergism between RPL554 and atropine (interaction index:  $0.09 \pm 0.07$ ; BI effect:  $0.54 \pm 0.09$ ; dose equivalence: synergism for low concentrations) or glycopyrrolate (ACh: BI effect  $0.46 \pm 0.03$ , Berenbaum effect  $0.42 \pm 0.02$ ; histamine: BI effect  $0.46 \pm 0.03$ , Berenbaum effect  $0.42 \pm 0.03$ ). This study demonstrates that RPL554 relaxes human bronchi and that it can interact with a muscarinic receptor antagonist to produce a synergistic inhibition of ASM tone. These results suggest that RPL554 may provide a novel treatment of airway diseases, either alone or in combination with antimuscarinic drugs.

Capurso G, Boccia S, Salvia R, Del Chiaro M, Frulloni L, Arcidiacono PG, Zerbi A, Manta R, Fabbri C, Ventrucci M, Tarantino I, Piciocchi M, Carnuccio A, Boggi U, Leoncini E, Costamagna G, Delle Fave G, Pezzilli R, Bassi C, Larghi A.

**Risk factors for intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMN) of the pancreas: a multicentre case-control study.**

Am J Gastroenterol. 2013 Jun;108(6):1003-1009.

To investigate environmental, personal, and hereditary risk factors associated with the occurrence of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas (IPMNs). Multicentre case-control study. Risk factors were identified from a questionnaire collecting data on family and medical history, and environmental factors. Cases were prevalent IPMNs seen at the participating units within an 18-month timeframe. Matched controls were enrolled alongside patients seen at outpatient clinics. Three-hundred and ninety patients with IPMN and 390 matched controls (166 males, mean age 65 in each group) were enrolled. Of the IPMNs, 310 had branch-duct involvement and 80 main-duct involvement. The only cancer with a 1st degree family history significantly higher in IPMN was pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) (5.4% vs. 1.5%). Previous history of diabetes (13.6% vs. 7.5%), chronic pancreatitis (CP) (3.1% vs. 0.3%), peptic ulcer (7.2% vs. 4.3%), and insulin use (4.9% vs. 1.1%) were all more frequent with IPMNs. Logistic regression multivariate analysis revealed that history of diabetes (odds ratio (OR): 1.79, confidence interval (CI) 95%: 1.08-2.98), CP (OR: 10.10, CI 95%: 1.30-78.32), and family histories of PDAC (OR: 2.94, CI 95%: 1.17-7.39) were all independent risk factors. However, when analysis was restricted to diabetics who had taken insulin, risk of IPMN be-

came stronger (OR: 6.03, CI 95%: 1.74-20.84). The association with all these risk factors seemed stronger for the subgroup with main duct involvement. A previous history of diabetes, especially with insulin use, CP, and family history of PDAC are all relevant risk factors for the development of IPMN. These results suggest an overlap between certain risk factors for PDAC and IPMN.

Cazzola M, Calzetta L, Lauro D, Bettoncelli G, Cricelli C, Di Daniele N, Rogliani P.  
**Asthma and COPD in an Italian adult population: role of BMI considering the smoking habit.**

Respir Med. 2013 Sep;107(9):1417-1422.

Smoking and body mass index (BMI) are well-documented risk factors that contribute substantially to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. However, the relations among smoking, obesity, and COPD or asthma remain to be clarified. We conducted a population-based cross-sectional epidemiologic study to explore the association between BMI and COPD or asthma among non-smokers, smokers and ex-smokers using information obtained from the Health Search database (HSD) owned by the Italian College of General Practitioners (SIMG), which stores information on about 1.5% of the total Italian population served by general practitioners (GPs). Our study confirms the importance of smoking status in patients with COPD, but not in those with asthma. Moreover, it demonstrates that the increase in BMI is frequently associated with the diagnosis of COPD or asthma, suggesting that the probability of suffering from COPD or asthma increases with the increase in body weight regardless of the smoking status. The association between an increase in BMI appears to be greater in women than in men. Our data also show that underweight is significantly associated with COPD, but only in men, while being underweight apparently protects from the possibility of suffering from asthma.

Cazzola M, Page CP, Matera MG.

**Acclidinium bromide for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease.**

Expert Opin Pharmacother. 2013 Jun;14(9):1205-1214.

Although there are some challenges with current therapies, the growing evidence that tiotropium bromide is important in the maintenance treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) has led to enthusiastic investigation in search of novel muscarinic antagonists which share some of the beneficial characteristics of tiotropium and perhaps improve upon less desirable ones. Acclidinium bromide is a new muscarinic antagonist that has been developed to relieve symptoms in patients with COPD. Pre-clinical data showed that it has an intriguing pharmacodynamic and pharmacokinetic profile. Acclidinium bromide was initially assessed as a once-daily bronchodilator. Subsequently, it has been evaluated as a twice-daily agent to increase the size of the clinical effect. Pivotal Phase III trials have documented that acclidinium bromide 400 µg twice-daily shows clinically meaningful effects in lung function and other important supportive outcomes, such as health-related quality of life, dyspnea and night-time/early morning symptoms, and is safe. Acclidinium bromide can be used as an alternative to tiotropium or a long-acting  $\beta_2$ -agonist. It is likely that the device used to deliver acclidinium, Genuair inhaler, a novel, multidose and a breath-actuated dry powder inhaler (DPI), will be important for the possible success of this drug. However, additional Phase III trials to assess advantages over tiotropium bromide and long-acting  $\beta_2$ -agonists are required to

allow the place of acclidinium bromide to be fully elucidated.

Cazzola M, Page CP, Rogliani P, Matera MG.

### **2-agonist therapy in lung disease.**

Am J Respir Crit Care Med. 2013 Apr;187(7):690-696.

2-Agonists are effective bronchodilators due primarily to their ability to relax airway smooth muscle (ASM). They exert their effects via their binding to the active site of 2-adrenoceptors on ASM, which triggers a signaling cascade that results in a number of events, all of which contribute to relaxation of ASM. There are some differences between 2-agonists. Traditional inhaled short-acting 2-agonists albuterol, fenoterol, and terbutaline provide rapid as-needed symptom relief and short-term prophylactic protection against bronchoconstriction induced by exercise or other stimuli. The twice-daily 2-agonists formoterol and salmeterol represent important advances. Their effective bronchodilating properties and long-term improvement in lung function offer considerable clinical benefits to patients. More recently, a newer 2-agonist (indacaterol) with a longer pharmacodynamic half-life has been discovered, with the hopes of achieving once-daily dosing. In general, 2-agonists have an acceptable safety profile, although there is still controversy as to whether long-acting 2-agonists may increase the risk of asthma mortality. In any case, they can induce adverse effects, such as increased heart rate, palpitations, transient decrease in PaO<sub>2</sub>, and tremor. Desensitization of 2-adrenoceptors that occurs during the first few days of regular use of 2-agonist treatment may account for the commonly observed resolution of the majority of these adverse events after the first few doses. Nevertheless, it can also induce tolerance to bronchoprotective effects of 2-agonists and has the potential to reduce bronchodilator sensitivity to them. Some novel once-daily 2-agonists (olodaterol, vilanterol, abediterol) are under development, mainly in combination with an inhaled corticosteroid or a long-acting antimuscarinic agent.

Cazzola M, Rogliani P, Matera MG.

### **Acclidinium bromide/formoterol fumarate fixed-dose combination for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease.**

Expert Opin Pharmacother. 2013 Apr;14(6):775-781.

Combining a long-acting (2)-agonist (LABA) and a long-acting antimuscarinic agent (LAMA) is potentially a good pharmacological approach to improve clinical results in stable moderate chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients when symptoms are not adequately controlled with tiotropium monotherapy. Consequently, there is a strong interest in developing a LABA/LAMA fixed-dose combination therapy in an attempt to simplify the treatment. An acclidinium bromide/formoterol fumarate fixed-dose combination is under development. The few clinical data at our disposal suggest that the addition of formoterol fumarate to acclidinium bromide results in greater bronchodilation than formoterol fumarate or acclidinium bromide alone. However, a large Phase III program is involving a huge number of patients with moderate-to-severe COPD and consists of large long-term (from 24 to 52 weeks) pivotal clinical trials that have been designed to fulfil both European Medicines Agency (EMA) and Food and Drug Administration (FDA) requirements and are evaluating the efficacy and safety of this fixed-dose combination. Studies assessing the impact of acclidinium bromide/formoterol fumarate fixed-dose combination on COPD exacerbations, exercise capacity and hospitalisations are clearly needed to better detect its potential effects of disease

modification in COPD. Moreover, it seems pragmatic to proceed with its introduction in the market at a highly competitive price.

Cazzola M, Rogliani P, Ruggeri P, Segreti A, Proietto A, Picciolo S, Matera MG.

**Chronic treatment with indacaterol and airway response to salbutamol in stable COPD.**

Respir Med. 2013 Jun;107(6):848-853.

Tolerance to both the bronchoprotective effect, and, to a lesser extent, the bronchodilator activity, occurs with all inhaled  $\beta_2$ -agonists. Assuming the importance of this topic and the lack of a clinical evaluation specifically designed to assess the impact of chronic administration of indacaterol on the response to salbutamol, we sought to compare the effect of 4-week treatment with indacaterol 150  $\mu\text{g}$  once-daily versus formoterol 12  $\mu\text{g}$  twice-daily on the dose-response curve to inhaled salbutamol (total cumulative dose of 800  $\mu\text{g}$ ) in a non-double-blinded, crossover, randomised, and controlled pilot trial that enrolled 20 outpatients with moderate to severe COPD. At the end of 4-week treatments, there was not a statistically significant difference between the two trough FEV1 ( $p = 0.16$ ), and both indacaterol and formoterol were able to produce a significant ( $p < 0.001$ ) increase in FEV1 mean differences (L) = indacaterol 0.15 (95% confidence interval (CI) 0.12-0.18); formoterol 0.10, (95% CI 0.08-0.12) 2 h after their inhalation. Salbutamol elicited an evident dose-dependent increase in FEV1 and this occurred also after regular treatment with indacaterol and formoterol with a further mean maximum increase of 0.10L (95% CI 0.05-0.14) and 0.05L (95% CI 0.02-0.08), respectively. The differences between indacaterol and formoterol in FEV1 increases after salbutamol were never statistically significant. The results of this study support the use of salbutamol as rescue medication for rapid relief of bronchospasm in patients suffering from COPD, even when they are under regular treatment with indacaterol.

Coelho P, Costa S, Costa C, Silva S, Walter A, Ranville J, Pastorinho MR, Harrington C, Taylor A, Dall'armi V, Zoffoli R, Candeias C, da Silva EF, Bonassi S, Laffon B, Teixeira JP.  
**Biomonitoring of several toxic metal(loid)s indifferent biological matrices from environmentally and occupationally exposed populations from Panasqueira mine area, Portugal.**

Environ Geochem Health. 2013 Aug 30. [Epub ahead of print]

In the Panasqueira mine area of central Portugal, some environmental media show higher metal(loid) concentrations when compared with the local geochemical background and the values proposed in the literature for these environmental media. In order to evaluate the effect of the external contamination on selected indexes of internal dose, As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, S, Se, Si, and Zn were quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma optical emission spectrometry in blood, urine, hair and nail samples from individuals environmentally ( $N = 41$ ) and occupationally exposed ( $N = 41$ ). A matched control group ( $N = 40$ ) was also studied, and data from the three groups were compared. Results obtained agreed with those reported by environmental studies performed in this area, pointing to populations living nearby and working in the mine being exposed to metal(loid)s originated from mining activities. Arsenic was the element with the highest increase in exposed populations. The concentration of other elements such as Cr, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, S, Se, and Zn was also increased, although at a lesser extent, specifically in the individuals

environmentally exposed and in females. These findings confirm the need for competent authorities to act as soon as possible in this area and implement strategies aimed to protect exposed populations and the entire ecosystem.

Coelho P, García-Lestón J, Costa S, Costa C, Silva S, Dall'armi V, Zoffoli R, Bonassi S, de Lima JP, Gaspar JF, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP.

**Genotoxic effect of exposure to metal(loid)s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portugal.**

Portugal. *Environ Int.* 2013 Sep 12;60C:163-170.

Previous studies investigating the exposure to metal(loid)s of populations living in the Panasqueira mine area of central Portugal found a higher internal dose of elements such as arsenic, chromium, lead, manganese, molybdenum and zinc in exposed individuals. The aims of the present study were to evaluate the extent of genotoxic damage caused by environmental and occupational exposure in individuals previously tested for metal(loid) levels in different biological matrices, and the possible modulating role of genetic polymorphisms involved in metabolism and DNA repair. T-cell receptor mutation assay, comet assay, micronucleus (MN) test and chromosomal aberrations (CA) were performed in a group of 122 subjects working in the Panasqueira mine or living in the same region. The modifying effect of polymorphisms in GSTA2, GSTM1, GSTP1, GSTT1, XRCC1, APEX1, MPG, MUTYH, OGG1, PARP1, PARP4, ERCC1, ERCC4, and ERCC5 genes was investigated. Significant increases in the frequency of all biomarkers investigated were found in exposed groups, however those environmentally exposed were generally higher. Significant influences of polymorphisms were observed for GSTM1 deletion and OGG1 rs1052133 on CA frequencies, APEX1 rs1130409 on DNA damage, ERCC1 rs3212986 on DNA damage and CA frequency, and ERCC4 rs1800067 on MN and CA frequencies. Our results show that the metal(loid) contamination in the Panasqueira mine area induced genotoxic damage both in individuals working in the mine or living in the area. The observed effects are closely associated to the internal exposure dose, and are more evident in susceptible genotypes. The urgent intervention of authorities is required to protect exposed populations.

Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhanwan A, Benzie I, Coskun E, Moretti M, Speit G, Bonassi S; for the ComNet project.

**The comet assay as a tool for human biomonitoring studies:**

The ComNet Project. *Mutat Res.* 2013 Oct 31. [Epub ahead of print]

The comet assay is widely used in human biomonitoring to measure DNA damage as a marker of exposure to genotoxic agents or to investigate genoprotective effects. Studies often involve small numbers of subjects, and design may be sub-optimal in other respects. In addition, comet assay protocols in use in different laboratories vary significantly. In spite of these difficulties, it is appropriate to carry out a pooled analysis of all available comet assay biomonitoring data, in order to establish baseline parameters of DNA damage, and to investigate associations between comet assay measurements and factors such as sex, age, smoking status, nutrition, lifestyle, etc. With this as its major objective, the ComNet project has recruited almost 100 research groups willing to share datasets. Here we provide a background to this project, discussing the history of the comet assay and practical issues that can critically affect its performance. We survey its diverse applications in biomonitoring studies, including environmental and occupatio-

nal exposure to genotoxic agents, genoprotection by dietary and other factors, DNA damage associated with various diseases, and intrinsic factors that affect DNA damage levels in humans. We examine in depth the quality of data from a random selection of studies, from an epidemiological and statistical point of view.

Crisafulli E, Iattoni A, Venturelli E, Siscaro G, Beneventi C, Cesario A, Clini EM. P **redicting walking-induced oxygen desaturations in COPD patients: a statistical model.**

Respir Care. 2013 Sep;58(9):1495-1503.

Oxygen desaturation during walking can have important consequence on prognosis of COPD patients. However, a standard 6-min walk test (6MWT), useful in detecting desaturation in COPD patients, can be difficult to execute in some settings of COPD management, as in the community healthcare service. We evaluated a new scoring system for the risk of oxygen desaturation during walking in COPD patients: the walking desaturation score. We collected data from symptomatic COPD in-patients admitted for rehabilitation (derivation cohort) and out-patients referred to the local community health service (validation cohort).  $S(pO_2)$  was monitored during 6MWT, and the subjects were classified as walking desaturators or non-desaturators. By a regression analysis model we assigned a weighted score proportional to the measured percentage of explained variance for each variable. Risk estimates were computed as odds ratios. A receiver operating characteristic curve analysis and a Hosmer-Lemeshow goodness-of-fit test were then performed to measure discrimination and calibration of walking desaturation score. Baseline characteristics in the derivation cohort ( $n = 435$ , 74% of whom were walking desaturators) and the validation cohort ( $n = 238$ , 37% of whom were walking desaturators) were different. Resting arterial oxygen saturation measured from an arterial blood sample,  $P(aO_2)$ , and percent-of-predicted FEV1 were the variables that predicted walking desaturation. The proportion of walking desaturators (and odds ratio estimate) gradually increased according to walking desaturation score (range 0-6) and associated categories of desaturation risk (total walking desaturation score: low 0 or 1, high 2-3, very high 4-6) (chi-square  $P < .001$ ). There was considerable predictive discrimination (area under the curve 0.90, 95% CI 0.86-0.93,  $P < .001$ ), and calibration (Hosmer-Lemeshow chi-square 1.31,  $P = .86$ ) values have been shown. Walking desaturation score accurately predicts and classifies the risk of walking desaturation in COPD patients.

Ianuale C, Cadoni G, De Feo E, Liberati L, Simo RK, Paludetti G, Ricciardi W, Boccia S. **A systematic review and meta-analysis of the diagnostic accuracy of anti-heat shock protein 70 antibodies for the detection of autoimmune hearing loss.**

Otol Neurotol. 2013 Feb;34(2):214-219.

We reviewed case-control studies concerning the diagnostic accuracy of Heat Shock Protein 70 (Hsp-70) auto antibodies in the detection of immunomediated inner ear disease. We searched for relevant articles published in English language on PubMed and Scopus up to December 2011. A quality assessment of the retrieved articles was performed using the Quality Assessment of Diagnostic Accuracy Studies (QUADAS) 2 tool. Pooled data on the accuracy of the test were calculated, where possible. Three articles were deemed eligible. Among them, 2 evaluated the relationship between Hsp-70 and immunomediated inner ear disease by using the Western blot, whereas one report



used the enzyme-linked immunosorbent assay method. Pooled sensitivity of Western blot test for Hsp-70 was 0.70 (95% confidence interval [CI], 0.59-0.80), with a large heterogeneity ( $I = 72.7\%$ ), and pooled specificity was 0.98 (95% CI, 0.87-1.00), with an  $I$  of 61.0%. Pooled positive likelihood ratios (LR) was 14.7 (95% CI, 2.1-104.1;  $I = 31.4\%$ ), and pooled negative LR was 0.32 (95% CI, 0.10-0.70;  $I = 78.8\%$ ). Sensitivity and specificity of enzyme-linked immunosorbent assay test for Hsp-70 auto antibodies was 0.85 (95% CI, 0.55-0.98) and 0.98 (95% CI, 0.86-1.00). Risk of bias was performed by using QUADAS 2 tool, with high scores obtained for patient selection and index test domains and low for the applicability criterion. This review shows that studies on autoimmune hearing loss diagnosis based on the detection of Hsp-70 autoantibodies used different inclusion and methodologic criteria and are affected from potential bias. Additional studies are actually required to identify an accurate laboratory diagnostic method for the autoimmune hearing loss.

Fenech M, Kirsch-Volders M, Rossnerova A, Sram R, Romm H, Bolognesi C, Ramakumar A, Soussaline F, Schunck C, Elhajouji A, Anwar W, Bonassi S.

**HUMN project initiative and review of validation, quality control and prospects for further development of automated micronucleus assays using image cytometry systems.**

Int J Hyg Environ Health. 2013 Aug;216(5):541-552.

The use of micronucleus (MN) assays in in vitro genetic toxicology testing, radiation biodosimetry and population biomonitoring to study the genotoxic impacts of environment gene-interactions has steadily increased over the past two decades. As a consequence there has been a strong interest in developing automated systems to score micronuclei, a biomarker of chromosome breakage or loss, in mammalian and human cells. This paper summarises the outcomes of a workshop on this topic, organised by the HUMN project, at the 6th International Conference on Environmental Mutagenesis in Human Populations at Doha, Qatar, 2012. The aim of this paper is to summarise the outcomes of the workshop with respect to the set objectives which were: (i) Review current developments in automation of micronucleus assays by image cytometry; (ii) define the performance characteristics of automated MN scoring using image cytometry and methods of assessment for instrument validation and quality control and (iii) discuss the design of inter-laboratory comparisons and standardisation of micronucleus assays using automated image cytometry systems. It is evident that automated scoring of micronuclei by automated image cytometry using different commercially available platforms [e.g. Metafer (MetaSystems), Pathfinder™ (IMSTAR), iCyte® (Compucyte)], particularly for lymphocytes, is at a mature stage of development with good agreement between visual and automated scoring across systems (correlation factors ranging from 0.58 to 0.99). However, a standardised system of validation and calibration is required to enable more reliable comparison of data across laboratories and across platforms. This review identifies recent progress, important limitations and steps that need to be taken into account to enable the successful universal implementation of automated micronucleus assays by image cytometry.

Franchi C, Mari D, Tettamanti M, Pasina L, Djade CD, Mannucci PM, Onder G, Bernabei R, Gussoni G, Bonassi S, Nobili A; On behalf of ELICADHE Investigators.

**E-learning to improve the drug prescribing in the hospitalized elderly patients: the ELICADHE feasibility pilot study.**

Aging Clin Exp Res. 2013 Dec 17. [Epub ahead of print]

E-learning is an efficient and cost-effective educational method.

This study aimed at evaluating the feasibility of an educational e-learning intervention, focused on teaching geriatric pharmacology and notions of comprehensive geriatric assessment, to improve drug prescribing to hospitalized elderly patients.

Eight geriatric and internal medicine wards were randomized to intervention (e-learning educational program) or control. Clinicians of the two groups had to complete a specific per group e-learning program in 30 days. Then, ten patients (aged  $\geq 75$  years) had to be consecutively enrolled collecting clinical data at hospital admission, discharge, and 3 months later. The quality of prescription was evaluated comparing the prevalence of potentially inappropriate medications through Beer's criteria and of potential drug-drug interactions through a specific computerized database.

The study feasibility was confirmed by the high percentage (90 %) of clinicians who completed the e-learning program, the recruitment, and follow-up of all planned patients. The intervention was well accepted by all participating clinicians who judged positively (a mean score of  $>3$  points on a scale of 5 points: 0 = useless; 5 = most useful) the specific contents, the methodology applied, the clinical relevance and utility of e-learning contents and tools for the evaluation of the appropriateness of drug prescribing.

The pilot study met all the requested goals. The main study is currently ongoing and is planned to finish on July 2015.

Franciosi LG, Diamant Z, Banner KH, Zuiker R, Morelli N, Kamerling IMC, de Kam ML, Burggraaf J, Cohen AF, Cazzola M, Calzetta L, Singh D, Spina D, Walker MJA, Page CP. **Efficacy and safety of RPL554, a dual PDE3 and PDE4 inhibitor, in healthy volunteers and in patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease: findings from four clinical trials.**

The Lancet Respiratory Medicine 2013 [Epub ahead of print]

Many patients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease (COPD) routinely receive a combination of an inhaled bronchodilator and anti-inflammatory glucocorticosteroid, but those with severe disease often respond poorly to these classes of drug. We assessed the efficacy and safety of a novel inhaled dual phosphodiesterase 3 (PDE3) and PDE4 inhibitor, RPL554 for its ability to act as a bronchodilator and anti-inflammatory drug.

Between February, 2009, and January, 2013, we undertook four proof-of-concept clinical trials in the Netherlands, Italy, and the UK. Nebulised RPL554 was examined in study 1 for safety in 18 healthy men who were randomly assigned (1:1:1) to receive an inhaled dose of RPL554 (0.003 mg/kg or 0.009 mg/kg) or placebo by a computer-generated randomisation table. Subsequently, six non-smoking men with mild allergic asthma received single doses of RPL554 (three received 0.009 mg/kg and three received 0.018 mg/kg) in an open-label, adaptive study, and then ten men with mild allergic asthma were randomly assigned to receive placebo or RPL554 (0.018 mg/kg) by a computer-generated randomisation table for an assessment of safety, bronchodilation, and bronchoprotection. Study 2 examined the reproducibility of the bronchodilator response to a daily dose of nebulised RPL554 (0.018 mg/kg) for 6 consecutive days in a single-blind (patients masked), placebo-controlled study in 12 men with clinically stable asthma. The safety and bronchodilator effect of RPL554 (0.018 mg/kg) was assessed in study 3, an open-label, placebo-controlled crossover trial, in 12 men with mild-to-moderate COPD. In study 4, a placebo-controlled crossover trial, the effect of RPL554

(0.018 mg/kg) on lipopolysaccharide-induced inflammatory cell infiltration in induced sputum was investigated in 21 healthy men. In studies 3 and 4, randomisation was done by computer-generated permutation with a block size of two for study 3 and four for study 4. Unless otherwise stated, participants and clinicians were masked to treatment assignment. Analyses were by intention to treat. All trials were registered with EudraCT, numbers 2008-005048-17, 2011-001698-22, 2010-023573-18, and 2012-000742-34.

Safety was a primary endpoint of studies 1 and 3 and a secondary endpoint of studies 2 and 4. Overall, RPL554 was well tolerated, and adverse events were generally mild and of equal frequency between placebo and active treatment groups. Efficacy was a primary endpoint of study 2 and a secondary endpoint of studies 1 and 3. Study 1 measured change in forced expiratory volume in 1 s (FEV1) and provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in FEV1 (PC20MCh) in participants with asthma. RPL554 produced rapid bronchodilation in patients with asthma with an FEV1 increase at 1 h of 520 mL (95% CI 320-720;  $p < 0.0001$ ), which was a 14% increase from placebo, and increased the PC20MCh by 1.5 doubling doses (95% CI 0.63-2.28;  $p = 0.004$ ) compared with placebo. The primary endpoint of study 2 was maximum FEV1 reached during 6 h after dosing with RPL554 in patients with asthma. RPL554 produced a similar maximum mean increase in FEV1 from placebo on day 1 (555 mL, 95% CI 442-668), day 3 (505 mL, 392-618), and day 6 (485 mL, 371-598; overall  $p < 0.0001$ ). A secondary endpoint of study 3 (patients with COPD) was the increase from baseline in FEV1. RPL554 produced bronchodilation with a mean maximum FEV1 increase of 17.2% (SE 5.2). In healthy individuals (study 4), the primary endpoint was percentage change in neutrophil counts in induced sputum 6 h after lipopolysaccharide challenge. RPL554 (0.018 mg/kg) did not significantly reduce the percentage of neutrophils in sputum (80.3% in the RPL554 group vs 84.2% in the placebo group; difference -3.9%, 95% CI -9.4 to 1.6,  $p = 0.15$ ), since RPL554 significantly reduced neutrophils ( $p = 0.002$ ) and total cells ( $p = 0.002$ ) to a similar degree.

In four exploratory studies, inhaled RPL554 is an effective and well tolerated bronchodilator, bronchoprotector, and anti-inflammatory drug and further studies will establish the full potential of this new drug for the treatment of patients with COPD or asthma.

Larghi A, Panic N, Capurso G, Leoncini E, Arzani D, Salvia R, Del Chiaro M, Frulloni L, Arcidiacono PG, Zerbi A, Manta R, Fabbri C, Ventrucci M, Tarantino I, Piciocchi M, Carnuccio A, Boggi U, Costamagna G, Delle Fave G, Pezzilli R, Bassi C, Bulajic M, Ricciardi W, Boccia S.

### **Prevalence and risk factors of extrapancreatic malignancies in a large cohort of patients with intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) of the pancreas.**

Ann Oncol. 2013 Jul;24(7):1907-1911.

The objectives of this study are to estimate prevalence and incidence of extrapancreatic malignancies (EPMs) among intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs) of the pancreas, and to identify risk factors for their occurrence.

We conducted multicentric cohort study in Italy from January 2010 to January 2011 including 390 IPMN cases. EPMs were grouped as previous, synchronous (both prevalent) and metachronous (incident). We calculated the observed/expected (O/E) ratio of prevalent EPMs, and compared the distribution of demographic, medical history and lifestyle habits.

Ninety-seven EPMs were diagnosed in 92 patients (23.6%), among them 78 (80.4%) were previous, 14 (14.4%) were synchronous and 5 (5.2%) were metachronous. O/E ratios

for prevalent EPMs were significantly increased for colorectal carcinoma (2.26; CI 95% 1.17-3.96), renal cell carcinoma (6.00; CI 95% 2.74-11.39) and thyroid carcinoma (5.56; CI 95% 1.80-12.96). Increased age, heavy cigarette smoking, alcohol consumption and first-degree family history of gastric cancer are significant risk factors for EPMs, while first-degree family history of colorectal carcinoma was borderline.

We report an increased prevalence of EPMs in Italian patients with IPMN, especially for colorectal carcinoma, renal cell and thyroid cancers. A systematic surveillance of IPMN cases for such cancer types would be advised.

Leoncini E, Ricciardi W, Cadoni G, Arzani D, Petrelli L, Paludetti G, Brennan P, Luce D, Stucker I, Matsuo K, Talamini R, La Vecchia C, Olshan AF, Winn DM, Herrero R, Franceschi S, Castellsague X, Muscat J, Morgenstern H, Zhang ZF, Levi F, Dal Maso L, Kelsey K, McClean M, Vaughan TL, Lazarus P, Purdue MP, Hayes RB, Chen C, Schwartz SM, Shangina O, Koifman S, Ahrens W, Matos E, Laggiou P, Lissowska J, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Menezes A, Agudo A, Daudt AW, Richiardi L, Kjaerheim K, Mates D, Betka J, Yu GP, Schantz S, Simonato L, Brenner H, Conway DI, Macfarlane TV, Thomson P, Fabianova E, Znaor A, Rudnai P, Healy C, Boffetta P, Chuang SC, Lee YC, Hashibe M, Boccia S.

#### **Adult height and head and neck cancer: a pooled analysis within the INHANCE Consortium.**

Eur J Epidemiol. 2013 Nov 24. [Epub ahead of print]

Several epidemiological studies have shown a positive association between adult height and cancer incidence. The only study conducted among women on mouth and pharynx cancer risk, however, reported an inverse association. This study aims to investigate the association between height and the risk of head and neck cancer (HNC) within a large international consortium of HNC. We analyzed pooled individual-level data from 24 case-control studies participating in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Odds ratios (ORs) and 95 % confidence intervals (CIs) were estimated separately for men and women for associations between height and HNC risk. Educational level, tobacco smoking, and alcohol consumption were included in all regression models. Stratified analyses by HNC subsites were performed. This project included 17,666 cases and 28,198 controls. We found an inverse association between height and HNC (adjusted OR per 10 cm height = 0.91, 95 % CI 0.86-0.95 for men; adjusted OR = 0.86, 95 % CI 0.79-0.93 for women). In men, the estimated OR did vary by educational level, smoking status, geographic area, and control source. No differences by subsites were detected. Adult height is inversely associated with HNC risk. As height can be considered a marker of childhood illness and low energy intake, the inverse association is consistent with prior studies showing that HNC occur more frequently among deprived individuals. Further studies designed to elucidate the mechanism of such association would be warranted.

Leuzzi G, Cesario A, Cafarotti S, Lococo F, Dall'armi V, Novellis P, Romano R, Siciliani A, Meacci E, Granone P, Margaritora S.

#### **Surgical treatment in patient with non-small-cell lung cancer with fissure involvement: anatomical versus nonanatomical resection.**

J Thorac Oncol. 2013 Nov 19. [Epub ahead of print]

Despite the intense debate concerning the prognostic impact of fissure involvement (FI)

in patients with non-small-cell lung cancer, no specific surgical strategies have been yet recommended when this condition occurs. In this setting, we report our monocentric 10-years experience to investigate this issue.

From January 2000 to January 2010, the clinical data of 40 non-small-cell lung cancer patients with FI undergoing curative resection were retrospectively reviewed. The sample was stratified according to the type of resection: group A (28 patients): anatomical resection (bilobectomy [21 patients], pneumonectomy [7 patients]); group B (12 patients): nonanatomical resection (lobectomy plus wedge resection [LWR]). The endpoints were (1) impact of different surgical approach on the pulmonary function (measured before surgery and 1 month after discharge); (2) disease-specific survival; and (3) tumor recurrence. The t test,  $\chi^2$ , and log-rank tests, Kaplan-Meier method, and Cox and logistic regression analyses were used for the statistical analysis.

No differences between the two groups were found when comparing the clinical characteristics, histology, pN or pT status, p-stage, residual (R1) disease, tumor grading, or tumor size. Similarly, the baseline preoperative function (tested as forced expiratory volume in 1 second-%-predicted, FEV1%) was likewise comparable ( $92.5\% \pm 21.0\%$  in group A versus  $85.2\% \pm 20.0\%$  in group B;  $p =$  not significant). The decline of FEV1% after surgery was slightly higher in group A ( $-24.9\% \pm 13.5\%$ ) when compared with that in group B ( $-19.5\% \pm 13.3\%$ ), but this difference was not statistically significant ( $p =$  ns). Nevertheless, the 5-year disease-specific survival was 56% for group A and 47% for group B ( $p =$  ns). The recurrence rate did not differ between the patients undergoing a LWR (3 of 12 patients) and those undergoing a bilobectomy or pneumonectomy (9 of 28 patients) ( $p =$  ns). The presence of FI extended for more than 3 cm was found to be the most significant prognostic factor when analyzing survival ( $p = 0.002$ ) and recurrence rate ( $p < 0.001$ ).

Our results suggest that nonanatomical resection (LWR) could be considered as a feasible surgical option (especially in "frail" patients with an extent of FI less than 3 cm) in the light of the similar oncological and functional outcome compared with anatomical resection. Further studies based on larger series are needed to confirm these preliminary data and also to investigate the impact on the postoperative quality of life.

Lococo F, Cesario A, Attili F, Chiappetta M, Leuzzi G, Costamagna G, Granone P, Larghi A.

### **Transoesophageal endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of pleural effusion for the staging of non-small cell lung cancer.**

Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2013 Aug;17(2):237-241.

The efficacy of endoscopic ultrasound (EUS) for evaluating mediastinal adenopathy in lung cancer is nowadays proven. However, its accuracy for detection of malignant pleural effusion per se has not been yet investigated. Herein we report our experience with EUS for detecting pleural effusion during the staging procedure of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients.

Between January 2009 and December 2011, we performed endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) on 92 selected NSCLC patients to evaluate the T and N factors and to acquire bioptic material and when this was detected, to sample the pleural effusion. In 10 patients (8 males and 2 females, mean age  $66.9 \pm 9.2$  years) a pleural effusion was detected and sampled. In 7 out of the 10 cases, the cytological examination of the fluid obtained by EUS-FNA tested positive for malignant cells, thereby upgrading the case to Stage IV, irrespective of T and N statuses. In 3 cases the cytology

on the EUS-FNA material was proven to be negative for malignancy thereby allowing patients to be treated with curative intent without further delay.

EUS-FNA of the pleural fluid is a safe and simple procedure. Our data, albeit stemming from a limited study population, show that it can be efficient in selected NSCLC cases for obtaining useful material and information with significant impact on the staging and, therefore, on the planning of the optimum therapeutic strategy.

Lococo F, Cesario A, Margaritora S, Dall'armi V, Mattei F, Romano R, Porziella V, Granone P.

**Long-term results in patients with pathological complete response after induction radiochemotherapy followed by surgery for locally advanced non-small-cell lung cancer.**

Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Mar;43(3):e71-81.

The outcome of locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients with pathological complete response (pCR)-pT0N0 -after induction chemoradiotherapy (IT) followed by surgery has, to date, only rarely been investigated. The long-term results in this highly selected subset of patients were evaluated and reported here to identify any predictive factors associated with prognosis.

From January 1992 to December 2009, 195 consecutive locally advanced (T1-T4/N0-2/M0) NSCLC patients underwent IT, and after clinical restaging, 137 were operated upon with radical intent. Among these, 37 (19% of the overall and 27% of the surgical cohort) showed a pCR status and were included in this retrospective analysis. Survival rates and prognostic factors were analysed by the Kaplan-Meier, the log-rank and Cox regression analyses.

The mean age and male/female ratio were  $61.9 \pm 9.8$  years and 33/4, respectively. Before starting IT, the clinical staging was IIb in 2 (5%) patients, IIIa in 20 (54%) and IIIb in 15 (41%). Morbidity and 30-day mortality rates were 27 and 3%, respectively. The overall 3- and 5-year long-term survivals (LTSs) and disease-free survival (DFS) were 67 and 64% and 68 and 71%, respectively. Overall, 17 patients (46%) experienced a recurrence, occurring more frequently in a distant site (32%) than locally (19%). The analysis of the 5-year LTS suggests that (i) the initial single N2 station involvement ( $P = 0.010$ ); (ii) the resection to a lesser extent than pneumonectomy ( $P = 0.005$ ) and (iii) the adjuvant therapy ( $P = 0.005$ ) are all positive prognostic factors. In particular, a 5-year hazard ratio of 8.21 (95% confidence interval 2.16-31.16,  $P = 0.002$ ) was estimated by Cox regression analysis for subjects who did not undergo adjuvant therapy vs those who did.

After induction radiochemotherapy followed by surgery in locally advanced NSCLC, a pCR is achieved in a remarkable proportion of cases (27% in our experience). In such patients, a rewarding LTS (64% at 5 years) could be expected, especially when a single N2 station is involved at diagnosis or when an adjuvant treatment is administered. Nevertheless, recurrences after surgery are quite common (46%) and this evidence deserves further investigations and deeper analysis.

Lococo F, Cesario A, Mattei F, Petrone G, Vita LM, Petracca-Ciavarella L, Margaritora S, Granone P.

Elastofibroma dorsi: clinicopathological analysis of 71 cases.

**Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Apr;61(3):215-222.**

Elastofibroma dorsi (ELD) is a rare soft tissue benign tumor of the chest wall. So far,

only a few large series have been reported in the English literature and, to the best of our knowledge, radiological assessment and clinical management remain without consensus. The aim of this study is to provide, on the basis of a single-institutional, homogeneous and large experience, ample evidences to support etiological and "clinical-usefulness-grade" classification hypotheses.

We report observational information on 71 ELD cases and, on the basis of these, we discuss the clinical onset features, radiological and surgical characteristics, as well as pathological and immunohistochemical evidences.

In the period between January 1994 and September 2009, 71 consecutive patients (23 male and 48 female; mean age: 60.2 years; standard deviation [SD]  $\pm$  8.3 years) with ELD diagnosis were surgically treated at our institution. ELD was right sided in 34 patients (47.9%), left in 25 (35.2%), and bilateral in 12 (16.9%). In nine patients, ELD were diagnosed synchronously and three metachronously. Thirty-eight patients (53.5%) had no significant symptoms; 33 (46.5%) reported a clunking sensation or a localized scapular swelling during the shoulder movements. Sixty-six (93%) patients underwent surgical excision with radical intent while in five patients, a biopsy-only procedure was undertaken. Mean hospital stay was 3.0 days (SD  $\pm$  1.2 days) with a morbidity of 10.6% (one case of major postoperative bleeding requested a surgical revision of the hemostasis). At the univariate analysis, the probability of occurrence of morbidity increases with tumor size. All operated patients are alive and well at follow-up with no sign of recurrence and complete resolution of the symptomatology.

ELD is relatively uncommon, benign, and well controlled by radical surgery.

Lococo F, Cesario A, Okami J, Cardillo G, Cavuto S, Tokunaga T, Apolone G, Margari-tora S, Granone P.

### **Role of combined (18)F-FDG-PET/CT for predicting the WHO malignancy grade of thymic epithelial tumors: a multicenter analysis.**

Lung Cancer. 2013 Aug 13. [Epub ahead of print]

To investigate the performance of combined (18)F-FDG-PET/CT as a predictor of the WHO-classification based malignancy grade in thymic epithelial tumors.

From 05/06 to 02/12, the data of 47 patients with thymic epithelial tumors assessed by (18)F-FDG-PET/CT before being surgically treated were collected in 3 centers and retrospectively reviewed for the purposes of this study. The SUVmax and the SUVmax/T index (the ratio tumor-SUVmax to tumor-size) have been matched with specific subgroups of the WHO-classification: low-risk thymomas (types A-AB-B1), high-risk thymomas (types B2-B3) and thymic carcinomas (type C).

There were 22 men and 25 women (age range: 31-84 yrs). Mean tumor size was  $44.7 \pm 19.0$  mm. The WHO-classification was: type-A #2, type-AB #11, type-B1 #9, type-B2 #9, type-B3 #9 and type-C #7. The SUVmax and the SUVmax/T were found to be predictive factors useful to distinguish thymomas from thymic carcinomas (SUVmax: area under ROC-curve: 0.955,  $p = 0.0045$ ; SUVmax/T-size: area under ROC-curve: 0.927,  $p = 0.0022$ ). Moreover, both parameters were found to be correlated with the WHO malignancy grade (low-risk thymomas; high-risk thymomas; thymic carcinoma), Spearman correlation coefficients being 0.56 ( $p < 0.0001$ ) and 0.76 ( $p < 0.0001$ ), respectively for the SUVmax and for the SUVmax/T index. In addition, the SUVmax is also significantly correlated with Masaoka stage (Spearman correlation coefficient: 0.30,  $p = 0.0436$ )

**CONCLUSIONS:** A significant relationship was observed between (18)F-FDG-PET/CT findings and histologic WHO-classification for this cohort of thymic epithelial tumors.

Thus, on the basis of these evidences, we infer that (18)F-FDG-PET/CT may be useful to predict histology and the WHO classes of risk.

Lugo A, La Vecchia C, Boccia S, Murisic B, Gallus S.

**Patterns of smoking prevalence among the elderly in Europe.**

Int J Environ Res Public Health. 2013 Sep 17;10(9):4418-4431.

Scant information is available on determinants of smoking prevalence in the vulnerable population of the elderly, particularly in Europe. Therefore, we analyzed smoking patterns among older adults ( $\geq 65$  years old), using data from a representative survey based on 3,071 elderly, conducted in 17 European countries in 2010, within the Pricing Policies And Control of Tobacco in Europe (PPACTE) project. Overall smoking prevalence in 17 European countries was 11.5% (15.3% in men and 8.6% in women). An inverse relation with level of education was observed among men, while no specific pattern was evident among women. Smoking prevalence was highest in eastern/central Europe for men (20.3%) and northern Europe for women (13.1%). In both sexes combined, smokers were more frequent in countries with low implementation of tobacco control activities (14.9%). Anti-tobacco campaigns and smoking cessation interventions specifically targeted to the elderly are urgently needed in Europe.

Margaritora S, Cesario A, Cusumano G, Dall'Armi V, Porziella V, Meacci E, Lococo F, D'Angelillo R, Congedo MT, Granone P.

**Pneumonectomy with and without induction chemo-radiotherapy for non-small cell lung cancer: short and long-term results from a single centre.**

Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Jan;17(1):29-40.

Pneumonectomy for non small cell lung cancer (NSCLC) after induction radio-chemotherapy (IT) has been associated with high peri-operative risk and its safety and efficacy is still debated. The aim of this retrospective study was to compare short and long-term results of pneumonectomy in patients treated with and without IT (radiotherapy plus chemotherapy) for NSCLC.

From 1995 to 2008, 85 consecutive patients underwent pneumonectomy: 49 received pre-operative radiotherapy and chemotherapy (IT group), and 36 patients did not (non-IT group). Peri-operative and long-term outcomes were compared.

Major complications rate was 14.3% for IT group and 16.7% for non-IT group ( $p = n.s.$ ). Mortality rate was 2% in IT group and 5.5% in non-IT group ( $p = n.s.$ ). Post-operative hospital stay was significantly longer in the IT group ( $p < 0.0001$ ) as the need for blood transfusion ( $p = 0.002$ ). Indeed, the mortality rate was similar in the left- and right-sided operations. 5 years survival was 45.3% for IT group and 38.4% for non-IT group ( $p = n.s.$ ) and 5 year disease free survival rates were 42.3% vs. 37.8% for the two groups, respectively ( $p = n.s.$ ). Among the clinical, surgical and pathological features no differences on long term outcomes were found with regards to IT.

Pneumonectomy is a feasible and safe procedure even after pre-operative IT. Our results showed a prolonged hospitalization and the need for blood transfusion in the IT group.

Matera MG, Calzetta L, Cazzola M.

**$\beta$ -Adrenoceptor modulation in chronic obstructive pulmonary disease: present and future perspectives.**



Drugs. 2013 Oct;73(15):1653-1663.

The common coexistence of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cardiovascular disease (CVD) presents several therapeutic constraints that have not been comprehensively investigated. Pharmacologic modulation of  $\beta$ -adrenoceptor ( $\beta$ -AR) function is one of the critical issues in the treatment of these patients because inhaled  $\beta(2)$ -AR agonists may induce adverse events in patients with COPD, mainly in those with coexisting CVD. Moreover, the use of  $\beta$ -AR blockers has traditionally been contraindicated in COPD, mainly because of the potential for acute bronchospasm and increased airway hyperresponsiveness after their administration. However, there now appears to be good evidence that  $\beta$ -AR blockers are not only safe but may have benefits in COPD that extend beyond a reduction in cardiovascular mortality. This article starts with a succinct outline of the evolution in our understanding of  $\beta$ -AR modulation in COPD, touching on treatment of COPD with  $\beta$ -AR agonists and the issues of  $\beta$ -AR blockade and cardioselectivity in patients with comorbid CVD. We then summarize the current evidence for a COPD benefit from  $\beta$ -AR blockers and hypothesize on the mode of action. Finally, we provide a view of the future landscape in terms of therapeutic possibilities and what still needs to be resolved, based on our opinion.

Matullo G, Guarrera S, Betti M, Fiorito G, Ferrante D, Voglino F, Cadby G, Di Gaetano C, Rosa F, Russo A, Hirvonen A, Casalone E, Tunesi S, Padoan M, Giordano M, Aspesi A, Casadio C, Ardisson F, Ruffini E, Betta PG, Libener R, Guaschino R, Piccolini E, Neri M, Musk AW, de Klerk NH, Hui J, Beilby J, James AL, Creaney J, Robinson BW, Mukherjee S, Palmer LJ, Mirabelli D, Ugolini D, Bonassi S, Magnani C, Dianzani I.

**Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study.**

PLoS One. 2013 Apr 23;8(4):e61253.

Asbestos exposure is the main risk factor for malignant pleural mesothelioma (MPM), a rare aggressive tumor. Nevertheless, only 5-17% of those exposed to asbestos develop MPM, suggesting the involvement of other environmental and genetic risk factors. To identify the genetic risk factors that may contribute to the development of MPM, we conducted a genome-wide association study (GWAS; 370,000 genotyped SNPs, 5 million imputed SNPs) in Italy, among 407 MPM cases and 389 controls with a complete history of asbestos exposure. A replication study was also undertaken and included 428 MPM cases and 1269 controls from Australia. Although no single marker reached the genome-wide significance threshold, several associations were supported by haplotype-, chromosomal region-, gene- and gene-ontology process-based analyses. Most of these SNPs were located in regions reported to harbor aberrant alterations in mesothelioma (SLC7A14, THRB, CEBP350, ADAMTS2, ETV1, PVT1 and MMP14 genes), causing at most a 2-3-fold increase in MPM risk. The Australian replication study showed significant associations in five of these chromosomal regions (3q26.2, 4q32.1, 7p22.2, 14q11.2, 15q14). Multivariate analysis suggested an independent contribution of 10 genetic variants, with an Area Under the ROC Curve (AUC) of 0.76 when only exposure and covariates were included in the model, and of 0.86 when the genetic component was also included, with a substantial increase of asbestos exposure risk estimation (odds ratio, OR: 45.28, 95% confidence interval, CI: 21.52-95.28). These results showed that genetic risk factors may play an additional role in the development of MPM, and that these should be taken into account to better estimate individual MPM risk in individuals who have been exposed to asbestos.

Nicolotti N, Cattel C, Gualano MR, Soriano A, Manna R, Boccia S.

**A retrospective analysis of 3 156 admissions with fever of unknown origin in a large Italian hospital.**

Epidemiology, Biostatistics and Public Health. 2013;10(4):e8776

Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, Pani L, Pecorelli S, Sancarlo D, Scuteri A, Trifirò G, Vitale C, Zuccaro SM, Bernabei R, Fini M; the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA).

**High prevalence of poor quality drug prescribing in older individuals: a nationwide report from the Italian Medicines Agency (AIFA).**

J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2013 Aug 2. [Epub ahead of print]

Poor quality of drug prescribing in older persons is often associated with increased drug-related adverse events, hospitalization, and mortality. The present study describes a set of prescribing quality indicators developed by the Geriatrics Working Group of the Italian Medicines Agency (AIFA) and estimates their prevalence in the entire elderly ( $\geq 65$  years) population in Italy.

We performed a cross-sectional study using 2011 data from the OsMed (Osservatorio dei Medicinali) database, which comprises all prescribed drugs that are reimbursed by the Italian National Healthcare System. Yearly prevalence of drug prescribing quality indicators in the Italian older population ( $n = 12,301,537$ ) was determined.

Overall, 13 quality indicators addressing polypharmacy, adherence to treatment of chronic diseases, prescribing cascade, undertreatment, drug-drug interactions, and drugs to be avoided were identified. Polypharmacy was common, with more than 1.3 million individuals taking greater than or equal to 10 drugs (11.3% of the study population). The prevalence of low adherence and undertreatment was also elevated and increased with advancing age, with highest prevalence occurring in individuals aged 85 years and older. Prevalence was less than 3% for quality indicators assessing the prescribing cascade, drug-drug interactions, and drugs to be avoided. These results confirm the high frequency of suboptimal drug prescribing in older adults, using a database that covers the whole Italian population. In general, this descriptive study may help in prioritizing strategies aimed at improving the quality of prescribing in elderly population.

Posteraro B, Persiani R, Dall'Armi V, Biondi A, Arzani D, Sicoli F, Bonassi S, D'Ugo D, Ricciardi W, Boccia S.

**Prognostic factors and outcomes in Italian patients undergoing curative gastric cancer surgery.**

European Journal of Surgical Oncology (EJSO)(0) [Epub ahead of print]

Survival of patients after curative surgical resection for gastric cancer (GC) remains poor, thus emphasizing the need for better definition of prognostic factors to improve the long-term course of disease.

From 1999 to 2009, 110 patients had curative-intent gastrectomy for adenocarcinoma. Clinicopathological features, *Helicobacter pylori* infection, dietary habits and lifestyle, and the presence of proinflammatory gene polymorphisms were evaluated.

At the end of follow-up, 55 deaths had occurred, 48 of them due to GC, whereas the median overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were 62 and 51 months, respectively. From the Kaplan-Meier analysis and log-rank test, statistically significant

differences in OS and DFS were found for tumor site (only for DFS), tumor size, lymph node metastasis ratio (NR), and tumor-node-metastasis stage, but not for age, comorbidity, H. pylori infection, cigarette smoking, and IL1B or TNFA polymorphisms. Multi-variable Cox regression analysis revealed NR was an independent prognostic factor for OS and DFS. Cardia tumor and patient age 65 years or older were also independent prognostic factors for OS and DFS.

Tumor-related factors remain strongest predictors of survival in GC patients after surgery. Particularly, NR was an effective feature in identifying patients at high risk for adverse outcome.

Panic N, Leoncini E, de Belvis G, Ricciardi W, Boccia S.

**Evaluation of the endorsement of the preferred reporting items for systematic reviews and meta-analysis (PRISMA) statement on the quality of published systematic review and meta-analyses.**

PLoS One. 2013 Dec 26;8(12):e83138.

PRISMA statement was published in 2009 in order to set standards in the reporting of systematic reviews and meta-analyses. Our aim was to evaluate the impact of PRISMA endorsement on the quality of reporting and methodological quality of systematic reviews and meta-analyses, published in journals in the field of gastroenterology and hepatology (GH).

Quality of reporting and methodological quality were evaluated by assessing the adherence of papers to PRISMA checklist and AMSTAR quality scale. After identifying the GH journals which endorsed PRISMA in instructions for authors (IA), we appraised: 15 papers published in 2012 explicitly mentioning PRISMA in the full text (Group A); 15 papers from the same journals published in 2012 not explicitly mentioning PRISMA in the full text (Group B); 30 papers published the year preceding PRISMA endorsement from the same journals as above (Group C); 30 papers published in 2012 on the 10 highest impact factor journals in GH which not endorsed PRISMA (Group D).

PRISMA statement was referred in the IA in 9 out of 70 GH journals (12.9%). We found significant increase in overall adherence to PRISMA checklist (Group A, 90.1%; Group C, 83.1%;  $p = 0.003$ ) and compliance to AMSTAR scale (Group A, 85.0%; Group C, 74.6%;  $p = 0.002$ ), following the PRISMA endorsement from the nine GH journals. Explicit referencing of PRISMA in manuscript was not associated with increase in quality of reporting and methodological quality (Group A vs. B,  $p = 0.651$ ,  $p = 0.900$ , respectively). Adherence to PRISMA checklist, and the compliance with AMSTAR were significantly higher in journals endorsing PRISMA compared to those not (Groups A+B vs. D;  $p = 0.003$  and  $p = 0.016$ , respectively).

The endorsement of PRISMA resulted in increase of both quality of reporting and methodological quality. It is advised that an increasing number of medical journals include PRISMA in the instructions for authors.

Pasqua F, Geraneo K, Nardi I, Lococo F, Cesario A.

**Pulmonary rehabilitation in lung cancer.**

Monaldi Arch Chest Dis. 2013 Jun;79(2):73-80.

Non-small-cell lung cancer (NSCLC) represents a very severe disease, being its incidence increasingly reported and, nowadays, successfully treatable only when surgery is deemed to be feasible. Furthermore, the disease and the clinical effects related to the

complementary therapies (radio and/or chemotherapy) may strongly affect, frequently with dramatic clinical side effects, the patient's ability to endure physical exercise. In such context, the PR(PR), which has already been proved to be useful and effective in other diseases such as COPD, could play a pivotal role. The aim of this review article is, therefore, to analyze the pertinent data recently reported in English literature in order to highlight the role of rehabilitation as complementary therapy in the management of patients with NSCLC. The evidence currently available suggests that, when surgery is indicated, PR is a safe and feasible option, both during pre-operative and post-operative timing. The safety and feasibility of rehabilitation are proven even in inoperable patients, although to date, little evidence has been reported on its role in the overall management of such complex diseases.

Posteraro B, Persiani R, Dall'Armi V, Biondi A, Arzani D, Sicoli F, Bonassi S, D'Ugo D, Ricciardi W, Boccia S.

**Prognostic factors and outcomes in italian patients undergoing curative gastric cancer surgery.**

Eur J Surg Oncol. Epub 2013 Nov 12.

Survival of patients after curative surgical resection for gastric cancer (GC) remains poor, thus emphasizing the need for better definition of prognostic factors to improve the long-term course of disease.

From 1999 to 2009, 110 patients had curative-intent gastrectomy for adenocarcinoma. Clinicopathological features, Helicobacter pylori infection, dietary habits and lifestyle, and the presence of proinflammatory gene polymorphisms were evaluated.

At the end of follow-up, 55 deaths had occurred, 48 of them due to GC, whereas the median overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were 62 and 51 months, respectively. From the Kaplan-Meier analysis and log-rank test, statistically significant differences in OS and DFS were found for tumor site (only for DFS), tumor size, lymph node metastasis ratio (NR), and tumor-node-metastasis stage, but not for age, comorbidity, H. pylori infection, cigarette smoking, and IL1B or TNFA polymorphisms. Multi-variable Cox regression analysis revealed NR was an independent prognostic factor for OS and DFS. Cardia tumor and patient age 65 years or older were also independent prognostic factors for OS and DFS.

Tumor-related factors remain strongest predictors of survival in GC patients after surgery. Particularly, NR was an effective feature in identifying patients at high risk for adverse outcome.

Ramella S, Alberti AM, Cammilluzzi E, Fiore M, Ippolito E, Greco C, De Quarto AL, Ramponi S, Apolone G, Trodella L, Cesario A, D'Angelillo RM.

**Erlotinib and concurrent chemoradiation in pretreated NSCLC patients: radiobiological basis and clinical results.**

Biomed Res Int. 2013;2013:403869. Epub 2013 Aug 4.

To establish feasibility of the combination of Erlotinib and concurrent chemoradiation in pre-treated patients with locally advanced or metastatic NSCLC.

Data regarding 60 consecutive patients with NSCLC previously treated with chemotherapy alone were prospectively collected. All patients started Erlotinib concurrently with chemotherapy and radiation delivered to primary tumor. These data were retrospectively analyzed (observational study). Feasibility and toxicity were the primary endpoints,

with response rate and progression being the secondary ones, while survival data are reported just as exploratory analysis. The EGFR mutational status was recorded in 32% of cases and it was always wild type.

Compliance to the combination protocol was good. Grade 3-4 esophagitis and acute lung toxicity occurred in 2% and 8% of patients, respectively. No progressive disease was recorded in the majority of cases (65%). Median OS and PFS were 23.3 and 4.7 months, respectively. Patients not responding to chemotherapy administered prior to chemoradiation achieved an objective response rate of 53.3% and complete response in 13.3% of cases.

The addition of Erlotinib to chemoradiation in inoperable NSCLCs is feasible with interesting efficacy profile. These preliminary results warrant further investigation in patients with locally advanced nonmetastatic NSCLC with EGFR mutations.

Ranzi A, Fustinoni S, Erspamer L, Campo L, Gatti MG, Bechtold P, Bonassi S, Trenti T, Goldoni CA, Bertazzi PA, Lauriola P.

**Biomonitoring of the general population living near a modern solid waste incinerator: a pilot study in Modena, Italy.**

Environ Int. 2013 Oct 5;61C:88-97.

As part of the authorization process for the solid waste incinerator (SWI) in Modena, Italy, a human biomonitoring cross-sectional pilot study was conducted to investigate the degree to which people living and working in the proximity of the plant were exposed to SWI emissions.

Between May and June 2010, 65 subjects living and working within 4km of the incinerator (exposed) and 103 subjects living and working outside this area (unexposed) were enrolled in the study. Blood, serum and urinary metals (Pb, Cd, Cu, Zn, Hg, Mn, Ni), urinary benzene, toluene, xylene (BTEX), S-phenylmercapturic acid (SPMA), and urinary polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were analysed. Information about lifestyle, anthropometric characteristics, residence, and health status was collected by a self-administered questionnaire. Exposure to particulate matter (PM) emitted from the SWI was estimated using fall-out maps from a quasi-Gaussian dispersion model. A multiple linear regression analysis investigated the relationship between biomarkers and the distance of a subject's place of residence from the SWI plant or the exposure to PM.

Urinary BTEX and SPMA and blood, serum and urinary metals showed no differences between exposed and unexposed subjects. PAHs were higher in exposed than in unexposed subjects for phenanthrene, anthracene, and pyrene (median levels: 9.5 vs. 7.2ng/L, 0.8 vs. <0.5ng/L and 1.6 vs. 1.3ng/L, respectively,  $p < 0.05$ ). Multiple linear regression analysis showed that blood Cd and Hg and urinary Mn, fluorene, phenanthrene, anthracene and pyrene were inversely correlated to the distance of a subject's residence from the SWI. Urinary Mn, fluorene and phenanthrene were directly correlated to PM exposure.

This study, although not representative of the general population, suggests that specific biomarkers may provide information about the degree of exposure the subjects working and living in the proximity of the SWI plant may have to emissions from that facility.

Rogliani P, Calzetta L, Rendina EA, Massullo D, Dauri M, Rinaldi B, Capuano A, Matera MG.

**The influence of propofol, remifentanil and lidocaine on the tone of human bronchial smooth muscle.**

Pulm Pharmacol Ther. 2013 Jun;26(3):325-331.

Bronchoscopy is generally a safe procedure, but the induction of anaesthesia can induce bronchospasm. Consequently we investigated the influence of propofol, remifentanyl and lidocaine on the tone of the human bronchial smooth muscle.

The influence of propofol, remifentanyl and lidocaine on the contractile response of human bronchial smooth muscle to electrical field stimulation (EFS) has been evaluated. The role of capsaicin-sensitive sensory nerves and of inducible nitric oxide synthase has also been assessed. Furthermore, the interaction between these three drugs has been measured by Bliss Independence (BI) theory. Statistical significance ( $P < 0.05$ ) was assessed by Student's t test or ANOVA.

Propofol ( $1.3 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and lidocaine ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) reduced the baseline tone of bronchial rings ( $-14.45 \pm 4.53\%$  and  $-33.40 \pm 1.07\%$ , respectively,  $P < 0.05$ ), whereas remifentanyl had not such effect. Aminoguanidine prevented the relaxant effect of propofol. Propofol did not alter the bronchial contractile response to EFS following 30 min of treatment, whereas remifentanyl enhanced the bronchial tension ( $133.83 \pm 9.38\%$ , control  $101.93 \pm 6.82\%$ ,  $P < 0.05$ ) and lidocaine completely abolished the contractility at  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  ( $P < 0.05$ ). The desensitization of capsaicin-sensitive sensory nerves normalized the hyperresponsiveness induced by remifentanyl ( $-26.77 \pm 1.68\%$ ,  $P < 0.05$ ). Significant BI antagonism ( $P < 0.001$ ) was detected for propofol and lidocaine on the bronchial hyperresponsiveness induced by remifentanyl.

Propofol and remifentanyl may be used safely for bronchoscopy, although remifentanyl should be associated with propofol or lidocaine to prevent the potential opioid-mediated bronchospasm.

Russo P, Frustaci A, Fini M, Cesario A.

### **Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease.**

Curr Med Chem. 2013 Apr 1;20(13):1686-1693.

The etiopathology of Alzheimer's disease (AD) is extremely complex and heterogeneous, often associated with comorbidities. As a result it may be unlikely that AD may be mitigated by drug acting on a single specific target. The current tendency in drug design and discovery in AD is the rational design or "serendipitous" discovery of new drug entities challenging multiple targets. Since two of the presently approved drugs for AD are based on natural products (galantamine and the physostigmine-derivative rivastigmine), many plants are now under investigation as a potential source of new drugs. Multifunctional drugs often have their origin in natural sources. This review is limited to plant chemicals having different targets with actual (galantamine) or promising (drugs from *Crocus sativus*, *Ginkgo biloba*, *Salvia* species, and *Huperzia serrata*) clinical evidence in people with dementia or AD.

Sances G, Galli F, Ghiotto N, Allena M, Guaschino E, Frustaci A, Nappi G, Tassorelli C.

### **Factors associated with a negative outcome of medication-overuse headache: A 3-year follow-up (the 'CARE' protocol).**

Cephalalgia 2013 May; 33(7):431-443.

To evaluate factors associated with a negative outcome in a 3-year follow-up of subjects diagnosed with medication-overuse headache (MOH) (revised-ICHD-II criteria).

All consecutive patients entering the center's inpatient detoxification program were analyzed in a prospective, non-randomized fashion. All participants were assessed by

a neurologist using an ad hoc patient record form. Personality was assessed using the Minnesota Multiphasic Personality Inventory (MMPI)-2, Chi-square test, one-way analysis of variance (ANOVA), and odds ratios (OR) were calculated as appropriate.

One-hundred and fifty patients completed the follow-up (79.3% females, age  $46.40 \pm 11.31$  years): 13 never stopped their drug overuse (A), 38 stopped their overuse, but relapsed at least once (B), and 99 stopped and never relapsed (C). The Group A patients differed from those in B + C as they were more frequently single (OR 0.134;  $P = 0.007$ ) and unemployed (OR 3.273;  $P = 0.04$ ), took a higher number of drug doses ( $P < 0.001$ ), and less frequently drank coffee (OR 3.273;  $P = 0.044$ ). Personality profile: subjects in A scored higher than those in C on the following scales: Hypochondriasis ( $P = 0.007$ ), Depression ( $P = 0.003$ ), Paranoia ( $P = 0.025$ ), Fears ( $P = 0.003$ ), Obsessiveness ( $P = 0.026$ ), Bizarre Mentation ( $P = 0.046$ ), Social Discomfort ( $P = 0.004$ ), Negative Treatment Indicators ( $P = 0.040$ ), Repression ( $P = 0.007$ ), Overcontrolled Hostility ( $P = 0.040$ ), Addiction Admission ( $P = 0.021$ ), Social Responsibility ( $P = 0.039$ ), and Marital Distress ( $P = 0.028$ ).

Disease outcome in MOH patients is influenced negatively by overuse severity and by specific psychological and socio-economic variables. Other possible modifier factors were voluptuary habits.

Segreti A, Fiori E, Calzetta L, Sabatini M, Segreti V, Rogliani P, Cazzola M.

#### **The effect of indacaterol during an acute exacerbation of COPD.**

Pulm Pharmacol Ther. 2013 Apr 8. [Epub ahead of print]

Some clinical trials have suggested that the inhaled long-acting  $\beta_2$ -agonists (LABAs) may be effective in the treatment of acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD). Since indacaterol, the first once-daily LABA to be developed for the regular treatment of COPD, exhibits fast onset of action and 24-h duration of bronchodilation, we have investigated its effects in patients with AECOPD managed in the emergency department. In a randomised controlled pilot trial, we have enrolled 29 consecutive patients with a recent (i.e., within  $\leq 4$  d) history of AECOPD and requiring hospitalization. All patients received a standard protocol consisting of ipratropium bromide aerosol 500  $\mu\text{g}$  three times a day, intravenous methylprednisolone 20 mg twice-daily and, if indicated, oral levofloxacin 500 mg once-daily. Moreover, they were randomly allocated to one of the two 5-day treatment groups (indacaterol maleate 300  $\mu\text{g}$  once-daily or salbutamol nebulizer 1250  $\mu\text{g}$  three times a day). The administration of indacaterol 300  $\mu\text{g}$  to patients admitted to emergency department for an AECOPD resulted in a greater improvement of pulmonary function compared with traditional therapy, without cardiovascular side effects. Our results suggest that indacaterol could be a useful option in the treatment of AECOPD. However, further larger double-blinded randomized clinical trials are needed to validate the intriguing results obtained in this setting.

Simone B, De Stefano V, Leoncini E, Zacho J, Martinelli I, Emmerich J, Rossi E, Folsom AR, Almawi WY, Scarabin PY, den Heijer M, Cushman M, Penco S, Vaya A, Angchaisuksiri P, Okumus G, Gemmati D, Cima S, Akar N, Oguzulgen KI, Ducros V, Lichy C, Fernandez-Miranda C, Szczeklik A, Nieto JA, Torres JD, Le Cam-Duchez V, Ivanov P, Cantu-Brito C, Shmeleva VM, Stegnar M, Ogunyemi D, Eid SS, Nicolotti N, De Feo E, Ricciardi W, Boccia S.

#### **Risk of venous thromboembolism associated with single and combined effects of**

**factor V Leiden, prothrombin 20210A and methylenetetrahydrofolate reductase C677T: a meta-analysis involving over 11,000 cases and 21,000 controls.**

Eur J Epidemiol. 2013 Aug;28(8):621-647.

Genetic and environmental factors interact in determining the risk of venous thromboembolism (VTE). The risk associated with the polymorphic variants G1691A of factor V (Factor V Leiden, FVL), G20210A of prothrombin (PT20210A) and C677T of methylenetetrahydrofolate reductase (C677T MTHFR) genes has been investigated in many studies. We performed a pooled analysis of case-control and cohort studies investigating in adults the association between each variant and VTE, published on Pubmed, Embase or Google through January 2010. Authors of eligible papers, were invited to provide all available individual data for the pooling. The Odds Ratio (OR) for first VTE associated with each variant, individually and combined with the others, were calculated with a random effect model, in heterozygotes and homozygotes (dominant model for FVL and PT20210A; recessive for C677T MTHFR). We analysed 31 databases, including 11,239 cases and 21,521 controls. No significant association with VTE was found for homozygous C677T MTHFR (OR: 1.38; 95 % confidence intervals [CI]: 0.98-1.93), whereas the risk was increased in carriers of either heterozygous FVL or PT20210 (OR = 4.22; 95 % CI: 3.35-5.32; and OR = 2.79; 95 % CI: 2.25-3.46, respectively), in double heterozygotes (OR = 3.42; 95 % CI 1.64-7.13), and in homozygous FVL or PT20210A (OR = 11.45; 95 % CI: 6.79-19.29; and OR: 6.74 (CI 95 % 2.19-20.72), respectively). The stratified analyses showed a stronger effect of FVL on individuals  $\leq 45$  years ( $p$  value for interaction = 0.036) and of PT20210A in women using oral contraceptives ( $p$ -value for interaction = 0.045). In this large pooled analysis, inclusive of large studies like MEGA, no effect was found for C677T MTHFR on VTE; FVL and PT20210A were confirmed to be moderate risk factors. Notably, double carriers of the two genetic variants produced an impact on VTE risk significantly increased but weaker than previously thought.

Simone B, Mazzucco W, Gualano MR, Agodi A, Coviello D, Dagna Bricarelli F, Dallapiccola B, Di Maria E, Federici A, Genuardi M, Varesco L, Ricciardi W, Boccia S; for the GENISAP Network.

**The policy of public health genomics in Italy.**

Health Policy. 2013 May;110(2-3):214-219.

Italy has a monitoring system for genetic testing, consisting in a periodic census of clinical and laboratory activities performed in the country. The experience is limited, however, concerning the translation of genomic testing for complex diseases into clinical practice. For the first time the Italian Ministry of Health has introduced a policy strategic plan on genomics and predictive medicine within the 2010-2012 National Prevention Plan. This achievement was supported by the Italian Network for Public Health Genomics (GENISAP) and will likely contribute to the integration of public health genomics into health care in the country. Our experience might be of interest not only in Italy, but in other high-income countries, struggling to keep a healthy economy and healthy citizens.

Sterzi S, Cesario A, Cusumano G, Dall'armi V, Lapenna LM, Cardaci V, Novellis P, Lococo F, Corbo GM, Cafarotti S, Margaritora S, Granone P.

**Post-operative rehabilitation for surgically resected non-small cell lung cancer patients: Serial pulmonary functional analysis.**



J Rehabil Med. 2013 Sep;45(9):911-915.

Post-operative pulmonary rehabilitation in patients who have undergone surgery for lung cancer is a subject of open debate. Clinical practice in this setting is based on the results of observational trials, such as the one described here. Prospective randomized controlled trials have been registered and recruitment is ongoing. From 2005 to 2008, 110 patients with surgical non-small cell lung cancer were entered into a post-operative inpatient pulmonary rehabilitation programme for 3 weeks. All patients were evaluated for pulmonary function after surgery (time 0; T0) and at the end of pulmonary rehabilitation programme (time 1; T1). Statistical analysis focused on improvement in pulmonary function parameters and physical performance in the 6-min walking test (6MWT). Mixed models multiple linear regression was used to identify parameters related to the primary end-points of this research. Patients' mean age was 70.1 years (standard deviation (SD) 8.5 years); male/female ratio 73/37. A total of 94 patients underwent lobectomy, 8 underwent pneumonectomy, and the remaining 8 underwent bilobectomy. Among the analysed parameters a significant improvement could be detected only with regards to the 6MWT (257.4 (SD 112.2) at T0 and 382.8 (SD 11.09) at T1). Post-operative pulmonary rehabilitation in patients with surgical non-small cell lung cancer is effective in terms of exercise tolerance.

Tucker JD, Vadapalli M, Joiner MC, Ceppi M, Fenech M, Bonassi S.

**Estimating the lowest detectable dose of ionizing radiation by the cytokinesis-block micronucleus assay.**

Radiat Res. 2013 Sep;180(3):284-291.

The frequency of binucleated cells containing one or more micronuclei (MNBN cells) in cytokinesis-blocked peripheral blood lymphocytes can be used to determine whether a person has received an overexposure to ionizing radiation. However, the absence of a pre-exposure sample can preclude precise dosimetry. Here we use a database of MNBN cell frequencies in peripheral blood lymphocytes from 3,104 apparently healthy, unexposed, control subjects aged birth to 88 years, contributed by laboratories participating in the HUMN project. To determine whether a putatively exposed person has actually received a measurable dose, that person's peripheral blood lymphocyte MNBN frequency is compared to values from age and gender-matched controls in the database. If the subject's frequency is significantly higher than the controls, then a cobalt-60 dose-response curve obtained with the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in human peripheral blood lymphocytes is used to estimate the minimum dose of low-LET radiation that could have caused the increase. The response curve was generated with 11 acutely administered doses ranging from 0-4 Gy; the majority of doses were in the low end of this range to provide an accurate estimate of the linear portion of the response. The minimum detectable acute whole-body dose at the 95% prediction level and their corresponding 95% confidence intervals are 0.18 Gy (0.15-0.22) and 0.20 (0.17-0.24) Gy for 20-year-old males and females, respectively. Corresponding values for 50 year olds are 0.23 Gy (0.19-0.26) and 0.25 (0.21-0.29) Gy, and for 70 year olds are 0.24 (0.21-0.28) Gy and 0.26 (0.22-0.31) Gy. The minimum detectable chronic doses are approximately fivefold higher for both genders. These types of analyses, including knowledge of assay variability, will improve our understanding of the requirements and limitations for biodosimetry when a pre-exposure micronucleus value is unavailable and reliance on historical baseline micronucleus values is required.

Valdiglesias V, Giunta S, Fenech M, Neri M, Bonassi S.

**H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies.**

Mutat Res. 2013 Jul-Sep;753(1):24-40.

DNA double strand breaks (DSB) are the gravest form of DNA damage in eukaryotic cells. Failure to detect DSB and activate appropriate DNA damage responses can cause genomic instability, leading to tumorigenesis and possibly accelerated aging. Phosphorylated histone H2AX (H2AX) is used as a biomarker of cellular response to DSB and its potential for monitoring DNA damage and repair in human populations has been explored in this review. A systematic search was conducted in PubMed for articles, in English, on human studies reporting H2AX as a biomarker of either DNA repair or DNA damage. A total of 68 publications were identified. Thirty-four studies (50.0%) evaluated the effect of medical procedures or treatments on H2AX levels; 20 (29.4%) monitored H2AX in specific pathological conditions with a case/control or case/case design; 5 studies (7.4%) evaluated the effect of environmental genotoxic exposures, and 9 (13.2%) were descriptive studies on cancer and aging. Peripheral blood lymphocytes (44.6%) or biopsies/tissue specimens (24.3%) were the most commonly used samples.

H2AX was scored by optical microscopy as immunostained foci (78%), or by flow cytometry (16%). Critical features affecting the reliability of the assay, including protocols heterogeneity, specimen, cell cycle, kinetics, study design, and statistical analysis, are hereby discussed. Because of its sensitivity, efficiency and mechanistic relevance, the H2AX assay has great potential as a DNA damage biomarker; however, the technical and epidemiological heterogeneity highlighted in this review infer a necessity for experimental standardization of the assay.

Volterrani M, Iellamo F, Rosano G, Guarini P, Pusineri E, Bonassi S, Chimini C, Zaccà F, Proto C; on behalf of the SICOA (Società Italiana Cardiologia Ospedalità Accreditata) **Investigators. Anticoagulation in "real world" patients with atrial fibrillation in Italy: Results from the ISPAF (Indagine Sicoa Paziente Con Fibrillazione Atriale) survey study.**

Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4729-4733

Atrial fibrillation (AF) is associated with a high risk of stroke and other thrombo-embolic events and their prevention relies on antithrombotic therapy, at present mainly with vitamin K antagonists (VKA). The aim of this study was to provide an overall picture on the extent to which current recommendations on oral anticoagulation (OAC) therapy with VKA in AF correspond to actually prescribed OAC in an unselected, real world, population of consecutive patients with AF in Italy. Secondary objective was to assess the rate of "optimal" anticoagulation. Sixty-three cardiology units located in different geographic areas of Italy enrolled a total of 2046 outpatients with nonvalvular AF (54% males and 46% females, age  $73.3 \pm 10.2$  years). OAC with VKAs was prescribed in 1394 (68%) of patients and was progressively more frequent on going from paroxysmal (46%) to persistent (71%) and permanent AF (78%) ( $P < 0.001$ ). A high prescription rate (88%) occurred in patients with  $CHA_2DS_2-VASc > 2$ . In patients with  $CHA_2DS_2-VASc = 0$  and  $HAS-BLED < 3$ , still 59% were on OAC, whereas in 33% of patients with  $CHA_2DS_2-VASc \geq 2$  and  $HAS-BLED < 3$ , OAC therapy was not prescribed. In patients with  $CHA_2DS_2-VASc \geq 2$  and  $HAS-BLED > 3$ , the preference was towards OAC prescription. 66% of patients were at target for INR. The ISPAF study shows that in an Italian population of real world

patients with AF adherence to current guidelines on OAC therapy based on stroke-risk scoring system is rather high, although rate of prescription should be increased. However, contrary to recommendations, in a high proportion of low-risk patients OAC therapy is still prescribed, and this might expose patients to unjustified risks.

Wise RA, Anzueto A, Cotton D, Dahl R, Devins T, Disse B, Dusser D, Joseph E, Attenbeck S, Koenen-Bergmann M, Pledger G, Calverley P; TIOSPIR Investigators.

**Tiotropium respimat inhaler and the risk of death in COPD.**

N Engl J Med. 2013 Oct 7;369(16):1491-1501.

Tiotropium delivered at a dose of 5 µg with the Respimat inhaler showed efficacy similar to that of 18 µg of tiotropium delivered with the HandiHaler inhalation device in placebo-controlled trials involving patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Although tiotropium HandiHaler was associated with reduced mortality, as compared with placebo, more deaths were reported with tiotropium Respimat than with placebo.

In this randomized, double-blind, parallel-group trial involving 17,135 patients with COPD, we evaluated the safety and efficacy of tiotropium Respimat at a once-daily dose of 2.5 µg or 5 µg, as compared with tiotropium HandiHaler at a once-daily dose of 18 µg. Primary end points were the risk of death (noninferiority study, Respimat at a dose of 5 µg or 2.5 µg vs. HandiHaler) and the risk of the first COPD exacerbation (superiority study, Respimat at a dose of 5 µg vs. HandiHaler). We also assessed cardiovascular safety, including safety in patients with stable cardiac disease.

During a mean follow-up of 2.3 years, Respimat was noninferior to HandiHaler with respect to the risk of death (Respimat at a dose of 5 µg vs. HandiHaler: hazard ratio, 0.96; 95% confidence interval [CI], 0.84 to 1.09; Respimat at a dose of 2.5 µg vs. HandiHaler: hazard ratio, 1.00; 95% CI, 0.87 to 1.14) and not superior to HandiHaler with respect to the risk of the first exacerbation (Respimat at a dose of 5 µg vs. HandiHaler: hazard ratio, 0.98; 95% CI, 0.93 to 1.03). Causes of death and incidences of major cardiovascular adverse events were similar in the three groups.

Tiotropium Respimat at a dose of 5 µg or 2.5 µg had a safety profile and exacerbation efficacy similar to those of tiotropium HandiHaler at a dose of 18 µg in patients with COPD.

Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Amy Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, Talamini R, Szeszenia-Dabrowska N, Sturgis EM, Smith E, Shangina O, Schwartz SM, Schantz S, Rudnai P, Purdue MP, Eluf-Neto J, Muscat J, Morgenstern H, Michaluart P Jr, Menezes A, Matos E, Mates IN, Lissowska J, Levi F, Lazarus P, La Vecchia C, Koifman S, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernandez L, Fabianova E, Daudt AW, Dal Maso L, Curado MP, Chen C, Castellsague X, de Carvalho MB, Cadoni G, Boccia S, Brennan P, Boffetta P, Olshan AF.

**Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the international Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.**

Am J Epidemiol. 2013 Sep 1;178(5):679-690.

Cigar and pipe smoking are considered risk factors for head and neck cancers, but the magnitude of effect estimates for these products has been imprecisely estimated. By using pooled data from the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium (comprising 13,935 cases and 18,691 controls in 19 studies from 1981

to 2007), we applied hierarchical logistic regression to more precisely estimate odds ratios and 95% confidence intervals for cigarette, cigar, and pipe smoking separately, compared with reference groups of those who had never smoked each single product. Odds ratios for cigar and pipe smoking were stratified by ever cigarette smoking. We also considered effect estimates of smoking a single product exclusively versus never having smoked any product (reference group). Among never cigarette smokers, the odds ratio for ever cigar smoking was 2.54 (95% confidence interval (CI): 1.93, 3.34), and the odds ratio for ever pipe smoking was 2.08 (95% CI: 1.55, 2.81). These odds ratios increased with increasing frequency and duration of smoking (Ptrend  $\leq$  0.0001). Odds ratios for cigar and pipe smoking were not elevated among ever cigarette smokers. Head and neck cancer risk was elevated for those who reported exclusive cigar smoking (odds ratio = 3.49, 95% CI: 2.58, 4.73) or exclusive pipe smoking (odds ratio = 3.71, 95% CI: 2.59, 5.33). These results suggest that cigar and pipe smoking are independently associated with increased risk of head and neck cancers.

Ancillao A, Galli M, Vimercati SL, Albertini G.

**An optoelectronic based approach for handwriting capture.**

Comput Methods Programs Biomed. 2013 Aug;111(2):357-365.

Clinical practice for the evaluation of motor and cognitive capabilities often relies upon writing and drawing tests. A non-invasive method to capture handwriting and analyze data is therefore needed. In this work a method to capture motion of a pen through a mo-cap optoelectronic system was developed, which could solve the limits of systems based on graphic tablets. Four IR passive markers were placed on a pen cap. Once a pen was equipped with the cap, track of tip was computed through a numeric algorithm using the 3D coordinates of markers provided by the optoelectronic system. Some tests were performed to estimate the error in track reconstruction and to compare the new protocol with previous reconstruction methods. The results showed a higher accuracy of the new method. The new protocol also overcomes the problems related to pen grasping and marker covering that affected other methods described in the literature and permits the evaluation of writing and drawing kinematics as well as postural behaviour related to them.

Artilheiro MC, Corrêa JC, Cimolin V, Lima MO, Galli M, de Godoy W, Lucareli PR.

**Three-dimensional analysis of performance of an upper limb functional task among adults with dyskinetic cerebral palsy.**

Gait Posture. 2013 Dec 10.

Patients with dyskinetic cerebral palsy (DCP) experience considerable variability in their purposeful movements due to involuntary movements that contribute to functional impairment. Movement analyses can demonstrate how the movements involved in bringing a mug to the mouth are performed by patients with DCP. Sixteen adults with DCP (29.63 $\pm$ 4.42 years) and eleven healthy adults (24.09 $\pm$ 3.73 years) performed six consecutive movements of bringing a mug to the mouth using their dominant arm. The mug was placed at 75% of each subject's maximum reach. Kinematic data were captured by 10 cameras and processed using biomechanical software. Fifteen reflexive markers were placed on predetermined bony landmarks on the head, trunk and upper limbs. DCP adults required more time to perform the going (bringing the mug to the mouth), adjusting (simulating taking a drink) and returning (lowering the mug back to the table)

phases, and their movements were less smooth than the controls, as indicated by the index of curvature, average jerk and number of movement units. The DCP adults took a longer time to complete the task than controls as indicated by the peak velocities, mean velocities and times to peak velocity. With respect to the angular parameters, DCP adults had a smaller range of motion for shoulder and elbow flexion and forearm pronation compared with the controls. The analysis of functional tasks represents an important measure for the evaluation of dyskinetic movements and permits the quantitative characterization of upper limb impairment in adults with DCP.

Camerota F, Galli M, Cimolin V, Celletti C, Ancillao A, Blow D, Albertini G.

**Neuromuscular taping for the upper limb in cerebral palsy: a case study in a patient with hemiplegia.**

Dev Neurorehabil. 2013 Oct 2. [Epub ahead of print]

To assess quantitatively the effects of Neuromuscular Taping (NMT) on the upper limb in a female child with left hemiplegia, due to Cerebral Palsy (CP). Methods: The patient underwent NMT on cervical level, shoulder and hand only of the plegic upper limb, followed by physical therapy. Kinematic data of upper limbs during reaching task were collected before (PRE) and after 2 weeks of treatment (POST). Results: After the intervention, the affected limb improved in terms of movement duration, Average Jerk and Number of Unit Movements indices, indicating a faster, smoother and less segmented movement. Improvements appeared at the ranges of motion of the upper limb joints, both at shoulder and elbow joints. No significant changes were globally displayed for the unaffected arm. Conclusion: NMT seems to be a promising intervention for improving upper limb movement in patients with CP. Further investigations are certainly needed to assess effectively the effects of the intervention in this pathological state.

Carducci F, Onorati P, Condoluci C, Di Gennaro G, Quarato PP, Pierallini A, Sarà M, Miano S, Cornia R, Albertini G.

**Whole-brain voxel-based morphometry study of children and adolescents with Down syndrome.**

Funct Neurol. 2013 Jan-Mar;28(1):19-28.

In order to investigate alterations in brain morphology and a possible temporal pattern of neuroanatomical abnormalities in the gray matter (GM), white matter (WM) and cerebrospinal fluid (CSF) of young patients with Down syndrome (DS), high-resolution magnetic resonance imaging (MRI) voxel-based morphometry (VBM) was performed on 21 children and adolescents with this chromosomal aberration and 27 age-matched participants as controls. In comparison with control subjects, children and adolescents with DS showed not only an overall smaller whole-brain volume, but also volume reductions of the GM in the cerebellum, frontal lobes, frontal region of the limbic lobe, parahippocampal gyri and hippocampi and of the WM in the cerebellum, frontal and parietal lobes, sub-lobar regions and brainstem. By contrast, volume preservation was observed in the GM of the parietal lobes, temporal lobe and sub-lobar regions and in the WM of the temporal lobe and temporal regions of the limbic lobe. A lower volume of CSF was also detected in the frontal lobes. This study is the first to use the high-resolution MRI VBM method to describe a whole-brain pattern of abnormalities in young DS patients falling within such a narrow age range and it provides new information on the neuroanatomically specific regional changes that occur during development in these patients.

Celletti C, Galli M, Cimolin V, Castori M, Tenore N, Albertini G, Camerota F.

**Use of the gait profile score for the evaluation of patients with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type.**

Res Dev Disabil. 2013 Oct 1;34(11):4280-4285.

Gait analysis (GA) is widely used for clinical evaluations in various pathological states, both in children and in adults, such as in patients with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type (JHS/EDS-HT). Otherwise, GA produces a large volume of data and there is the clinical need to provide also a quantitative measure of the patient's overall gait. Starting from this aim some global indexes were proposed by literature as a summary measure of the patient's gait, such as the Gait Profile Score (GPS). While validity of the GPS was demonstrated for the evaluation of the functional limitation of children with Cerebral Palsy, no studies have been conducted in patients JHS/EDS-HT. The aim of our study was therefore to investigate the effectiveness of the GPS in the quantification of functional limitation of patients with JHS/EDS-HT. Twenty-one adult (age:  $36.1 \pm 12.7$  years) individuals with JHS/EDS-HT were evaluated using GA and from GA data the GPS was computed. The results evidenced that the GPS value of patients was  $8.9 \pm 2.6$ , statistically different from  $4.6 \pm 0.9$  displayed by the control group. In particular, all values of Gait Variable Scores (GVS) which compose the GPS were higher if compared to controls, with the exception of Pelvic Tilt and Foot Progression. The correlations between GPS/GVS and Lower Extremity Functional Scale (LEFS) showed significant relationship between GPS and the item 11 ("Walking 2 blocks") ( $r = -0.56$ ;  $p < 0.05$ ) and 12 ("Walking a mile") of LEFS ( $r = -0.76$ ;  $p < 0.05$ ). Our results showed that GPS and GVS seem to be appropriate outcome measures for the evaluation of the functional limitation during gait of patients with JHS/EDS-HT.

Cimolin V, Avellis M, Piccinini L, Corbetta C, Cazzaniga A, Turconi AC, Galli M.

**Comparison of two pelvic positioning belt configurations in a paediatric wheelchair.**

Assistive Technology. 2013 03/05 [Epub ahead of print]

Gait analysis (GA) is widely used for clinical evaluations in various pathological states, both in children and in adults, such as in patients with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type (JHS/EDS-HT). Otherwise, GA produces a large volume of data and there is the clinical need to provide also a quantitative measure of the patient's overall gait. Starting from this aim some global indexes were proposed by literature as a summary measure of the patient's gait, such as the Gait Profile Score (GPS). While validity of the GPS was demonstrated for the evaluation of the functional limitation of children with Cerebral Palsy, no studies have been conducted in patients JHS/EDS-HT. The aim of our study was therefore to investigate the effectiveness of the GPS in the quantification of functional limitation of patients with JHS/EDS-HT. Twenty-one adult (age:  $36.1 \pm 12.7$  years) individuals with JHS/EDS-HT were evaluated using GA and from GA data the GPS was computed. The results evidenced that the GPS value of patients was  $8.9 \pm 2.6$ , statistically different from  $4.6 \pm 0.9$  displayed by the control group. In particular, all values of Gait Variable Scores (GVS) which compose the GPS were higher if compared to controls, with the exception of Pelvic Tilt and Foot Progression. The correlations between GPS/GVS and Lower Extremity Functional Scale (LEFS) showed significant relationship between GPS and the item 11 ("Walking 2 blocks") ( $r = -0.56$ ;  $p < 0.05$ ) and 12 ("Walking a mile") of LEFS ( $r = -0.76$ ;  $p < 0.05$ ). Our results showed

that GPS and GVS seem to be appropriate outcome measures for the evaluation of the functional limitation during gait of patients with JHS/EDS-HT.

Cimolin V, Galli M, Rigoldi C, Grugni G, Vismara L, de Souza SA, Mainardi L, Albertini G, Capodaglio P.

**The fractal dimension approach in posture: a comparison between Down and Prader-Willi syndrome patients.**

Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2013 Jan 29. [Epub ahead of print]

The suitability of new dynamic system analysis was investigated to compare postural control in Prader-Willi syndrome (PWS) and Down syndrome (DS) patients. Time-domain, frequency-domain parameters and fractal dimension (FD) of centre of pressure (CoP) were computed in maintaining normal standing on a force platform in 20 DS and 13 PWS patients, compared to 26 obese (obese control group, OCG) and 20 healthy individuals (healthy control group, HCG). DS and PWS showed greater displacements along both directions and longer sway path (SP) parameter than HCG and OCG, with statistical differences between PWS and DS for anteroposterior displacement and SP. DS used higher frequency strategy when compared to PWS, OCG and HCG. Both DS and PWS were characterised by greater values of FD than OCG and HCG, with higher values in DS. The analyses in frequency domain and of the dynamic nature of CoP suggest that DS patients are characterised by a more complex and irregular signal than PWS patients.

Cimolin V, Galli M, Vismara L, Vimercati SL, Precilios H, Cattani L, Fabris De Souza S, Petroni ML, Capodaglio P.

**Gait analysis in anorexia and bulimia nervosa.**

J Appl Biomater Funct Mater. 2013 Sep 13;11(2):e122-128.

Anorexia (AN) and Bulimia Nervosa (BN) are two common eating disorders, which appear to share some reduced motor capacities, such as a reduced balance. The presence and the extent of other motor disorders have not been investigated in a comprehensive way. The aim of this study was to quantify gait pattern in AN and BN individuals in order to ascertain possible differences from the normality range and provide novel data for developing some evidence-based rehabilitation strategies. Nineteen AN patients (age  $30.16 \pm 9.73$ ) and 20 BN patients (age  $26.8 \pm 8.41$ ) were assessed with quantitative 3D computerized Gait Analysis. Results were compared with a group of healthy controls (CG;  $30.7 \pm 5.6$ ). AN and BN patients were characterized by different gait strategies compared to CG. Spatio-temporal parameters indicated shorter step length, with AN showing the shortest values. AN walked slower than BN and CG. As for kinematics, AN and BN showed a nonphysiologic pattern at pelvis and hip level on the sagittal and frontal plane, with BN yielding the most abnormal values. Both AN and BN patients were characterized by high ankle plantar flexion capacity at toe-off when compared to CG. As for ankle kinetics, both AN and BN showed physiologic patterns. Stiffness at hip level was close to CG in both pathologic groups; at the ankle level, stiffness was significantly decreased in both groups, with AN displaying lower values. Both AN and BN were characterized by an altered gait pattern compared to CG. Biomechanical differences were evident mainly at pelvis and hip level. Loss of lean mass may lead to musculoskeletal adaptation, ultimately causing alterations in the gait pattern.

Galli M, Cimolin V, Albertini G, Piccinini L, Turconi AC, Romkes J, Brunner R.  
**Kinematic analysis of upper limb during walking in diplegic children with cerebral palsy.**

European Journal of Paediatric Neurology 2013 [Epub ahead of print]

Movements of the lower limbs during walking have been widely investigated in literature, while quantification of arm movement during gait is scanty. The aim of the present study was to assess quantitatively the upper limb motion during gait in children with Cerebral Palsy (CP). Sixteen children with diplegic CP were evaluated using a full-body marker set, which allows assessing both the lower and upper limb kinematics. Our results demonstrated that movement of the arms was characterized by an abducted shoulder and a more flexed elbow position at the initial contact of the gait cycle with a quite physiological range of motion if compared to controls. These data showed that gait of children with diplegic CP is generally characterized by abnormal upper limb position which could be considered a strategy to keep balance and posture control during walking.

Galli M, Cimolin V, Pau M, Costici P, Albertini G.

**Relationship between flat foot condition and gait pattern alterations in children with Down syndrome.**

J Intellect Disabil Res. 2013 Jan 4. [Epub ahead of print]

In patients with Down syndrome (DS) one of the most common abnormalities is flat foot which can interfere significantly with normal daily activities, such as gait. The aim of this study was to quantitatively assess the relationship between the flat foot and the gait alterations in DS children. Twenty-nine patients with DS and 15 non-affected subjects were assessed using 3D Gait Analysis, using an optoelectronic system, force platforms and video recording. The degree of flat foot was assessed using the arch index and kinematic and kinetic parameters were identified and calculated from 3D Gait Analysis for each study participant. Data showed that ankle plantarflexion moment and ankle power during terminal stance were significant to differentiate the patients with and without flat feet: their peak values were significantly lower for the patients with flat foot. In addition, the research for correlation demonstrated that the higher the arch index value, the lower the peak of ankle moment and of the generated ankle power during terminal stance and the minimum of absorbed ankle power. Children with flat foot displayed a less functional gait pattern in terms of ankle kinetics than children without flat foot, suggesting that the presence of flat foot may lead to a weaker efficient walking. Then, the increasing flat foot tended to result in lower push-off ability, leading a less functional walking.

Galli M, Cimolin V, Rigoldi C, Pau M, Costici P, Albertini G.

**The effects of low arched feet on foot rotation during gait in children with down syndrome.**

Journal of Intellectual Disability Research. 2013:n/a,n/a. [Epub ahead of print]

In patients with Down syndrome (DS) one of the most common abnormalities is flat foot which can interfere significantly with normal daily activities, such as gait. The aim of this study was to quantitatively assess the relationship between the flat foot and the gait alterations in DS children. Twenty-nine patients with DS and 15 non-affected subjects were assessed using 3D Gait Analysis, using an optoelectronic system, force platforms



and video recording. The degree of flat foot was assessed using the arch index and kinematic and kinetic parameters were identified and calculated from 3D Gait Analysis for each study participant. Data showed that ankle plantarflexion moment and ankle power during terminal stance were significant to differentiate the patients with and without flat feet: their peak values were significantly lower for the patients with flat foot. In addition, the research for correlation demonstrated that the higher the arch index value, the lower the peak of ankle moment and of the generated ankle power during terminal stance and the minimum of absorbed ankle power. Children with flat foot displayed a less functional gait pattern in terms of ankle kinetics than children without flat foot, suggesting that the presence of flat foot may lead to a weaker efficient walking. Then, the increasing flat foot tended to result in lower push-off ability, leading a less functional walking.

Kaczmarek W, Barua M, Mazur-Kolecka B, Frackowiak J, Dowjat W, Mehta P, Bolton D, Hwang Y, Rabe A, Albertini G, Wegiel J.

**Intracellular distribution of differentially phosphorylated dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A).**

J Neurosci Res. 2013 [Epub ahead of print]

The gene encoding dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 1A (DYRK1A) is located within the Down syndrome (DS) critical region of chromosome 21. DYRK1A interacts with a plethora of substrates in the cytosol, cytoskeleton, and nucleus. Its overexpression is a contributing factor to the developmental alterations and age-associated pathology observed in DS. We hypothesized that the intracellular distribution of DYRK1A and cell-compartment-specific functions are associated with DYRK1A posttranslational modifications. Fractionation showed that, in both human and mouse brain, almost 80% of DYRK1A was associated with the cytoskeleton, and the remaining DYRK1A was present in the cytosolic and nuclear fractions. Coimmunoprecipitation revealed that DYRK1A in the brain cytoskeleton fraction forms complexes with filamentous actin, neurofilaments, and tubulin. Two-dimensional gel analysis of the fractions revealed DYRK1A with distinct isoelectric points: 5.5-6.5 in the nucleus, 7.2-8.2 in the cytoskeleton, and 8.7 in the cytosol. Phosphate-affinity gel electrophoresis demonstrated several bands of DYRK1A with different mobility shifts for nuclear, cytoskeletal, and cytosolic DYRK1A, indicating modification by phosphorylation. Mass spectrometry analysis disclosed one phosphorylated site in the cytosolic DYRK1A and multiple phosphorylated residues in the cytoskeletal DYRK1A, including two not previously described. This study supports the hypothesis that intracellular distribution and compartment-specific functions of DYRK1A may depend on its phosphorylation pattern.

Molteni E, Rigoldi C, Morante M, Rozbaczylo C, Haro M, Albertini G, Galli M, Bianchi AM.

**Quantification of long-term effects of botulinum injection in a case of cerebral palsy affecting the upper limb movement.**

Dev Neurorehabil. 2013 Jul 19. [Epub ahead of print]

The aim of this work was to put into evidence the long-lasting modification induced by botulinum toxin injection and rehabilitative treatment on motor control. Methods: In this contribution, we report the case of a female child showing hemiplegia, due to cerebral palsy. She underwent botulinum injection, followed by physical and occupational therapy. We quantified the biomechanical, cerebral and occupational aspects of her im-

paired upper limb, also dynamically, with respect to her pre- and post-treatment condition. Results: Small long-lasting improvements - induced on biomechanics by botulinum injection - triggered wide cerebral modification, well reflected in improved contextual movements and motor strategy. Conclusion: These results provide evidences that small modifications in the end-effector performance often imply cerebral modifications and improvement in finalized motor strategy.

Pau M, Galli M, Celletti C, Morico G, Leban B, Albertini G, Camerota F.

**Plantar pressure patterns in women affected by Ehlers-Danlos syndrome while standing and walking.**

Res Dev Disabil. 2013 Sep 7;34(11):3720-3726.

This study aims to quantitatively characterize plantar pressure distribution in women affected by Ehlers-Danlos syndrome of the hypermobile type (EDS-HT) to verify the existence of peculiar patterns possibly related to postural anomalies or physical and functional lower limb impairments typical of this disease. A sample of 26 women affected by EDS-HT (mean age 36.8, SD 12.0) was tested using a pressure platform in two conditions, namely static standing and walking. Raw data were processed to assess contact area and mean and peak pressure distribution in rearfoot, midfoot and forefoot. Collected data were then compared with those obtained from an equally numbered control group of unaffected women matched for age and anthropometric features. The results show that, in both tested conditions, women with EDS-HT exhibited significantly smaller forefoot contact areas and higher peak and mean pressure than the control group. No differences in the analyzed parameters were found between right and left limb. The findings of the present study suggest that individuals with EDS-HT are characterized by specific plantar pressure patterns that are likely to be caused by the morphologic and functional foot modification associated with the syndrome. The use of electronic pedobarography may provide physicians and rehabilitation therapists with information useful in monitoring the disease's progression and the effectiveness of orthotic treatments.

Pau M, Galli M, Crivellini M, Albertini G.

**Relationship between obesity and plantar pPressure distribution in youths with Down Syndrome.**

Am J Phys Med Rehabil. 2013 Apr 29. [Epub ahead of print]

This study aimed to characterize the effect of obesity on foot-ground contact in young individuals affected by Down syndrome (DS) during quiet upright stance. This is a cross-sectional study on 118 individuals with Down syndrome, 59 with obesity aged 3-18 yrs and 59 with normal weight, age- and sex-matched forming the control group. Both groups were evaluated while standing on a pressure-sensitive mat. Foot-ground contact was characterized using contact area and mean pressure calculated for the rearfoot, the midfoot, and the forefoot. The results show that obesity significantly influences the foot-ground interaction, with some differences related to sex. In particular, the females with obesity exhibited larger contact areas and higher plantar pressures (in the forefoot and the midfoot) with respect to the control group, whereas in the males with obesity, only the plantar pressures were found higher than those of the controls. Flatfoot is the prevalent arch type for both groups, but its incidence seems to be unrelated to obesity. The modifications introduced by obesity in foot-ground contact pressure and area may represent a factor capable of aggravating existing negative podiatric issues associated

with Down syndrome. Thus, planning periodical monitoring of foot-ground contact during childhood and adolescence is recommended to avoid possible problems related to adverse effects of repeated excessive mechanical stresses on the plantar region.

Rigoldi C, Cimolin V, Camerota F, Celletti C, Albertini G, Mainardi L, Galli M.

**Measuring regularity of human postural sway using approximate entropy and sample entropy in patients with Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type.**

Res Dev Disabil. 2013 Feb;34(2):840-846.

Ligament laxity in Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type (EDS-HT) patients can influence the intrinsic information about posture and movement and can have a negative effect on the appropriateness of postural reactions. Several measures have been proposed in literature to describe the planar migration of CoP over the base of support, and the most used in clinical field are the CoP excursions in antero-posterior and medio-lateral direction. In recent years a growing number of studies have been designed to explore the complexity of the COP trajectories during quiet standing. We assessed 13 adults with EDS-HT (EDSG) and 20 healthy adults (CG) during static posture, evaluating the CoP using time and frequency domain analysis and entropy analysis (SampEn and ApEn parameters). Higher values of CoP displacements in medio-lateral and anterior-posterior directions for EDSG than CG were found; no differences were observed in CoP frequency. The entropy analysis showed lower value for EDSG than CG, pointing out the need of EDSG to concentrate more attention on postural control, losing complexity and reflecting a less automatized postural control.

Sale P, De Pandis MF, Stocchi F, Domenica LP, Sova I, Cimolin V, Ancillao A, Albertini G, Galli M, Franceschini M.

**Robot-assisted walking training for individuals with Parkinson's disease: a pilot randomized controlled trial.**

BMC Neurol. 2013 May 24;13(1):50. [Epub ahead of print]

Over the last years, the introduction of robotic technologies into Parkinson's disease rehabilitation settings has progressed from concept to reality. However, the benefit of robotic training remains elusive. This pilot randomized controlled observer trial is aimed at investigating the feasibility, the effectiveness and the efficacy of new end-effector robot training in people with mild Parkinson's disease. Design. Pilot randomized controlled trial. Setting. Robot assisted gait training (EG) compared to treadmill training (CG). Participants. Twenty cognitively intact participants with mild Parkinson's disease and gait disturbance. Interventions. The EG underwent a rehabilitation programme of robot assisted walking for 40 minutes, 5 times a week for 4 weeks. The CG received a treadmill training programme for 40 minutes, 5 times a week for 4 weeks. Main outcome measures. The outcome measure of efficacy was recorded by gait analysis laboratory. The assessments were performed at the beginning (T0) and at the end of the treatment (T1). The main outcome was the change in velocity. The feasibility of the intervention was assessed by recording exercise adherence and acceptability by specific test. Robot training was feasible, acceptable, safe, and the participants completed 100% of the prescribed training sessions. A statistically significant improvement in gait index was found in favour of the EG (T0 versus T1). In particular, the statistical analysis of primary outcome (gait speed) using the Friedman test showed statistically significant improvements for the EG ( $p = 0,0195$ ). The statistical analysis performed by Friedman test of

Step length left ( $p = 0,0195$ ) and right ( $p = 0,0195$ ) and Stride length left ( $p = 0,0078$ ) and right ( $p = 0,0195$ ) showed a significant statistical gain. No statistically significant improvements on the CG were found. Robot training is a feasible and safe form of rehabilitative exercise for cognitively intact people with mild PD. This original approach can contribute to increase a short time lower limb motor recovery in idiopathic PD patients. The focus on the gait recovery is a further characteristic that makes this research relevant to clinical practice. On the whole, the simplicity of treatment, the lack of side effects, and the positive results from patients support the recommendation to extend the use of this treatment. Further investigation regarding the long-time effectiveness of robot training is warranted.

Vimercati SL, Galli M, Rigoldi C, Ancillao A, Albertini G.

**Feedback reliance during an arm-tapping task with obstacle avoidance in adults with Down syndrome.**

Exp Brain Res. 2013 May;226(4):631-638.

Optimal movement control reflects a combination of both feedback and feedforward processes. However, as motor control evolves, feedforward mechanisms become prevailing respect to feedback-based movements, and less reliance on sensory information leads to a decreased number of corrections in the trajectory. In subjects with Down syndrome (DS), the study of the wrist's trajectory during an arm-tapping task revealed feedback-based corrections designed to reduce the degree of discrepancy between the position of the limb and the target, leading to the assumption that performers with DS have problems with movement planning and feedforward control. The present study was aimed at expanding the evidence about motor control in DS by evaluating the influence of a perturbing factor (an obstacle) on motor control strategies during an arm-tapping task and to clarify if the presence of an obstacle elicited a higher reliance on feedback control in controls and in DS. Sixteen right-handed adults with DS and 21 right-handed, age-matched control subjects (N) were evaluated by means of quantitative motion analysis. The results suggest that the presence of an obstacle elicited changes in the motor strategies of both DS and N, with a destabilizing effect that led subjects to rely more on feedback control. DS showed some aspects of movement efficiency that were in accordance with N strategies, but the prevailing factor of optimization in these subjects remained safety. A focused rehabilitation could help DS subjects to develop more efficient motor strategies in the presence of motor uncertainty and perturbations.

## INDIRIZZI UTILI

Via della Pisana, 235

### **Direttore Generale**

Paolo Rolleri

Tel. +39 06 52252408

Email: paolo.rolleri@sanraffaele.it

### **Direttore Sanitario**

Isabella Richichi

Tel. +39 06 52252408

Email: direzione.sanitaria@sanraffaele.it

Via di Val Cannuta, 247

### **Direttore Scientifico**

Massimo Fini

Tel. +39 0652253406 Fax +39 06 52255668

Email: massimo.fini@sanraffaele.it

### **Vice Direttore Scientifico**

Alfredo Cesario

Tel. +39 0652253428 Fax +39 06 52255668

Email: alfredo.cesario@sanraffaele.it

### **Presidente Comitato Tecnico Scientifico**

Giuseppe Rotilio

Tel. +39 0652253404 Fax +39 06 52255668

Email: giuseppe.rotilio@sanraffaele.it

### **Segreteria Scientifica**

Astrid van Rijn

Tel. +39 06 52253405 Fax +39 06 52255668

Email: astrid.vanrijn@sanraffaele.it

### **Segreteria Direttore Scientifico**

Stefania Proietti

Tel. +39 06 52253406 Fax +39 06 52255668

Email: segreteriascientifica@sanraffaele.it

### **Servizi Amministrativi Ricerca**

Guido Poli/Elena Biagini

Tel. +39 06 52253012

Email: guido.poli@sanraffaele.it

elena.biagini@sanraffaele.it

### **Segreteria Comitato Etico**

Fabiola D'Angeli

Tel. +39 06 52253440 Fax +39 0652255567

Email: fabiola.dangeli@sanraffaele.it

### **Biblioteca**

Valia Nikolova

Tel/Fax +39 06 52252466

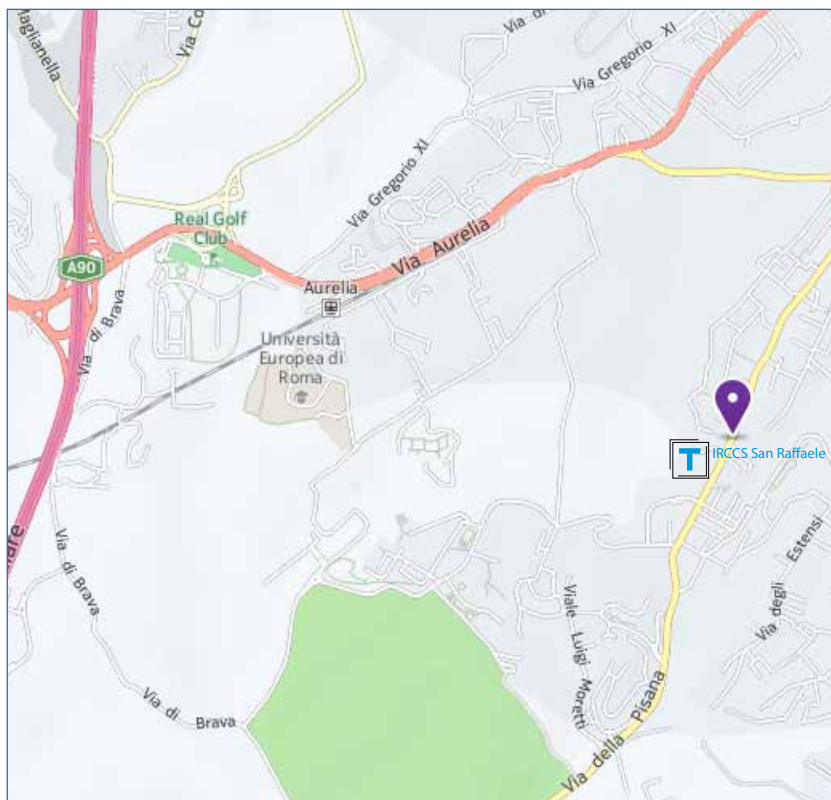
Email: bibliotecapisana@sanraffaele.it

### **Editorial Office**

Daniela Pernice

Tel. +39 06 52253404 Fax +39 06 52255668

Email: daniela.pernice@sanraffaele.it



**in automobile**

dal GRA  
uscita 32 direzione centro

**con i mezzi pubblici, linee  
atac**

**e principali fermate**

**linea 892**

capolinea viale Valle Aurelia, via Baldo degli Ubaldi, via Aurelia Antica, via Bravetta, via della Pisana, capolinea via degli Aldobrandeschi

**linea 881**

capolinea via Paola, via di Porta Cavalleggeri, via Gregorio VII, via Aurelia Antica, via Bravetta, via della Pisana, capolinea via degli Avanzini

**linea 808**

capolinea Largo Capasso, via Bravetta, via della Pisana, via di Ponte Galeria, capolinea via Portuense

**dalla stazione termini**

**linea 64**

fino a via Paola proseguire con il n. 881

**linea 40**

express fino a via Paola proseguire con il n. 881

**metro A**

stazione Baldo degli Ubaldi proseguire con il n. 892

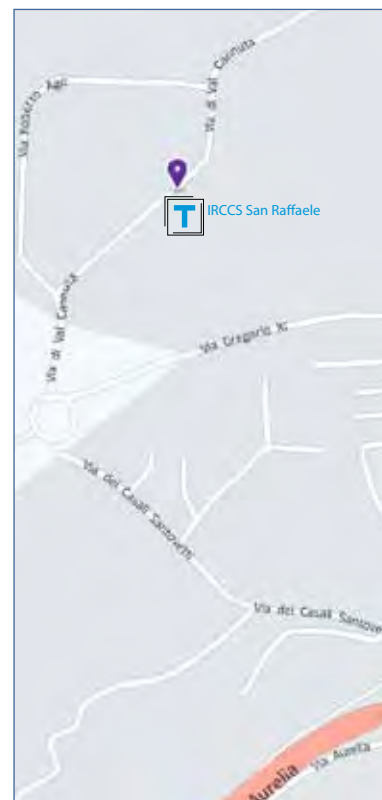
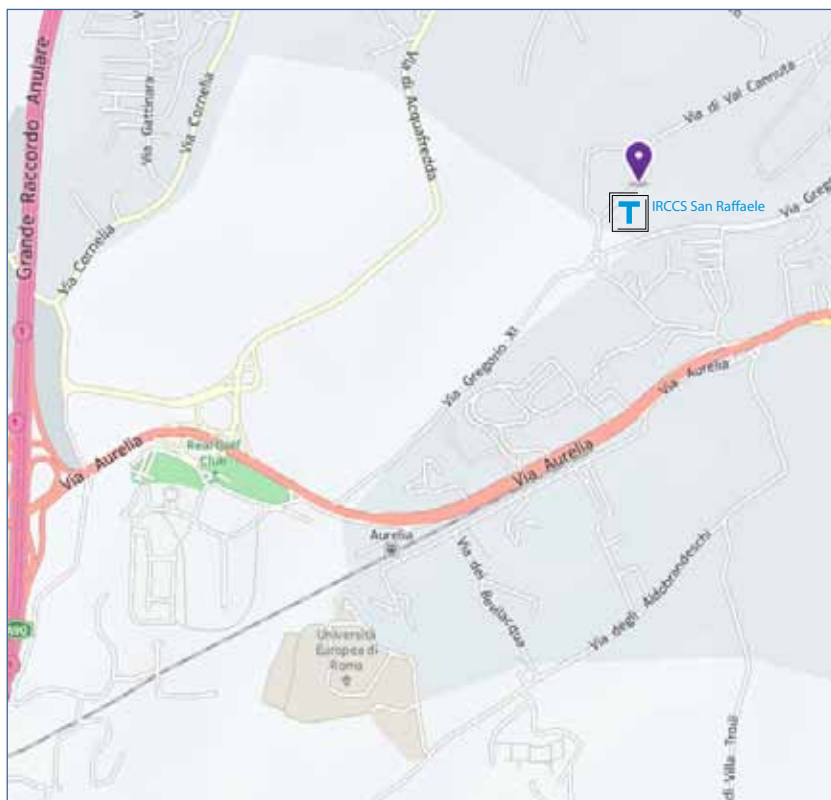
**via della pisana 235**

**00163 roma**

**ph +39 06 52255225**

**ph +39 06 66058-1 ra**

**fax + 39 06 66058300**



**in automobile**  
dal GRA  
uscita 1 direzione Via Aurelia

**con i mezzi pubblici**  
linea Metro A (direz. Battistini)  
per dieci fermate. Scendere alla  
fermata Cornelia. A piedi per  
50 metri, recarsi alla fermata De  
La Salle, prendere la linea 889  
per otto fermate. Scendere alla  
fermata Val Cannuta (capolinea)

**linea Metro A (direz. Battistini)**  
per nove fermate. Scendere  
alla fermata Battistini. A piedi  
per 50 metri, prendere la linea  
546 direzione Val Cannuta/  
Ago. Scendere alla fermata Val  
Cannuta (capolinea)

**via di val cannuta 247**  
**00166 roma**  
**ph +39 06 5225 3406**  
**fax + 39 06 5225 5668**