



SAN RAFFAELE RESEARCH INSTITUTE

IRCCS SAN RAFFAELE PISANA

ANNUAL REPORT 2014



SR

ANNUAL REPORT 2014

*Redazione: Daniela Pernice - Segreteria di Direzione Scientifica - IRCCS San Raffaele Pisana Roma  
Elaborazione grafica e layout: Oderica Lusi - Direzione Comunicazione e Marketing - Gruppo San Raffaele*

[WWW.SANRAFFAELE.IT](http://WWW.SANRAFFAELE.IT)

FOLLOW US



# INDICE

**MESSAGGIO DEL PRESIDENTE** PAG. 9

**REPORT DEL DIRETTORE SCIENTIFICO** PAG. 10

**ATTIVITA' SCIENTIFICA** PAG. 12

Comitato Scientifico pag. 13

Pubblicazioni pag. 15

Aree di ricerca pag. 69

La Rete pag. 109

Linee di Ricerca pag. 115

Ricerca Finalizzata pag. 201

Altre Tipologie di Ricerca pag. 222

Clinical Trial Center pag. 268

Convenzioni pag. 274

Servizi Bibliotecari pag. 278

Scuole Universitarie pag. 280

**NOMINE, INCARICHI E RICONOSCIMENTI** PAG. 286

**ATTIVITA' DI FORMAZIONE** PAG. 290

**ATTIVITA' ASSISTENZIALE** PAG. 292

**INDIRIZZI UTILI** PAG. 420

# MESSAGGIO DEL PRESIDENTE

*Da oltre dieci anni l'IRCCS San Raffaele Pisana è impegnato nella difficile ma entusiasmante battaglia di ricercare nuove vie e soluzioni terapeutiche per una riabilitazione moderna e ricettiva delle novità che una ricerca sempre più raffinata offre a chi, come noi, ha scelto di impegnarsi nel miglioramento continuo come principio fondante della propria attività vissuta come fare ed operare per il bene comune.*

*I risultati conseguiti anche in questo ultimo anno confermano la validità di tale scelta e rappresentano la migliore risposta alla crisi generale ed alle innumerevoli difficoltà che la ricerca si trova quotidianamente ad affrontare.*

*L'annuale report dell'IRCCS San Raffaele, ci presenterà anche quest'anno, l'impegno nella ricerca ed il trend positivo delle pubblicazioni riportate.*

*I dati dimostrano e ci confortano, nel proseguire il percorso che abbiamo intrapreso soprattutto nell'essere un punto di riferimento delle migliori energie umane che hanno scelto di dedicare il proprio impegno nella ricerca avanzata. Ma non ci fermiamo qui.*

*La riabilitazione nei prossimi anni assumerà un ruolo sempre più importante: il recupero di funzionalità perdute è la nostra sfida etica a cui la ricerca deve tendere, con l'aiuto delle innovazioni tecnologiche che aprono nuovi e inaspettati orizzonti.*

*E ancora di più, abbiamo indirizzato la nostra ricerca alle basi molecolari e cellulari del recupero di funzioni perdute al fine di poterle rafforzare e utilizzarle con maggiore razionalità e adeguatezza.*

*I nostri nuovi laboratori di ricerca nella sede di Val Cannuta, rappresentano oggi il nostro indirizzo gravoso ma ambizioso, sia per gli apparati tecnologici, sia per le competenze umane.*

*Un team sempre più compatto, con acquisizioni di nuove professionalità di livello internazionale e l'entusiasmo e l'impegno delle nuove generazioni, sono la base sulla quale costruiamo il nostro futuro di eccellenza.*



Buona lettura.

Carlo Trivelli  
Presidente San Raffaele S.p.a.

# REPORT DEL DIRETTORE SCIENTIFICO

*Questo volume illustra la struttura e l'organizzazione delle attività di ricerca del nostro Istituto ed espone, sebbene in maniera sintetica, le attività assistenziali.*

*Il report vuole essere una testimonianza dello stato dell'arte di un impegno che da sempre, ancor prima del 2005, anno in cui è avvenuto il riconoscimento del carattere scientifico, è volto a migliorare la qualità di vita dei nostri pazienti.*

*L'attività dell'IRCCS San Raffaele Pisana è dunque orientata all'integrazione tra la ricerca preclinica e quella clinica, nell'ottica di poterne utilizzare i prodotti nella routine clinica quotidiana e per la prevenzione.*

*Dalla lettura del volume si evince l'attitudine al miglioramento e al progresso, come testimoniato dall'apertura del nostro IRCCS verso altri istituti o IRCCS e la collaborazione con altre strutture di rilievo anche a livello internazionale.*

*A seguito di una richiesta del Ministero della Salute e di una autorizzazione della Regione Lazio, dal mese di Gennaio 2014 vi è stato il trasferimento della gestione dell'IRCCS San Raffaele Pisana alla società San Raffaele Roma s.r.l.*

*In continuità con il percorso intrapreso ormai da oltre un decennio, i nostri sforzi sono orientati a potenziare la simbiosi tra qualità delle cure e ricerca e ad armonizzare le strutture e i gruppi di ricerca sulla base dell'obiettivo ultimo di migliorare i servizi di cura e procurare un grande beneficio per il paziente, migliorandone la qualità di vita.*

*Sono grato agli autorevoli professionisti che compongono il nuovo Comitato Tecnico-Scientifico e che, inserendosi in questo continuum, contribuiscono alla crescita dell'Istituto fornendo un supporto sostanziale alla implementazione delle attività di ricerca e un apporto fondamentale nella ottimizzazione delle interazioni scientifiche.*

*Il fervore dei nostri professionisti emerge anche dalla partecipazione alle attività della comunità scientifica, che è stata molto intensa, come dimostrato dai contributi presentati dai ricercatori del San Raffaele a congressi nazionali ed internazionali, dalla lista di Eventi e Seminari tenuti presso la struttura, dagli eminenti relatori che hanno visitato l'Istituto e presentato seminari o letture.*

*L'attività di ricerca, raggruppata in 14 Aree specifiche e 10 Laboratori di ricerca, è articolata secondo le 5 Linee di ricerca concordate con il Ministero della Salute. Ogni area di ricerca e laboratorio è*



*coordinato da un responsabile, coadiuvato da uno staff di professionisti che, attraverso competenze e tecnologie trasversali specifiche, garantiscono l'aspetto traslazionale della ricerca. Nel volume vengono inoltre presentati i progetti di ricerca che comportano un diretto ritorno e beneficio per i nostri pazienti e le attività assistenziali svolte in collaborazione con altri istituti che caratterizzano l'eccellenza del nostro IRCCS. In tutti noi è forte la consapevolezza che la produzione scientifica da sola non è sufficiente a garantire il raggiungimento degli obiettivi traslazionali, ma necessita di una connessione in rete con altri enti regionali, nazionali ed internazionali per condividere le conoscenze cliniche e scientifiche e ottimizzare le risorse umane ed economiche.*

*Di particolare valore prospettico risultano i progetti in essere inerenti la telemedicina, la teleassistenza e la teleriabilitazione sviluppati nell'ambito di un network con altri IRCCS e sottolineano proprio l'importanza di creare reti tra strutture omologhe.*

*Gli indicatori che esprimono la produzione scientifica ed assistenziale dell'IRCCS San Raffaele Pisana hanno un andamento competitivo, sia relativamente alle pubblicazioni scientifiche su riviste recensite, sia per l'attrazione di fondi.*

*L'applicazione di sistemi robotici per la terapia motoria assistita rappresenta una delle principali innovazioni nello scenario recente della medicina fisica e riabilitativa verso la quale il nostro Istituto ha rivolto l'attenzione. La disponibilità di dispositivi robotici per la riabilitazione può consentire anche ai soggetti con abilità residue minime di essere assistiti nel portare a termine un compito motorio.*

*La mia gratitudine va ai responsabili delle aree e dei laboratori di ricerca, dei progetti di ricerca e a tutti i componenti della nostra comunità scientifica e clinica che con la loro professionalità e responsabilità continuano ad apportare un contributo fondamentale per i progressi scientifici riportati in questo volume e per quelli che di volta in volta caratterizzeranno la crescita del nostro Istituto.*

Massimo Fini  
Direttore Scientifico IRCCS San Raffaele

# ATTIVITA' SCIENTIFICA

## Comitato Scientifico

## Pubblicazioni

- Pubblicazioni su riviste impattate
- Pubblicazioni su riviste senza impact factor
- Libri e capitoli di libri
- Partecipazioni a congressi

## Aree di ricerca

## La Rete

## 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
- LINEA 2  
Studio dei meccanismi di recupero funzionale nelle patologie croniche, disabilitanti dell'apparato cardiovascolare e respiratorio
- LINEA 3  
Sviluppo di sistemi innovativi per il monitoraggio ed il controllo della risposta al trattamento riabilitativo
- LINEA 4  
Studio delle disabilità dello sviluppo e neuroriabilitazione pediatrica
- LINEA 5  
Identificazione di nuovi modelli organizzativi e gestionali per ottimizzare la risposta riabilitativa nel paziente disabile

## Ricerca Finalizzata

## Altra Tipologie di Ricerca

## Clinical Trial Center

## Convenzioni

## Collaborazioni Istituzionali

## Servizi Bibliotecari

## Scuole Universitarie

# COMITATO SCIENTIFICO



Nel mese di Giugno si è insediato il nuovo Comitato Tecnico Scientifico dell'IRCCS San Raffaele Pisana.

Nel corso dell'anno 2014, il Comitato si è riunito in quattro occasioni nelle quali i componenti si sono impegnati non soltanto nello sviluppo di nuove attività, oltre a quelle già presenti nell'Istituto, ma anche nel coordinare al meglio le unità, implementando sempre la ricerca pre-clinica da un lato e ottimizzando e potenziando le interazioni all'interno della struttura dall'altro.

I componenti hanno analizzato e valutato le lettere di intenti presentate dai ricercatori in occasione del bando di Ricerca Finalizzata.

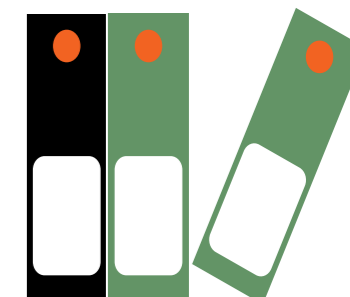
Il Comitato ha pianificato e approvato lo svolgimento di una serie di Seminari Scientifici da organizzare all'interno del San Raffaele per l'anno 2015.

## COMITATO SCIENTIFICO IRCCS SAN RAFFAELE PISANA

**Presidente: Enrico Garaci**

- GIORGIO ALBERTINI  
Direttore del Dipartimento Disabilità dello Sviluppo Motorie e Sensoriali, IRCCS San Raffaele Pisana
- LUCIO ANNUNZIATO  
Professore Ordinario di Farmacologia, Università di Napoli "Federico II"
- MASSIMO FINI  
Direttore Scientifico IRCCS San Raffaele Pisana
- MARCO FRANCESCHINI  
Coordinatore Clinico Riabilitazione Neuromotoria, IRCCS San Raffaele Pisana
- FIORELLA GUADAGNI  
Coordinatore Scientifico Biobanca Interistituzionale Multidisciplinare Biobank (BioBIM), IRCCS San Raffaele Pisana e BioDat
- VINCENZO MOLLACE  
Professore Ordinario di Farmacologia, Università degli Studi "Magna Graecia" di Catanzaro
- GIOVANNI MUTO  
Direttore della Struttura Complessa di Urologia dell'Ospedale San Giovanni Bosco, Torino
- GIUSEPPE NOVELLI  
 Rettore Università degli Studi di Roma " Tor Vergata"
- ANNA TERESA PALAMARA  
Professore Ordinario di Farmacia e Medicina, Università "Sapienza" di Roma
- GIUSEPPE ROTILIO  
Esperto di Nutrizione
- MATTEO ANTONIO RUSSO  
Direttore dei Laboratori di Ricerca preclinica, IRCCS San Raffaele Pisana
- NATALE SANTUCCI  
Direttore Medico Aziendale Gruppo San Raffaele
- FABRIZIO STOCCHI  
Responsabile del Centro per la Cura e la Diagnosi del Parkinson, IRCCS San Raffaele Pisana
- MAURIZIO VOLTERRANI  
Responsabile dell'Unità Operativa di Riabilitazione Cardiologica IRCCS San Raffaele Pisana

## PUBBLICAZIONI



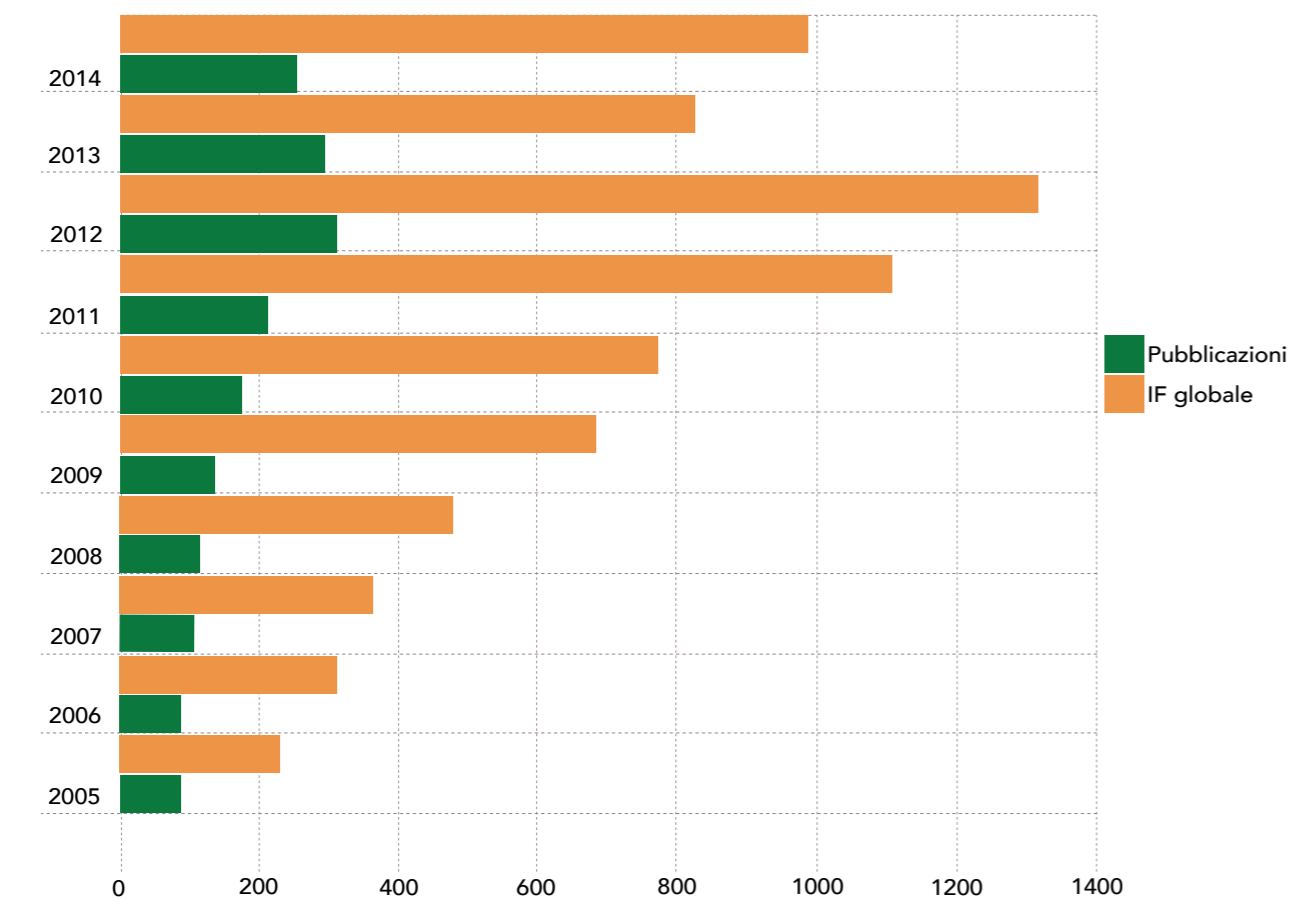


Nel 2014 l'attività scientifica dell'IRCCS San Raffaele è documentata da 317 pubblicazioni, che comprendono:

- 285 articoli originali su riviste recensite dal JCR
- 32 articoli originali su riviste non recensite dal JCR

Tale produzione scientifica costituisce anche il frutto delle collaborazioni di ricerca con altri gruppi e istituti a livello nazionale ed internazionale.

L'impact factor totale per gli articoli pubblicati nel 2014 è 970.



Impact Factor totale degli articoli pubblicati dall' IRCCS San Raffaele Pisana nel periodo 2005-2014

## 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

- Amirabdollahian F, Ates S, Basteris A, Cesario A, Buurke J, Hermens H, Hofs D, Johansson E, Mountain G, Nasr N, Nijenhuis S, Prange G, Rahman N, Sale P, Schätzlein F, Van Schooten B, Stienen A.  
Design, development and deployment of a hand/wrist exoskeleton for home-based rehabilitation after stroke - SCRIPT project.  
*Robotica*, Volume 32, Special Issue 08, December 2014,1331–1346.
- Basteris A, Johansson E, Klein P, Nasr N, Nijenhuis S, Sale P, Schätzlein F, Stienen A.  
Creating gesture controlled games for robot-assisted stroke rehabilitation.  
*Biomedizinische Technik* 2014; 59.
- Franceschini M, Iocco M, Molteni F, Santamato A, Smania N.  
Management of stroke patients submitted to botulinum toxin type A therapy: a Delphi survey of an Italian expert panel of specialist injectors.  
*Eur J Phys Rehabil Med.* 2014 Oct;50(5):525-532.
- Leon B, Basteris A, Infarinato F, Sale P, Nijenhuis S, Prange G, Amirabdollahian F.  
Grasps recognition and evaluation of stroke patients for supporting rehabilitation therapy.  
*BioMed Research International.* 2014;2014:318016.
- Pruneti C, Sgromo D, Bicchieri L, Fontana F, Franceschini M, Ferraro F, Cosentino C.  
Contribution to the validation of Italian version of Fear-Avoidance Beliefs Questionnaire.  
*Acta Biomed.* 2014 May 9;85(1):8-17.
- Sale P, Ceravolo MG, Franceschini M.  
Action observation therapy in the subacute phase promotes dexterity recovery in right-hemisphere stroke patients.  
*BioMed Research International.* 2014: 457538.
- Gison A, Dall'Armi V, Donati V, Rizza F, Giaquinto S.  
Dispositional optimism, depression, disability and quality of life in Parkinson's disease.  
*Funct Neurol.* 2014 Apr-Jun;29(2):113-119.
- Gison A, Rizza F, Bonassi S, Dall'Armi V, Lisi S, Giaquinto S.  
The sense-of-coherence predicts health-related quality of life and emotional distress but not disability in Parkinson's disease.  
*BMC Neurol.* 2014 Oct 10;14(1):193.
- Giustini A, Varela E, Franceschini M, Votava J, Zampolini M, Berteau M, Christodoulou N.  
UEMS - Position Paper. New technologies designed to improve functioning: the role of the physical and rehabilitation medicine physician.  
*Eur J Phys Rehabil Med.* 2014 Oct;50(5):579-583.
- Paoloni M, Tavernese E, Fini M, Sale P, Franceschini M, Santilli V, Mangone M.  
Segmental muscle vibration modifies muscle activation during reaching in chronic stroke: A pilot study.  
*NeuroRehabilitation.* 2014 Jan 1;35(3):405-414.
- Pistoia F, Sacco S, Franceschini M, Sarà M, Pistarini C, Cazzulani B, Simonelli I, Pasqualetti P, Carolei A.  
Comorbidities: a key issue in patients with disorders of consciousness.  
*J Neurotrauma.* 2014 Oct 21. [Epub ahead of print]

- Pistoia F, Sarà M, Sacco S, Franceschini M, Carolei A. Silencing the Brain May be Better than Stimulating it. The GABA Effect. *Curr Pharm Des.* 2014;20(26):4154-4166.
- Sale P, Franceschini M, Mazzoleni S, Palma E, Agosti M, Posteraro F. Effects of upper limb robot-assisted therapy on motor recovery in subacute stroke patients. *J Neuroeng Rehabil.* 2014 Jun 19;11:104.
- Sale P, Mazzoleni S, Lombardi V, Galafate D, Massimiani MP, Posteraro F, Damiani C, Franceschini M. Recovery of hand function with robot-assisted therapy in acute stroke patients: a randomized-controlled trial. *Int J Rehabil Res.* 2014 Sep;37(3):236-242.
- Sale P, Stocchi F, Galafate D, De Pandis MF, Le Pera D, Sova I, Galli M, Foti C, Franceschini M. Effects of robot assisted gait training in progressive supranuclear palsy (PSP): a preliminary report. *Front Hum Neurosci.* 2014 Apr 17;8:207.
- Bloem BR, Stocchi F. Move for change Part III: a European survey evaluating the impact of the EPDA Charter for People with Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2014 Sep 8. [Epub ahead of print]
- Borghain R, Szasz J, Stanzione P, Meshram C, Bhatt M, Chirilineau D, Stocchi F, Lucini V, Giuliani R, Forrest E, Rice P, Anand R; Study 016 Investigators. Randomized trial of safinamide add-on to levodopa in Parkinson's disease with motor fluctuations. *Mov Disord.* 2014 Feb;29(2): 229-237.
- Borghain R, Szasz J, Stanzione P, Meshram C, Bhatt MH, Chirilineau D, Stocchi F, Lucini V, Giuliani R, Forrest E, Rice P, Anand R; Study 018 Investigators. Two-year, randomized, controlled study of safinamide as add-on to levodopa in mid to late Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014 Sep;29(10):1273-1280.
- Cesario A, Auffray C, Agusti A, Apolone G, Balling R, Barbanti P, Bellia A, Boccia S, Bousquet J, Cardaci V, Cazzola M, Dall'Armi V, Daraselia N, Ros LD, Del Bufalo A, Ducci G, Ferri L, Fini M, Fossati C, Gensini G, Granone PM, Kinross J, Lauro D, Lo Cascio G, Lococo F, Lococo A, Maier D, Marcus F, Margaritora S, Marra C, Minati G, Neri M, Pasqua F, Pison C, Pristipino C, Roca J, Rosano G, Rossini PM, Russo P, Salinaro G, Shenhar S, Soreq H, Sterk PJ, Stocchi F, Torti M, Volterrani M, Wouters EF, Frustaci A, Bonassi S. A systems medicine clinical platform for understanding and managing non-communicable diseases. *Curr Pharm Des.* 2014;20(38):5945-5956.
- Mazzone P, Paoloni M, Mangone M, Santilli V, Insola A, Fini M, Scarnati E. Unilateral deep brain stimulation of the pedunculopontine tegmental nucleus in idiopathic Parkinson's disease: effects on gait initiation and performance. *Gait Posture.* 2014 Jul;40(3):357-362.
- Italiano D, Bianchini E, Ilardi M, Cilia R, Pezzoli G, Zanettini R, Vacca L, Stocchi F, Bramanti P, Ciurleo R, Di Lorenzo G, Polimeni G, de Luise C, Ross D, Rijnbeek P, Sturkenboom M, Trifirò G. Effectiveness of risk minimization measures for cabergoline-induced cardiac valve fibrosis in clini-

- cal practice in Italy. *J Neural Transm.* 2014 Sep 18. [Epub ahead of print]
- Rizos A, Martinez-Martin P, Odin P, Antonini A, Kessel B, Kozul TK, Todorova A, Douiri A, Martin A, Stocchi F, Dietrichs E, Chaudhuri KR; EUROPAR and the IPDMDS non-Motor PD Study Group. Characterizing motor and non-motor aspects of early-morning off periods in Parkinson's disease: An international multicenter study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Nov;20(11):1231-1235.
- Sale P, Stocchi F, Galafate D, De Pandis MF, Le Pera D, Sova I, Galli M, Foti C, Franceschini M. Effects of robot assisted gait training in progressive supranuclear palsy (PSP): a preliminary report. *Front Hum Neurosci.* 2014 Apr 17;8:207. doi: 10.3389/fnhum.2014.00207. eCollection 2014.
- Stocchi F. Therapy for Parkinson's disease: What is in the pipeline? *Neurotherapeutics.* 2014 Jan;11(1):24-33.
- Stocchi F, Abbruzzese G, Ceravolo R, Cortelli P, D'Amelio M, De Pandis MF, Fabbrini G, Pacchetti C, Pezzoli G, Tessitore A, Canesi M, Iannacone C, Zappia M; FORTE Study Group. Prevalence of fatigue in Parkinson disease and its clinical correlates. *Neurology.* 2014 Jul 15;83(3):215-220.
- Stocchi F; ADAGIO investigators. Benefits of treatment with rasagiline for fatigue symptoms in patients with early Parkinson's disease. *Eur J Neurol.* 2014 Feb;21(2):357-360.
- 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; DEEP study group. Early DEtection of wEaring off in Parkinson disease: the DEEP study. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Feb;20(2):204-211.
- Stocchi F, Hsu A, Khanna S, Ellenbogen A, Mahler A, Liang G, Dillmann U, Rubens R, Kell S, Gupta S. Comparison of IPX066 with carbidopa-levodopa plus entacapone in advanced PD patients. *Parkinsonism Relat Disord.* 2014 Dec;20(12):1335-1340.
- Stocchi F, Radicati FG, Torti M. Drug safety evaluation of ropinirole prolonged release. *Expert Opin Drug Saf.* 2014 Mar;13(3):383-389.
- Stocchi F, Stirpe P. The relevance of dopaminergic level in nocturnal disability in Parkinson's disease: implications of continuous dopaminergic stimulation at night to treat the symptoms. *J Neural Transm.* 2014 Aug;121 Suppl 1:S79-83. Epub 2014 Jul 3.
- Olanow CW, Kieburtz K, Stocchi F. Initiating levodopa therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2014 Mar;29(3):430.
- Wong TH, Chiu WZ, Breedveld GJ, Li KW, Verkerk AJ, Hondius D, Hukema RK, Seelaar H, Frick P,

Severijnen LA, Lammers GJ, Lebbink JH, van Duinen SG, Kamphorst W, Rozemuller AJ; Netherlands Brain Bank, Bakker EB; International Parkinsonism Genetics Network (Stocchi F, Vacca L collaborators), Neumann M, Willemsen R, Bonifati V, Smit AB, van Swieten J. PRKAR1B mutation associated with a new neurodegenerative disorder with unique pathology. *Brain*. 2014 May;137(Pt 5):1361-1373.

Allais G, Bussone G, Tullo V, Cortelli P, Valguarnera F, Barbanti P, Sette G, D'Onofrio F, Curone M, Benedetto C. Frovatriptan 2.5 mg plus dexketoprofen (25mg or 37.5mg) in menstrually related migraine. Subanalysis from a double-blind, randomized trial. *Cephalalgia*. 2014 Jul 22. pii: 0333102414542290. [Epub ahead of print]

Allais G, Tullo V, Cortelli P, Barbanti P, Valguarnera F, Sette G, D'Onofrio F, Curone M, Zava D, Pezzola D, Reggiardo G, Omboni S, Frediani F, Bussone G, Benedetto C. Efficacy of early vs. late use of frovatriptan combined with dexketoprofen vs. frovatriptan alone in the acute treatment of migraine attacks with or without aura. *Neurol Sci*. 2014 May;35 Suppl 1:107-113.

Barbanti P, Egeo G. Pharmacological trials in migraine: It's time to reappraise where the headache is and what the pain is like. *Headache*. [Epub ahead of print] 2014 Dec 19.

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Fofi L. Treatment of tension-type headache: from old myths to modern concepts. *Neurol Sci*. 2014 May;35 Suppl 1:17-21.

Barbanti P, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Della Morte D. Drugs targeting nitric oxide synthase for migraine treatment. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014 Aug;23(8):1141-1148.

Barbanti P, Palmirotta R, De Marchis M, Ludovici G, Ialongo C, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. EHMTI-0241. association between migraine and sod1 and sod2 genes polymorphisms: The bio-bim study. *The Journal of Headache and Pain*. 2014;15:B4.

Fofi L, Allais G, Quirico PE, Rolando S, Borgogno P, Barbanti P, Benedetto C. Acupuncture in cluster headache: four cases and review of the literature. *Neurol Sci*. 2014 May;35 Suppl 1:195-198.

Palmirotta R, Barbanti P, De Marchis ML, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Ialongo C, Valente MG, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. Is SOD2 Ala16Val polymorphism associated with migraine with aura phenotype? *Antioxid Redox Signal*. 2014 Oct 8. [Epub ahead of print]

Fofi L, Orlandi V, Vanacore N, Mizzone MC, Rosa A, Aurilia C, Egeo G, Casella P, Barbanti P. Headache in chronic cocaine users: A cross-sectional study. *Cephalalgia*. 2014 Feb 5;34(9):671-678.

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* 2014 May;34(6):434-445.

Palmirotta R, Barbanti P, Ludovici G, De Marchis ML, Ialongo C, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Abete P, Spila A, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. Association between migraine and ACE gene(insertion/deletion) polymorphism: the BioBIM study. *Pharmacogenomics*. 2014 Feb;15(2):147-155.

Cardinale A, Chiesa R, Sierks M. Protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Int J Cell Biol*. 2014;2014:217371. doi: 10.1155/2014/217371. Epub 2014 Mar 31.

Cardinale A, de Stefano MC, Mollinari C, Racaniello M, Garaci E, Merlo D. Biochemical characterization of sirtuin 6 in the brain and its involvement in oxidative stress response. *Neurochem Res*. 2014 Nov 1. [Epub ahead of print]

Cardinale A, Merlo D, Giunchedi P, Biocca S. Therapeutic application of intrabodies against age-related neurodegenerative disorders. *Curr Pharm Des*. 2014;20(38):6028-6036.

Soukupová M, Binaschi A, Falcicchia C, Zucchini S, Roncon P, Palma E, Magri E, Grandi E, Simonato M. Impairment of GABA release in the hippocampus at the time of the first spontaneous seizure in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2014 Apr 21; 257C:39-49. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.04.014.

Roseti C. Interview with Cristina Roseti, 2013 Morris-Coole/Epilepsia prize winner. *Epilepsia*. 2014 May;55(5):638-639

Apuzzo D, Giotti C, Pasqualetti P, Ferrazza P, Soldati P, Zucco GM. An observational retrospective/horizontal study to compare oxygen-ozone therapy and/or global postural re-education in complicated chronic low back pain. *Funct Neurol*. 2014 Mar 5:1-9. [Epub ahead of print]

Cavedo E, Redolfi A, Angeloni F, Babiloni C, Lizio R, Chiapparini L, Bruzzone MG, Aquino D, Sabatini U, Alesiani M, Cherubini A, Salvatore E, Soricelli A, Vernieri F, Scarscia F, Sinforiani E, Chiarati P, Bastianello S, Montella P, Corbo D, Tedeschi G, Marino S, Baglieri A, De Salvo S, Carducci F, Quattrocchi CC, Cobelli M, Frisoni GB. The Italian Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (I-ADNI): validation of structural MR imaging. *J Alzheimers Dis*. 2014;40(4):941-952.

Cogliati Dezza I, Zito G, Tomasevic L, Filippi MM, Ghazaryan A, Porcaro C, Squitti R, Ventriglia M, Lupoi D, Tecchio F. Functional and structural balances of homologous sensorimotor regions in multiple sclerosis fatigue. *J Neurol*. 2014 Dec 19. [Epub ahead of print]

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. 2014 May;35(5):1969-1980.

Mallio CA, Sarà M, Pistoia ML, Occhicone F, Errante Y, Giona A, Zobel BB, Quattrocchi CC.  
Bilateral remote cerebellar haemorrhage after spinal surgery: a case study and review of the literature.  
Brain Inj. 2014;28(9):1216-1222.

Marcotulli C, Leonardi L, Tessa A, De Negrìs AM, Cornia R, Pierallini A, Haggiag S, Pierelli F, Santorelli FM, Casali C.  
Early-onset optic neuropathy as initial clinical presentation in SPG7.  
J Neurol. 2014 Sep;261(9):1820-1821.

Minniti G, Scaringi C, Lanzetta G, Bozzao A, Romano A, De Sanctis V, Valeriani M, Osti M, Enrici RM.  
Whole brain reirradiation and concurrent temozolomide in patients with brain metastases.  
J Neurooncol. 2014 Jun;118(2):329-334.

Romano A, Biraschi F, Tavanti F, Beccia M, Dilisi F, Castrignanò A, Giuliani G, Pierallini A, Fantozzi LM, Rasura M, Bozzao A.  
Role of multidetector CT in the recognition of hyperdense middle cerebral artery sign (HMCAS) in patients with acute cerebral ischaemia: correlation with DWI-MRI sequences and clinical data.  
Radiol Med. 2014 Aug 21. [Epub ahead of print]

Romano A, Tavanti F, Rossi Espagnet MC, Terenzi V, Cassoni A, Suma G, Boellis A, Pierallini A, Valentini V, Bozzao A.  
The Role of Time-resolved Imaging of contrast kinetics (TRICKS) Magnetic Resonance Angiography (MRA) in the evaluation of head-neck vascular anomalies. A preliminary Experience.  
Dentomaxillofac Radiol. 2014 Nov 20:20140302. [Epub ahead of print]

Tavanti F, Coppola V, Romano A, Beccia M, Giuliani G, Pierallini A, Bozzao A.  
Diffuse axonal injury with selective involvement of the corticospinal tract. A diffusion tensor imaging case study.  
Neuroradiol J. 2014 Sep;27(4):397-399.

Babiloni C, Buffo P, Vecchio F, Onorati P, Muratori C, Ferracuti S, Roma P, Battuello M, Donato N, Noce G, Di Campli F, Gianserra L, Teti E, Aceti A, Soricelli A, Viscione M, Andreoni M, Rossini PM, Pennica A.  
Cortical sources of resting-state EEG rhythms in "experienced" HIV subjects under antiretroviral therapy.  
Clin Neurophysiol. 2014 Sep;125(9):1792-1802.

Babiloni C, Del Percio C, Arendt-Nielsen L, Soricelli A, Romani GL, Rossini PM, Capotosto P.  
Cortical EEG alpha rhythms reflect task-specific somatosensory and motor interactions in humans.  
Clin Neurophysiol. 2014 Oct;125(10):1936-1945.

Babiloni C, Del Percio C, Lizio R, Infarinato F, Blin O, Bartres-Faz D, Dix SL, Bentivoglio M, Soricelli A, Bordet R, Rossini PM, Richardson JC.  
A review of the effects of hypoxia, sleep deprivation and transcranial magnetic stimulation on EEG activity in humans: challenges for drug discovery for Alzheimer's disease.

Curr Alzheimer Res. 2014;11(5):501-518.

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. 2014 Jan;35(1):130-142.

Babiloni C, Del Percio C, Boccardi M, Lizio R, Lopez S, Carducci F, Marzano N, Soricelli A, Ferri R, Triggiani AI, Prestia A, Salinari S, Rasser PE, Basar E, Famà F, Nobili F, Yener G, Emek-Savaş DD, Loreto G, Mundi C, Thompson PM, Rossini PM, Frisoni GB.  
Occipital sources of resting state alpha rhythms are related to local gray matter density in subjects with amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease.  
Neurobiol Aging 2014 [Epub ahead of print]

Babiloni C, Vecchio F, Buffo P, Iacoboni M, Pistoia F, Sacco S, Sara M, Rossini PM.  
Mechanisms of cortical neural synchronization related to healthy and impaired consciousness: evidence by quantitative electroencephalographic studies.  
Curr Pharm Des. 2014;20(26):4225-4238.

Babiloni C, Pennica A, Vecchio F, Onorati P, Muratori C, Ferracuti S, Roma P, Donato N, Noce G, Del Percio C, Bonacci C, Di Campli F, Gianserra L, Teti E, Aceti A, Soricelli A, Viscione M, Rossini PM, Andreoni M.  
Antiretroviral therapy effects on sources of cortical rhythms in HIV subjects: Responders vs. mild responders.  
Clinical Neurophysiology 2014 [Epub ahead of print]

Barnard ND, Bush AI, Ceccarelli A, Cooper J, de Jager CA, Erickson KI, Fraser G, Kesler S, Levin SM, Lucey B, Morris MC, Squitti R.  
Dietary and lifestyle guidelines for the prevention of Alzheimer's disease.  
Neurobiol Aging. 2014 Sep;35 Suppl 2:S74-8.

Bianco A, Patanella AK, Nociti V, Marti A, Frisullo G, Plantone D, De Fino C, Fetta A, Batocchi AP, Rossini PM, Mirabella M.  
Second-line therapy with fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis in clinical practice: the effect of previous exposure to Natalizumab.  
Eur Neurol. 2014 Nov 7;73(1-2):57-65.

Caliandro P, Mirabella M, Padua L, Simbolotti C, De Fino C, Iacovelli C, Sancricca C, Rossini PM.  
Idiopathic inflammatory myopathies evaluated by near infrared spectroscopy.  
Muscle Nerve. 2014 Oct 7. [Epub ahead of print]

Caliandro P, Padua L, Rossi A, Rossini PM, Stalberg E, Feurra M, Ulivelli M, Bartalini S, Giannini F, Rossi S.  
Jitter of corticospinal neurons during repetitive transcranial magnetic stimulation. Method and possible clinical implications.  
Brain Stimul. 2014 Jul-Aug;7(4):580-586.

Curcio G, Mazzucchi E, Marca GD, Vollono C, Rossini PM.  
Electromagnetic fields and EEG spiking rate in patients with focal epilepsy.  
Clin Neurophysiol. 2014 Aug 11. [Epub ahead of print]

Gorgoni M, Ferlazzo F, Ferrara M, Moroni F, D'Atri A, Fanelli S, Gizzi Torriglia I, Lauri G, Marzano C, Rossini PM, De Gennaro L.  
Topographic electroencephalogram changes associated with psychomotor vigilance task performance after sleep deprivation.  
*Sleep Med.* 2014 Sep;15(9):1132-1139.

Gorgoni M, Ferlazzo F, Moroni F, D'Atri A, Donarelli S, Fanelli S, Gizzi Torriglia I, Lauri G, Ferrara M, Marzano C, Rossini PM, Bramanti P, De Gennaro L.  
Sleep deprivation affects somatosensory cortex excitability as tested through median nerve stimulation.  
*Brain Stimul.* 2014 Sep-Oct;7(5):732-739.

Granata G, Luigetti M, Coraci D, Del Grande A, Romano A, Bisogni G, Bramanti P, Rossini PM, Sabatelli M, Padua L.  
Ultrasound evaluation in transthyretin-related amyloid neuropathy.  
*Muscle Nerve.* 2014 Sep;50(3):372-376.

Guerra A, Petrichella S, Vollero L, Ponzio D, Pasqualetti P, Määttä S, Mervaala E, Könönen M, Bressi F, Iannello G, Rossini PM, Ferreri F.  
Neurophysiological features of motor cortex excitability and plasticity in subcortical ischemic vascular dementia: A TMS mapping study.  
*Clin Neurophysiol.* 2014 Sep 16. pii: S1388-2457(14)00477-5. [Epub ahead of print]

Iorio R, Sabatelli M, Del Grande A, Bisogni G, Damato V, Plantone D, Marti A, Frisullo G, Romano A, Rossini PM, Luigetti M.  
Distinct lymphocyte subsets in IgM-related neuropathy: clinical-immunological correlations.  
*Neurol Sci.* 2014 Sep 6. [Epub ahead of print]

Lefaucheur JP, André-Obadia N, Antal A, Ayache SS, Baeken C, Benninger DH, Cantello RM, Cincotta M, de Carvalho M, De Ridder D, Devanne H, Di Lazzaro V, Filipović SR, Hummel FC, Jääskeläinen SK, Kimiskidis VK, Koch G, Langguth B, Nyffeler T, Oliviero A, Padberg F, Poulet E, Rossi S, Rossini PM, Rothwell JC, Schönfeldt-Lecuona C, Siebner HR, Slotema CW, Stagg CJ, Valis-Sole J, Ziemann U, Paulus W, Garcia-Larrea L.  
Evidence-based guidelines on the therapeutic use of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS).  
*Clin Neurophysiol.* 2014 Nov;125(11):2150-2206.

Luigetti M, Del Grande A, Conte A, Lo Monaco M, Bisogni G, Romano A, Zollino M, Rossini PM, Sabatelli M.  
Clinical, neurophysiological and pathological findings of HNPP patients with 17p12 deletion: A single-centre experience.  
*J Neurol Sci.* 2014 Jun 15;341(1-2):46-50. Epub 2014 Mar 31.

Pal A, Siotto M, Prasad R, Squitti R.  
Towards a unified vision of Copper involvement in Alzheimer's Disease: a review connecting basic, experimental, and clinical research.  
*J Alzheimers Dis.* 2014 Sep 26. [Epub ahead of print]

Porcaro C, Medaglia MT, Thai NJ, Seri S, Rotshtein P, Tecchio F.  
Contradictory reasoning network: an EEG and fmRI study.  
*PLoS One.* 2014 Mar 25;9(3):e92835. doi: 10.1371/journal.pone.0092835. eCollection 2014.

Raspopovic S, Capogrosso M, Petrini FM, Bonizzato M, Rigosa J, Di Pino G, Carpaneto J, Controzzi M, Boretius T, Fernandez E, Granata G, Oddo CM, Citi L, Ciancio AL, Cipriani C, Carrozza MC, Jensen W, Guglielmelli E, Stieglitz T, Rossini PM, Micera S.  
Restoring natural sensory feedback in real-time bidirectional hand prostheses.  
*Sci Transl Med.* 2014 Feb 5;6(222):222ra19.

Siotto M, Pasqualetti P, Marano M, Squitti R.  
Automation of o-dianisidine assay for ceruloplasmin activity analyses: usefulness of investigation in Wilson's disease and in hepatic encephalopathy.  
*J Neural Transm.* 2014 Oct;121(10):1281-1286. Epub 2014 Mar 25.

Squitti R.  
Copper subtype of Alzheimer's disease (AD): Meta-analyses, genetic studies and predictive value of non-ceruloplasmin copper in mild cognitive impairment conversion to full AD.  
*J Trace Elem Med Biol.* 2014 Oct;28(4):482-485.

Squitti R, Ghidoni R, Siotto M, Ventriglia M, Benussi L, Paterlini A, Magri M, Binetti G, Cassetta E, Caprara D, Vernieri F, Rossini PM, Pasqualetti P.  
Value of serum nonceruloplasmin copper for prediction of mild cognitive impairment conversion to Alzheimer disease.  
*Ann Neurol.* 2014 Apr;75(4):574-580.

Squitti R, Siotto M, Polimanti R.  
Low-copper diet as a preventive strategy for Alzheimer's disease.  
*Neurobiol Aging.* 2014 Sep;35 Suppl 2:S40-50. Epub 2014 May 15.

Qiu YQ, Hua XY, Zuo CT, Li T, Zheng MX, Shen YD, Xu JG, Gu YD, Rossini PM, Xu WD.  
Deactivation of distant pain-related regions induced by 20-day rTMS: a case study of one-week pain relief for long-term intractable deafferentation pain.  
*Pain Physician.* 2014 Jan-Feb;17(1):E99-E105.

Serra L, Silvestri G, Petrucci A, Basile B, Masciullo M, Makovac E, Torso M, Spanò B, Mastropasqua C, Harrison NA, Bianchi ML, Giacanelli M, Caltagirone C, Cercignani M, Bozzali M.  
Abnormal functional brain connectivity and personality traits in myotonic dystrophy type 1.  
*JAMA Neurol.* 2014 May 1;71(5):603-611.

Tecchio F, Cancelli A, Cottone C, Zito G, Pasqualetti P, Ghazaryan A, Rossini PM, Filippi MM.  
Multiple sclerosis fatigue relief by bilateral somatosensory cortex neuromodulation.  
*J Neurol.* 2014 Aug;261(8):1552-1558.

Tezenas du Montcel S, Durr A, Rakowicz M, Nanetti L, Charles P, Sulek A, Mariotti C, Rola R, Schols L, Bauer P, Dufaure-Garé I, Jacobi H, Forlani S, Schmitz-Hübsch T, Filla A, Timmann D, van de Warrenburg BP, Marelli C, Kang JS, Giunti P, Cook A, Baliko L, Bela M, Boesch S, Szymanski S, Berciano J, Infante J, Buerk K, Masciullo M, Di Fabio R, Depondt C, Ratka S, Stevanin G, Klockgether T, Brice A, Golmard JL.  
Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6.  
*J Med Genet.* 2014 Jul;51(7):479-486.

Vecchio F, Lacidogna G, Miraglia F, Bramanti P, Ferreri F, Rossini PM.  
Prestimulus interhemispheric coupling of brain rhythms predicts cognitive-motor performance in healthy humans.

J Cogn Neurosci. 2014 Sep;26(9):1883-1890.

Vecchio F, Miraglia F, Bramanti P, Rossini PM.  
Human brain networks in physiological aging: a graph theoretical analysis of cortical connectivity from EEG data.  
J Alzheimers Dis. 2014;41(4):1239-1249.

Vernieri F, Altamura C, Palazzo P, Altavilla R, Fabrizio E, Fini R, Melgari JM, Paolucci M, Pasqualetti P, Maggio P.  
1-Hz repetitive transcranial magnetic stimulation increases cerebral vasomotor reactivity: a possible autonomic nervous system modulation.  
Brain Stimul. 2014 Mar-Apr;7(2):281-286. Epub 2014 Jan 1.

Vecchio F, Miraglia F, Curcio G, Della Marca G, Vollono C, Mazzucchi E, Bramanti P, Rossini PM.  
Cortical connectivity in fronto-temporal focal epilepsy from EEG analysis: A study via graph theory.  
Clinical Neurophysiology 2014 [Epub ahead of print]

Vecchio F, Miraglia F, Marra C, Quaranta D, Vita MG, Bramanti P, Rossini PM.  
Human brain networks in cognitive decline: a graph theoretical analysis of cortical connectivity from EEG data.  
J Alzheimers Dis. 2014;41(1):113-127.

Vecchio F, Miraglia F, Valeriani L, Scarpellini MG, Bramanti P, Mecarelli O, Rossini PM.  
Cortical brain connectivity and B-type natriuretic peptide in patients with congestive heart failure.  
Clin EEG Neurosci. 2014 Jul 3. [Epub ahead of print]

Zappasodi F, Olejarczyk E, Marzetti L, Assenza G, Pizzella V, Tecchio F.  
Fractal dimension of EEG activity senses neuronal impairment in acute stroke.  
PLoS One. 2014 Jun 26;9(6):e100199.

Zito G, Luders E, Tomasevic L, Lupoi D, Toga AW, Thompson PM, Rossini PM, Filippi MM, Tecchio F.  
Inter-hemispheric functional connectivity changes with corpus callosum morphology in multiple sclerosis.  
Neuroscience. 2014 Apr 25;266: 47-55.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR.  
Nuclear recruitment of neuronal nitric-oxide synthase by  $\beta$ -syntrophin is crucial for the induction of mitochondrial biogenesis.  
J Biol Chem. 2014 Jan 3;289(1):365-378.

Baldelli S, Aquilano K, Ciriolo MR.  
PGC-1 $\alpha$  buffers ROS-mediated removal of mitochondria during myogenesis.  
Cell Death Dis. 2014 Nov 6;5:e1515.

Baldelli S, Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR.  
The role of nNOS and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle cells.  
J Cell Sci. 2014 Nov 15;127(22):4813-4820.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR.  
Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant.

Frontiers in Pharmacology. 2014;5(196).

Desideri E, Vegliante R, Cardaci S, Nepravishta R, Paci M, Ciriolo MR.  
MAPK14/p38 $\alpha$  -dependent modulation of glucose metabolism affects ROS levels and autophagy during starvation.  
Autophagy. 2014 Sep 1;10(9):1652-1665.

Desideri E, Vegliante R, Ciriolo MR.  
Mitochondrial dysfunctions in cancer: genetic defects and oncogenic signaling impinging on TCA cycle activity.  
Cancer Lett. 2014 Mar 7 [Epub ahead of print].

Lettieri Barbato D, Tatulli G, Aquilano K, Ciriolo MR.  
Inhibition of age-related cytokines production by ATGL: A mechanism linked to the anti-inflammatory effect of resveratrol.  
Mediators Inflamm. 2014; 2014: Epub 2014 Apr 8.

Lettieri Barbato D, Vegliante R, Desideri E, Ciriolo MR.  
Managing lipid metabolism in proliferating cells: New perspective for metformin usage in cancer therapy.  
Biochim Biophys Acta. 2014 Apr;1845(2):317-324.

Montagna C, Di Giacomo G, Rizza S, Cardaci S, Ferraro E, Grumati P, De Zio D, Maiani E, Muscoli C, Lauro F, Ilari S, Bernardini S, Cannata S, Gargioli C, Ciriolo MR, Cecconi F, Bonaldo P, Filomeni G.  
S-nitrosoglutathione reductase deficiency-induced S-nitrosylation results in neuromuscular dysfunction.  
Antioxid Redox Signal. 2014 Aug 1;21(4):570-587.

Peluso I, Villano DV, Roberts SA, Cesqui E, Raguzzini A, Borges G, Crozier A, Catasta G, Toti E, Serafini M.  
Consumption of mixed fruit-juice drink and vitamin C reduces postprandial stress induced by a high fat meal in healthy overweight subjects.  
Curr Pharm Des. 2014;20(6):1020-1024.

## LINEA 2

## STUDIO DEI MECCANISMI DI RECUPERO FUNZIONALE NELLE PATOLOGIE CRONICHE, DISABILITANTI DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE E RESPIRATORIO

- Abete P, Della Morte D, Gargiulo G, Basile C, Langellotto A, Galizia G, Testa G, Canonico V, Bonaduce D, Cacciatore F.  
Cognitive impairment and cardiovascular diseases in the elderly. A heart-brain continuum hypothesis.  
*Ageing Res Rev.* 2014 Nov;18:41-52.
- Basile C, Della Morte D, Cacciatore F, Gargiulo G, Galizia G, Roselli M, Curcio F, Bonaduce D, Abete P.  
Phase angle as bioelectrical marker to identify elderly patients at risk of sarcopenia.  
*Exp Gerontol.* 2014 Jul 15;58C:43-46.
- 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).* 2014 Feb;53(2):293-299.
- D'Ambrosio D, Tomaselli V, Gargiulo G, Roselli M, Della Morte D, Abete P.  
Evans syndrome presented with marginal zone lymphoma and duodenal neuroendocrine tumor in an elderly woman.  
*International Journal of Gerontology* [Epub ahead of print]
- Della Morte D, Dong C, Beecham A, Wang L, Cabral D, Markert MS, Blanton SH, Sacco RL, Rundek T.  
Relationship between sirtuin and mitochondrial uncoupling protein genes and carotid artery stiffness.  
*Transl Res.* 2014 Sep 6. [Epub ahead of print]
- Della Morte D, Wang L, Beecham A, Blanton SH, Zhao H, Sacco RL, Rundek T, Dong C.  
Novel genetic variants modify the effect of smoking on carotid plaque burden in Hispanics.  
*J Neurol Sci.* 2014 Sep 15;344(1-2):27-31.
- Debette S, Goeggel Simonetti B, Schilling S, Martin JJ, Kloss M, Sarikaya H, Hausser I, Engelter S, Metso TM, Pezzini A, Thijs V, Touzé E, Paolucci S, Costa P, Sessa M, Samson Y, Béjot Y, Altintas A, Metso AJ, Hervé D, Lichy C, Jung S, Fischer U, Lamy C, Grau A, Chabriat H, Caso V, Lyrer PA, Stapf C, Tatlisumak T, Brandt T, Tournier-Lasserre E, Germain DP, Frank M, Baumgartner RW, Grond-Ginsbach C, Bousser MG, Leys D, Dallongeville J, Bersano A, Arnold M; CADISP-plus consortium. (Palmirotta R. collaborator)  
Familial occurrence and heritable connective tissue disorders in cervical artery dissection.  
*Neurology.* 2014 Nov 25;83(22):2023-2031
- Della Morte D, Palmirotta R, Rehni AK, Pastore D, Capuani B, Pacifici F, De Marchis ML, Dave KR, Bellia A, Fogliame G, Ferroni P, Donadel G, Cacciatore F, Abete P, Dong C, Pileggi A, Roselli M, Ricordi C, Sbraccia P, Guadagni F, Rundek T, Lauro D.  
Pharmacogenomics and pharmacogenetics of thiazolidinediones: role in diabetes and cardiovascular risk factors.  
*Pharmacogenomics.* 2014 Dec;15(16):2063-2082.
- Ferrelli F, Pastore D, Capuani B, Lombardo MF, Blot-Chabaud M, Coppola A, Basello K, Galli A, Donadel G, Romano M, Caratelli S, Pacifici F, Arriga R, Di Daniele N, Sbraccia P, Sconocchia G, Bellia A, Tesaro M, Federici M, Della Morte D, Lauro D.  
Serum glucocorticoid inducible kinase (SGK)-1 protects endothelial cells against oxidative stress and apoptosis induced by hyperglycaemia.



Acta Diabetol. 2014 Jun 25. [Epub ahead of print]

Ferroni P, Guadagni F, Laudisi A, Vergati M, Riondino S, Russo A, Davì G, Roselli M. Estimated glomerular filtration rate is an easy predictor of venous thromboembolism in cancer patients undergoing platinum-based chemotherapy. *Oncologist*. 2014;19(5):562-567.

Ferroni P, Guadagni F, Riondino S, Portarena I, Mariotti S, La Farina F, Davì G, Roselli M. Evaluation of mean platelet volume as a predictive marker for cancer-associated venous thromboembolism during chemotherapy. *Haematologica*. 2014 Oct;99(10):1638-1644.

Ferroni P, Riondino S, Formica V, Cereda V, Tosetto L, La Farina F, Valente MG, Vergati M, Guadagni F, Roselli M. Venous thromboembolism risk prediction in ambulatory cancer patients. Clinical significance of neutrophil/lymphocyte ratio and platelet/lymphocyte ratio. *Int J Cancer*. 2014 Jul 15. [Epub ahead of print]

Ferroni P, Roselli M, Portarena I, Formica V, Riondino S, La Farina F, Costarelli L, Melino A, Massimiani G, Cavaliere F, Palmirotta R, Guadagni F. Plasma plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) levels in breast cancer - Relationship with clinical outcome. *Anticancer Res*. 2014 Mar;34(3):1153-1161.

Ferroni P, Roselli M, Riondino S, Guadagni F. Predictive value of HDL cholesterol for cancer-associated venous thromboembolism during chemotherapy. *J Thromb Haemost*. 2014 Dec;12(12):2049-2053.

Formica V, Luccchetti J, Cunningham D, Smyth EC, Ferroni P, Nardecchia A, Tesauro M, Cereda V, Guadagni F, Roselli M. Systemic inflammation, as measured by the neutrophil/lymphocyte ratio, may have differential prognostic impact before and during treatment with fluorouracil, irinotecan and bevacizumab in metastatic colorectal cancer patients. *Med Oncol*. 2014 Sep;31(9):166.

Formica V, Morelli C, Ferroni P, Nardecchia A, Tesauro M, Cereda V, Guadagni F, Roselli M. Predictive role of neutrophil/lymphocyte ratio (nlr) for oxaliplatin efficacy in metastatic pancreatic cancer patients (pts). *Annals of Oncology*. 2014 September 01;25(suppl 4):iv243.

Koch S, Della Morte D, Dave KR, Sacco RL, Perez-Pinzon MA. Biomarkers for ischemic preconditioning: finding the responders. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2014 Jun;34(6):933-941.

Pacifici F, Arriga R, Sorice GP, Capuani B, Scioli MG, Pastore D, Donadel G, Bellia A, Caratelli S, Coppola A, Ferrelli F, Federici M, Sconocchia G, Tesauro M, Sbraccia P, Della Morte D, Giaccari A, Orlandi A, Lauro D. Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. *Diabetes*. 2014 Oct;63(10):3210-3220.

Palena C, Roselli M, Litzinger MT, Ferroni P, Costarelli L, Spila A, Cavaliere F, Huang B, Fernando

RI, Hamilton DH, Jochems C, Tsang KY, Cheng Q, Kim Lyerly H, Schlom J, Guadagni F. Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: association with poor prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2014 May 9;106(5).

Palmirotta R, Barbanti P, De Marchis ML, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Ialongo C, Valente MG, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. Is SOD2 Ala16Val polymorphism associated with migraine with aura phenotype? *Antioxid Redox Signal*. 2014 Oct 8. [Epub ahead of print]

Palmirotta R, Barbanti P, Ialongo C, De Marchis ML, Ludovici G, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Valente MG, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. Progesterone receptor gene Progens polymorphism correlates with late onset of migraine. *DNA Cell Biol*. 2014 Dec 10. [Epub ahead of print]

Palmirotta R, Barbanti P, Ludovici G, De Marchis ML, Ialongo C, Egeo G, Aurilia C, Fofi L, Abete P, Spila A, Ferroni P, Della Morte D, Guadagni F. Association between migraine and ACE gene(insertion/deletion) polymorphism: the BioBIM study. *Pharmacogenomics*. 2014 Feb;15(2):147-155.

Riondino S, Roselli M, Palmirotta R, Della Morte D, Ferroni P, Guadagni F. Obesity and colorectal cancer: Role of adipokines in tumor initiation and progression. *World J Gastroenterol*. 2014 May 14;20(18):5177-5190.

Roselli M, Riondino S, Mariotti S, La Farina F, Ferroni P, Guadagni F. Clinical models and biochemical predictors of VTE in lung cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2014 Sep;33(2-3):771-789.

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*. 2014 Jan;14(1):153-158.

Tiozzo E, Gardener H, Hudson BI, Dong C, Della Morte D, Crisby M, Goldberg RB, Elkind MS, Cheung YK, Wright CB, Sacco RL, Rundek T. High-density lipoprotein subfractions and carotid plaque: The Northern Manhattan study. *Atherosclerosis*. 2014 Sep 9;237(1):163-168.

Anker SD, Coats AJ, Morley JE, Rosano G, Bernabei R, von Haehling S, Kalantar-Zadeh K. Muscle wasting disease: a proposal for a new disease classification. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2014 Mar;5(1):1-3.

Armani A, Cinti F, Marzolla V, Morgan J, Cranston GA, Antelmi A, Carpinelli G, Canese R, Pagotto U, Quarta C, Malorni W, Matarrese P, Marconi M, Fabbri A, Rosano G, Cinti S, Young MJ, Caprio M. Mineralocorticoid receptor antagonism induces browning of white adipose tissue through impairment of autophagy and prevents adipocyte dysfunction in high-fat-diet-fed mice. *FASEB J*. 2014 Aug;28(8):3745-3757.

Armani A, Marzolla V, Rosano G, Caprio M.  
Mineralocorticoid vs glucocorticoid receptors: solo players or team mates in the control of adipogenesis?  
*Int J Obes (Lond)*. 2014 Dec;38(12):1580-1581.

Badagliacca R, Poscia R, Pezzuto B, Nocioni M, Mezzapesa M, Francone M, Giannetta E, Papa S, Gambardella C, Sciomer S, Volterrani M, Fedele F, Vizza CD.  
Right ventricular remodeling in idiopathic pulmonary arterial hypertension: Adaptive versus maladaptive morphology.  
*J Heart Lung Transplant*. 2014 Nov 8. [Epub ahead of print]

Butler J, Fonarow GC, Zile MR, Lam CS, Roessig L, Schelbert EB, Shah SJ, Ahmed A, Bonow RO, Cleland JG, Cody RJ, Chioncel O, Collins SP, Dunnmon P, Filippatos G, Lefkowitz MP, Marti CN, McMurray JJ, Misselwitz F, Nodari S, O'Connor C, Pfeffer MA, Pieske B, Pitt B, Rosano G, Sabbah HN, Senni M, Solomon SD, Stockbridge N, Teerlink JR, Georgiopoulou VV, Gheorghide M.  
Developing therapies for heart failure with preserved Ejection Fraction: current state and future directions.  
*JACC Heart Fail*. 2014 Apr;2(2):97-112.

Caminiti G, Cardaci V, Conti V, D'Antoni V, Murugesan J, Battaglia D, Volterrani M.  
Right ventricular systolic dysfunction is related to exercise intolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease.  
*J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2014 Oct 30. [Epub ahead of print]

Caminiti G, Fossati C, Battaglia D, Volterrani M.  
Effects of hormonal therapy in patients with heart failure.  
*Journal of Cardiology and Therapy*. 2014;1(8):168-174.

Caminiti G, Iellamo F, Manzi V, Fossati C, Cioffi V, Punzo N, Murugesan J, Volterrani M, Rosano G.  
Anabolic hormonal response to different exercise training intensities in men with chronic heart failure.  
*Int J Cardiol*. 2014 Oct 20;176(3):1433-1434.

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*. 2014 May;9(3):525-531.

Colasanti T, Vomero M, Alessandri C, Barbati C, Maselli A, Camperio C, Conti F, Tinari A, Carlo-Stella C, Tuosto L, Benincasa D, Valesini G, Malorni W, Pierdominici M, Ortona E.  
Role of alpha-synuclein in autophagy modulation of primary human T lymphocytes.  
*Cell Death Dis*. 2014 May 29;5:e1265.

de Boer RA, van der Velde AR, Mueller C, van Veldhuisen DJ, Anker SD, Peacock WF, Adams KF, Maisel A.  
Galectin-3: a modifiable risk factor in heart failure.  
*Cardiovasc Drugs Ther*. 2014 Jun;28(3):237-246.

Desarzens S, Liao WH, Mammi C, Caprio M, Faresse N.  
Hsp90 blockers inhibit adipocyte differentiation and fat mass accumulation.  
*PLoS One*. 2014 Apr 4;9(4):e94127.

Di Cola G, Jacoangeli F, Jacoangeli F, Lombardo M, Iellamo F.

Cardiovascular disorders in anorexia nervosa and potential therapeutic targets.  
*Intern Emerg Med*. 2014 Oct;9(7):717-721.

Ebner N, Földes G, Schomburg L, Renko K, Springer J, Jankowska EA, Sharma R, Genth-Zotz S, Doehner W, Anker SD, von Haehling S.  
Importance of selenium status in patients with chronic heart failure.  
*Perspectives in Science* 2014 [Epub ahead of print]

Ferraro E, Giammarioli AM, Chiandotto S, Spoletini I, Rosano G.  
Exercise-induced skeletal muscle remodeling and metabolic adaptation: redox signaling and role of autophagy.  
*Antioxid Redox Signal*. 2014 Jul 1;21(1):154-176.

Fox K, Ford I, Steg PG, Tardif JC, Tendera M, Ferrari R; SIGNIFY Investigators (Vitale C).  
Ivabradine in stable coronary artery disease without clinical heart failure.  
*N Engl J Med*. 2014 Sep 18;371(12):1091-1099.

Francone M, Chimenti C, Galea N, Scopelliti F, Verardo R, Galea R, Carbone I, Catalano C, Fedele F, Frustaci A.  
CMR sensitivity varies with clinical presentation and extent of cell necrosis in biopsy-proven acute myocarditis.  
*JACC Cardiovasc Imaging*. 2014 Mar;7(3):254-263.

Ganesh SK, Chasman DI, Larson MG, Guo X, Verwoert G, Bis JC, Gu X, Smith AV, Yang ML, Zhang Y, Ehret G, Rose LM, Hwang SJ, Papanicolau GJ, Sijbrands EJ, Rice K, Eiriksdottir G, Pihur V, Ridker PM, Vasani RS, Newton-Cheh C; Global Blood Pressure Genetics Consortium, Raffel LJ, Amin N, Rotter JI, Liu K, Launer LJ, Xu M, Caulfield M, Morrison AC, Johnson AD, Vaidya D, Dehghan A, Li G, Bouchard C, Harris TB, Zhang H, Boerwinkle E, Siscovick DS, Gao W, Uitterlinden AG, Rivadeneira F, Hofman A, Willer CJ, Franco OH, Huo Y, Witteman JC, Munroe PB, Gudnason V, Palmas W, van Duijn C, Fornage M, Levy D, Psaty BM, Chakravarti A.  
Effects of long-term averaging of quantitative blood pressure traits on the detection of genetic associations.  
*Am J Hum Genet*. 2014 Jul 3;95(1):49-65.

Gheorghide M, Vaduganathan M, Greene SJ, Mentz RJ, Adams KF Jr, Anker SD, Arnold M, Baschiera F, Cleland JG, Cotter G, Fonarow GC, Giordano C, Metra M, Misselwitz F, Mühlhofer E, Nodari S, Frank Peacock W, Pieske BM, Sabbah HN, Sato N, Shah MR, Stockbridge NL, Teerlink JR, van Veldhuisen DJ, Zaleski A, Zannad F, Butler J.  
Site selection in global clinical trials in patients hospitalized for heart failure: perceived problems and potential solutions.  
*Heart Fail Rev*. 2014 Mar;19(2):135-152.

Greene SJ, Shah AN, Butler J, Ambrosy AP, Anker SD, Chioncel O, Collins SP, Dinh W, Dunnmon PM, Fonarow GC, Lam CS, Mentz RJ, Pieske B, Roessig L, Rosano GM, Sato N, Vaduganathan M, Gheorghide M.  
Designing effective drug and device development programs for hospitalized heart failure: a proposal for pretrial registries.  
*Am Heart J*. 2014 Aug;168(2):142-149.

Iellamo F, Manzi V, Caminiti G, Vitale C, Massaro M, Cerrito A, Rosano G, Volterrani M.  
Validation of rate of perceived exertion-based exercise training in patients with heart failure: Insights from autonomic nervous system adaptations.  
*Int J Cardiol*. 2014 Sep 20;176(2):394-398.

Isidori AM, Corona G, Aversa A, Gianfrilli D, Jannini EA, Foresta C, Maggi M, Lenzi A; SIAMS-ED Study Group (Caprio M).

The SIAMS-ED trial: a national, independent, multicentre study on cardiometabolic and hormonal impairment of men with erectile dysfunction treated with Vardenafil.

Int J Endocrinol. 2014;2014:858715. Epub 2014 May 15.

Kotecha D, Holmes J, Krum H, Altman DG, Manzano L, Cleland JG, Lip GY, Coats AJ, Andersson B, Kirchhof P, von Lueder TG, Wedel H, Rosano G, Shibata MC, Rigby A, Flather MD; on behalf of the Beta-Blockers in Heart Failure Collaborative Group.

Efficacy of  $\beta$  blockers in patients with heart failure plus atrial fibrillation: an individual-patient data meta-analysis.

Lancet. 2014 Sep 2. [Epub ahead of print]

Malara NM, Givigliano F, Trunzo V, Macrina L, Raso C, Amodio N, Aprigliano S, Minniti AM, Russo V, Roveda L, Coluccio ML, Fini M, Voci P, Prati U, Di Fabrizio E, Mollace V.

In vitro expansion of tumour cells derived from blood and tumour tissue is useful to redefine personalized treatment in non-small cell lung cancer patients.

J Biol Regul Homeost Agents. 2014 Oct-Dec;28(4):717-731.

Marzolla V, Armani A, Feraco A, De Martino MU, Fabbri A, Rosano G, Caprio M.

Mineralocorticoid receptor in adipocytes and macrophages: A promising target to fight metabolic syndrome.

Steroids. 2014 Dec;91:46-53.

Mentz RJ, Greene SJ, Ambrosy AP, Vaduganathan M, Subacius HP, Swedberg K, Maggioni AP, Nodari S, Ponikowski P, Anker SD, Butler J, Gheorghiade M.

Clinical profile and prognostic value of anemia at the time of admission and discharge among patients hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction: findings from the EVEREST trial.

Circ Heart Fail. 2014 May;7(3):401-408.

Mollace V, Muscoli C, Dagostino C, Giancotti LA, Gliozzi M, Sacco I, Visalli V, Gratteri S, Palma E, Malara N, Musolino V, Carresi C, Muscoli S, Vitale C, Salvemini D, Romeo F.

The effect of peroxy-nitrite decomposition catalyst MnTBAP on aldehyde dehydrogenase-2 nitration by organic nitrates: role in nitrate tolerance.

Pharmacol Res. 2014 Nov;89:29-35.

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

Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure.

N Engl J Med. 2014 Sep 11;371(11):993-1004.

Muscoli C, Lauro F, D'Agostino C, Ilari S, Giancotti LA, Gliozzi M, Costa N, Carresi C, Musolino V, Casale F, Ventrice D, Oliverio E, Palma E, Nistico S, Procopio A, Mollace V.

Olea Europea-derived phenolic products attenuate antinociceptive morphine tolerance: an innovative strategic approach to treat cancer pain.

J Biol Regul Homeost Agents. 2014 Jan-Mar;28(1):105-116.

Nasso G, Bonifazi R, Romano V, Bartolomucci F, Rosano G, Massari F, Fattouch K, Del Prete G, Riccioni G, Del Giglio M, Speziale G.

Three-year results of repaired barlow mitral valves via right minithoracotomy versus median ster-

notomy in a randomized trial.

Cardiology. 2014 Apr 5;128(2):97-105.

Pelliccia F, Greco C, Vitale C, Rosano G, Gaudio C, Kaski JC.

Takotsubo syndrome (stress cardiomyopathy): an intriguing clinical condition in search of its identity.

Am J Med. 2014 Aug;127(8):699-704.

Pelliccia F, Patti G, Rosano G, Greco C, Gaudio C.

Efficacy and safety of eplerenone in the management of mild to moderate arterial hypertension: Systematic review and meta-analysis.

Int J Cardiol. 2014 11/15;177(1):219-228.

Pelliccia F, Rosano GM.

Medical research could soon be jeopardized by new European Union data protection regulations.

Eur Heart J. 2014 Jun 14;35(23):1503-1504.

Pelliccia F, Rosano G, Marazzi G, Vitale C, Spoletini I, Franzoni F, Speziale G, Polacco M, Greco C, Gaudio C.

Pharmacodynamic effects of atorvastatin versus rosuvastatin in coronary artery disease patients with normal platelet reactivity while on dual antiplatelet therapy-the PEARL randomized cross-over study.

Eur J Pharmacol. 2014 Feb 15;725:18-22.

Pelliccia F, Rosano G, Patti G, Volterrani M, Greco C, Gaudio C.

Efficacy and safety of mineralocorticoid receptors in mild to moderate arterial hypertension.

Int J Cardiol. 2014 Oct 24. [Epub ahead of print]

Pezzuto B, Badagliacca R, Poscia R, Ghio S, D'Alto M, Vitulo P, Mulè M, Albera C, Volterrani M, Fedele F, Vizza CD.

Circulating biomarkers in pulmonary arterial hypertension: Update and future direction.

J Heart and Lung Transplantation 2014 [Epub ahead of print]

Radke RM, Diller GP, Duck M, Orwat S, Hartmann D, Thum T, Baumgartner H.

Endothelial function in contemporary patients with repaired coarctation of aorta.

Heart. 2014 Nov 1;100(21):1696-1701.

Rosano G, Pelliccia F, Gaudio C, Coats AJ.

The challenge of performing effective medical research in the era of healthcare data protection.

Int J Cardiol. 2014 Dec 15;177(2):510-511.

Sancho M, Gortat A, Herrera AE, Andreu-Fernández V, Ferraro E, Cecconi F, Orzáez M, Pérez-Payá E.

Altered mitochondria morphology and cell metabolism in apaf1-deficient cells.

PLoS One. 2014 Jan 9;9(1):e84666.

Santi D, Giannetta E, Isidori AM, Vitale C, Aversa A, Simoni M.

Therapy of endocrine disease: effects of chronic use of phosphodiesterase inhibitors on endothelial markers in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis.

Eur J Endocrinol. 2014 Oct 2. [Epub ahead of print]

Savarese G, Dei Cas A, Rosano G, D'Amore C, Musella F, Mosca S, Reiner MF, Marchioli R, Trimar-

co B, Perrone-Filardi P.

Reduction of albumin urinary excretion is associated with reduced cardiovascular events in hypertensive and/or diabetic patients. A meta-regression analysis of 32 randomized trials. *Int J Cardiol.* 2014 Mar 15;172(2):403-410.

Savarese G, Perrone-Filardi P, D'Amore C, Vitale C, Trimarco B, Pani L, Rosano GMC. Cardiovascular effects of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in diabetic patients: A meta-analysis. *Int J Cardiol* 2014 Dec 3 [Epub ahead of print]

Savarese G, Rosano GMC, Parente A, D'Amore C, Reiner MF, Camici GG, Trimarco B, Perrone-Filardi P. Reduction of C-reactive protein is not associated with reduced cardiovascular risk and mortality in patients treated with statins. A meta-analysis of 22 randomized trials. *Int J Cardiol.* 2014 11/15;177(1):152-160.

Scuteri A, Cunha PG, Rosei EA, Badariere J, Bekaert S, Cockcroft JR, Cotter J, Cucca F, De Buyze ML, De Mayer T, Ferrucci L, Franco O, Gale N, Gillebert TC, Langlois M, Laucevicius A, Laurent S, Mattace Raso FU, Morrell CH, Muiesan ML, Munnery MM, Navickas R, Oliveira P, Orru' M, Pilia MG, Rietzschel ER, Ryliskyte L, Salvetti M, Schlessinger D, Sousa N, Stefanadis C, Strait J, Van Daele CL, Villa I, Vlachopoulos C, Wittman J, Xaplanteris P, Nilsson P, Lakatta EG; for the MARE Consortium. Arterial stiffness and influences of the metabolic syndrome: a cross-countries study. *Atherosclerosis.* 2014 Jan 30;233(2):654-660.

Scuteri A, Laurent S, Cucca F, Cockcroft J, Cunha PG, Mañas LR, Raso FU, Muiesan ML, Ryliskyte L, Rietzschel E, Strait J, Vlachopoulos C, Völzke H, Lakatta EG, Nilsson PM; for the Metabolic Syndrome and Arteries Research (MARE) Consortium. Metabolic syndrome across Europe: different clusters of risk factors. *Eur J Prev Cardiol.* 2014 Mar 19. [Epub ahead of print]

Scuteri A, Morrell CH, Orrù M, Strait JB, Tarasov KV, Ferreli LA, Loi F, Pilia MG, Delitala A, Spurgeon H, Najjar SS, AlGhatrif M, Lakatta EG. Longitudinal perspective on the conundrum of central arterial stiffness, blood pressure, and aging. *Hypertension.* 2014 Dec;64(6):1219-1227.

Scuteri A, Wang H. Pulse wave velocity as a marker of cognitive impairment in the elderly. *J Alzheimers Dis.* 2014 Jan 1;42(0):S401-10.

Shewan LG, Rosano G, Henein M, Coats AJS. A statement on ethical standards in publishing scientific articles in the international journal of cardiology family of journals. *Int J Cardiol.* 2014 1/1;170(3):253-254.

Spoletini I, Vitale C, Pelliccia F, Fossati C, Rosano GM. Androgens and cardiovascular disease in postmenopausal women: a systematic review. *Climacteric.* 2014 Dec;17(6):625-634.

Tassone EJ, Perticone M, Sciacqua A, Mafrici SF, Settino C, Malara N, Mollace V, Sesti G, Perticone F. Low dose of acetylsalicylic acid and oxidative stress-mediated endothelial dysfunction in diabetes: a short-term evaluation.

*Acta Diabetol.* 2014 Aug 6. [Epub ahead of print]

Terracciano A, Scuteri A, Strait J, Sutin AR, Meirelles O, Marongiu M, Orru M, Pilia MG, Ferrucci L, Cucca F, Schlessinger D, Lakatta E. Are personality traits associated with white-coat and masked hypertension? *J Hypertens.* 2014 Oct;32(10):1987-1992.

Terracciano A, Strait J, Scuteri A, Meirelles O, Sutin AR, Tarasov K, Ding J, Marongiu M, Orru M, Pilia MG, Cucca F, Lakatta E, Schlessinger D. Personality traits and circadian blood pressure patterns: a 7-year prospective study. *Psychosom Med.* 2014 Apr;76(3):237-243.

Vitacca M, Scalvini S, Volterrani M, Clini EM, Paneroni M, Giordano A, Ambrosino N. In COPD patients on prolonged mechanical ventilation heart rate variability during the T-piece trial is better after pressure support plus PEEP: a pilot physiological study. *Heart Lung.* 2014 Sep-Oct;43(5):420-426.

Amatore D, Sgarbanti R, Aquilano K, Baldelli S, Limongi D, Civitelli L, Nencioni L, Garaci E, Ciriolo MR, Palamara AT. Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. *Cell Microbiol.* 2014 Aug 26 [Epub ahead of print]

Civitelli L, Panella S, Marcocci ME, De Petris A, Garzoli S, Pepi F, Vavala E, Ragno R, Nencioni L, Palamara AT, Angiolella L. In vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication by *Mentha suaveolens* essential oil and its main component piperitenone oxide. *Phytomedicine.* 2014 May 15;21(6):857-865.

Frustaci A, Russo MA, Francone M, Chimenti C. Microvascular angina as prehypertrophic presentation of fabry disease cardiomyopathy. *Circulation.* 2014 Oct 21;130(17):1530-1531.

Ravenna L, Principessa L, Verdina A, Salvatori L, Russo MA, Petrangeli E. Distinct phenotypes of human prostate cancer cells associate with different adaptation to hypoxia and pro-inflammatory gene expression. *PLoS One.* 2014 May 6;9(5):e96250.

Ravenna L, Cardillo I, Curzio G, Baldi A, Mattioni M, Vincenzi B, Russo MA, Soddu S, Verdina A. Mesothelioma and hypoxia: Modulation of the inflammation-related phenotype and identification of prognostic markers. *J Cancer Sci Ther.* 2014;6(9):378-387.

Tafari M, Perrone GA, Pucci B, Russo A, Bizzarri M, Mechanick JI, Carpi A, Russo MA. Reprogramming cancer cells in endocrine-related tumors: open issues. *Curr Med Chem.* 2014;21(9):1146-1151

Conte MP, Longhi C, Marazzato M, Conte AL, Aleandri M, Lepanto MS, Zagaglia C, Nicoletti M, Aloisi M, Totino V, Palamara AT, Schippa S. Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res Notes.* 2014 Oct 22;7:748.

Sgarbanti R, Amatore D, Celestino I, Marcocci ME, Fraternali A, Ciriolo MR, Magnani M, Saladino R, Garaci E, Palamara AT, Nencioni L.  
Intracellular redox state as target for anti-influenza therapy: are antioxidants always effective?  
Curr Top Med Chem. 2014;14(22):2529-2541.



### LINEA 3

## SVILUPPO DI SISTEMI INNOVATIVI PER IL MONITORAGGIO ED IL CONTROLLO DEL- LA RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Alzetta R, Cesario A, Fini M.

Hyper-longevity, a late-modern paradigm for understanding longevity, ageing and their complexities in western developed globalised countries.

Curr Pharm Des. 2014;20(38):5921-5927.

Aleksovska K, Leoncini E, Bonassi S, Cesario A, Boccia S, Frustaci A.

Systematic review and meta-analysis of circulating S100B blood levels in schizophrenia.

PLoS One. 2014 Sep 9;9(9):e106342. eCollection 2014.

Altavista MC, Cassetta E, Brusa L, Viselli F, Denaro A, Ventriglia M, Pasqualetti P, Peppe A. Wearing-off detection in clinical practice: The wearing off real practice key (WORK-PD) study in Parkinson's disease.

Parkinsonism Relat Disord 2014. [Epub ahead of print]

Boccardi M, Bocchetta M, Apostolova LG, Barnes J, Bartzokis G, Corbetta G, DeCarli C, deTolledo-Morrell L, Firbank M, Ganzola R, Gerritsen L, Henneman W, Killiany RJ, Malykhin N, Pasqualetti P, Pruessner JC, Redolfi A, Robitaille N, Soininen H, Tolomeo D, Wang L, Watson C, Wolf H, Duvernoy H, Duchesne S, Jack CR Jr, Frisoni GB; for the EADC-ADNI Working Group on the Harmonized Protocol for Manual Hippocampal Segmentation.

Delphi definition of the EADC-ADNI Harmonized Protocol for hippocampal segmentation on magnetic resonance.

Alzheimers Dement. 2014 Aug 14.[Epub ahead of print]

Bocchetta M, Boccardi M, Ganzola R, Apostolova LG, Preboske G, Wolf D, Ferrari C, Pasqualetti P, Robitaille N, Duchesne S, Jack CR Jr, Frisoni GB; EADC-ADNI Working Group on The Harmonized Protocol for Manual Hippocampal Segmentation and the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.

Harmonized benchmark labels of the hippocampus on magnetic resonance: The EADC-ADNI project.

Alzheimers Dement. 2014 Sep 12. [Epub ahead of print]

Boccia S, Mc Kee M, Adany R, Boffetta P, Burton H, Cambon-Thomsen A, Cornel MC, Gray M, Jani A, Maria Knoppers B, Khoury MJ, Meslin EM, Van Duijn CM, Villari P, Zimmern R, Cesario A, Puggina A, Colotto M, Ricciardi W.

Beyond public health genomics: proposals from an international working group.

Eur J Public Health. 2014 Dec;24(6):876-878. Epub 2014 Aug 27.

European Innovation Partnership on Active and Healthy Ageing, Action Plan B3; Mechanisms of the Development of Allergy, WP 10; Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases, Bousquet J, Addis A, Adcock I, Agache I, Agusti A, Alonso A, Annesi-Maesano I, Anto JM, Bachert C, Baena-Cagnani CE, Bai C, Baigenzhin A, Barbara C, Barnes PJ, Bateman ED, Beck L, Bedbrook A, Bel EH, Benezet O, Bennoor KS, Benson M, Bernabeu-Wittel M, Bewick M, Bindeslev-Jensen C, Blain H, Blasi F, Bonini M, Bonini S, Boulet LP, Bourdin A, Bourret R, Bousquet PJ, Brightling CE, Briggs A, Brozek J, Buhl R, Bush A, Caimmi D, Calderon M, Calverley P, Camargos PA, Camuzat T, Canonica GW, Carlsen KH, Casale TB, Cazzola M, Cepeda Sarabia AM, Cesario A, et al.

Integrated care pathways for airway diseases (AIRWAYS-ICPs).

Eur Respir J. 2014 Aug;44(2):304-323.

Bousquet J, Jorgensen C, Dauzat M, Cesario A, Camuzat T, Bourret R, Best N, Anto JM, Abecassis F, Aubas P, Avignon A, Badin M, Bedbrook A, Blain H, Bourdin A, Bringer J, Camu W, Cayla G, Costa DJ, Courtet P, Cristol JP, Demoly P, de la Coussaye JE, Fesler P, Gouzi F, Gris JC, Guillot B, Hayot M, Jeandel C, Jonquet O, Journot L, Lehmann S, Mathieu G, Morel J, Ninot G, Pelissier

J, Picot MC, Radier-Pontal F, Robine JM, Rodier M, Roubille F, Sultan A, Wojtusciszyn A, Auffray C, Balling R, Barbara C, Cambon-Thomsen A, Chavannes NH, Chuchalin A, Crooks G, Dedeu A, Fabbri LM, Garcia-Aymerich J, Hajjam J, Gomes EM, Palkonen S, Piette F, Pison C, Price D, Samolinski B, Schunemann HJ, Sterk PJ, Yiallourous P, Roca J, Perre PV, Mercier J.

Systems medicine approaches for the definition of complex phenotypes in chronic diseases and ageing. From concept to implementation and policies.

Curr Pharm Des. 2014;20(38):5928-5944.

Calzetta L, Bonassi S, Dall'Armi V, Pasqua F, Cesario A.

A dutch research protocol on advance care planning in COPD patients: A critical revision.

BMJ Open. 2014 20 March 2014

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

Brain natriuretic peptide protects against hyperresponsiveness 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, Rogliani P, Cazzola M, Matera MG.

Advances in asthma drug discovery: evaluating the potential of nasal cell sampling and beyond.

Expert Opin Drug Discov. 2014 Jun;9(6):595-607.

Calzetta L, Rossi P, Bove P, Alfonsi P, Bonizzi L, Roncada P, Bernardini R, Ricciardi E, Montuori M, Pistocchini E, Mauti P, Mattei M.

A novel and effective balanced intravenous-inhalant anaesthetic protocol in Swine by using unrestricted drugs.

Exp Anim. 2014 Oct 30;63(4):423-433.

Cazzola M, Calzetta L, Page CP, Matera MG.

Use of indacaterol for the treatment of COPD: a pharmacokinetic evaluation.

Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2014 Jan;10(1):129-137.

Cazzola M, Calzetta L, Page CP, Rogliani P, Facciolo F, Gavaldà A, Matera MG.

Pharmacological characterization of the interaction between acridinium bromide and formoterol fumarate on human isolated bronchi.

Eur J Pharmacol. 2014 Dec 15;745:135-143.

Cazzola M, Calzetta L, Segreti A, Facciolo F, Rogliani P, Matera MG.

Translational study searching for synergy between Glycopyrronium and Indacaterol.

COPD. 2014 Sep 15. [Epub ahead of print]

Coelho P, García-Lestón J, Costa S, Costa C, Silva S, Fuchs D, Geisler S, Dall'Armi V, Zoffoli R, Bonassi S, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP.

Immunological alterations in individuals exposed to metal(loid)s in the Panasqueira mining area, Central Portugal.

Sci Total Environ. 2014 Mar 15;475:1-7. Epub 2014 Jan 11.

Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhawan A, Benzies 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 Rev Mutat Res. 2014 Jan-Mar;759:27-39.

Costa C, García-Lestón J, Costa S, Coelho P, Silva S, Pingarilho M, Valdiglesias V, Mattei F, Dall'Ar-

mi V, Bonassi S, Laffon B, Snawder J, Teixeira JP.  
Is organic farming safer to farmers' health? A comparison between organic and traditional farming.  
*Toxicol Lett.* 2014 Oct 15;230(2):166-176.

Del Bufalo A, Cesario A, Salinaro G, Fini M, Russo P.  
Alpha9 alpha10 nicotinic acetylcholine receptors as target for the treatment of chronic pain.  
*Curr Pharm Des.* 2014;20(38):6042-6047.

Del Bufalo A, Russo P, Milic M, Pristipino C, Fini M, Cesario A.  
Systems biology and systems medicine: the technological tools of the system approaches to complexity.  
*Med Chem.* 2014;4:473-480.

De Vito C, Angeloni C, De Feo E, Marzuillo C, Lattanzi A, Ricciardi W, Villari P, Boccia S.  
A large cross-sectional survey investigating the knowledge of cervical cancer risk aetiology and the predictors of the adherence to cervical cancer screening related to mass media campaign.  
*BioMed Research International.* 2014. Epub 2014 Jun 12.

Filippini P, Rutella S.  
Recent advances on cellular therapies and immune modulators for graft-versus-host disease.  
*Expert Rev Clin Immunol.* 2014 Oct;10(10):1357-1374.

Frisoni GB, Jack CR, Bocchetta M, Bauer C, Frederiksen KS, Liu Y, Preboske G, Swihart T, Blair M, Cavado E, Grothe MJ, Lanfredi M, Martinez O, Nishikawa M, Portegies M, Stoub T, Ward C, Apostolova LG, Ganzola R, Wolf D, Barkhof F, Bartzokis G, DeCarli C, Csernansky JG, deToledo-Morrell L, Geerlings MI, Kaye J, Killiany RJ, Lehericy S, Matsuda H, O'Brien J, Silbert LC, Scheltens P, Soinen H, Teipel S, Waldemar G, Fellgiebel A, Barnes J, Firbank M, Gerritsen L, Henneman W, Malykhin N, Pruessner JC, Wang L, Watson C, Wolf H, deLeon M, Pantel J, Ferrari C, Bosco P, Pasqualetti P, Duchesne S, Duvernoy H, Boccardi M; EADC -European Alzheimer's Disease Consortium and the ADNI - Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.  
The EADC-ADNI Harmonized Protocol for manual hippocampal segmentation on magnetic resonance: Evidence of validity.  
*Alzheimers Dement.* 2014 Sep 27.

Galeone C, Edefonti V, Parpinel M, Leoncini E, Matsuo K, Talamini R, Olshan AF, Zevallos JP, Winn DM, Jayaprakash V, Moysich K, Zhang ZF, Morgenstern H, Levi F, Bosetti C, Kelsey K, McClean M, Schantz S, Yu GP, Boffetta P, Amy Lee YC, Hashibe M, La Vecchia C, Boccia S.  
Folate intake and the risk of oral cavity and pharyngeal cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium.  
*Int J Cancer.* 2014 Jun 26. [Epub ahead of print]

Giannetta E, Feola T, Gianfrilli D, Pofi R, Dall'Armi V, Badagliacca R, Barbagallo F, Lenzi A, Isidori AM.  
Is chronic inhibition of phosphodiesterase type 5 cardioprotective and safe? A meta-analysis of randomized controlled trials.  
*BMC Med.* 2014 Oct 20;12(1):185.

Kim CH, Lee YC, Hung RJ, McNallan SR, Cote ML, Lim WY, Chang SC, Kim JH, Ugolini D, Chen Y, Liloglou T, Andrew AS, Onega T, Duell EJ, Field JK, Lazarus P, Le Marchand L, Neri M, Vineis P, Kiyohara C, Hong YC, Morgenstern H, Matsuo K, Tajima K, Christiani DC, McLaughlin JR, Bencko V, Holcatova I, Boffetta P, Brennan P, Fabianova E, Foretova L, Janout V, Lissowska J, Mates D,

Rudnai P, Szeszenia-Dabrowska N, Mukeria A, Zaridze D, Seow A, Schwartz AG, Yang P, Zhang ZF.  
Exposure to secondhand tobacco smoke and lung cancer by histological type: a pooled analysis of the International Lung Cancer Consortium (ILCCO).  
*Int J Cancer.* 2014 Oct 15;135(8):1918-1930.

Kirsch-Volders M, Bonassi S, Knasmueller S, Holland N, Bolognesi C, Fenech MF.  
Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective.  
*Mutat Res Rev Mutat Res.* 2014 Jan-Mar;759:49-58.

Landi D, Maggio P, Lupoi D, Palazzo P, Altamura C, Falato E, Altavilla R, Vollaro S, Coniglio AD, Tibuzzi F, Passarelli F, Silvestrini M, Pasqualetti P, Vernieri F.  
Cortical ischemic lesion burden measured by DIR is related to carotid artery disease severity.  
*Cerebrovasc Dis.* 2014 Dec 24;39(1):23-30.

Larghi A, Lococo F, Mainenti S, Petrone G, Cesario A, Granone P, Scambia G, Costamagna G.  
EUS-guided fine needle tissue acquisition for the diagnosis of pleural metastases from endometrial cancer.  
*Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014 May;18(9):1379-1382.

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.* 2014 Jan;29(1):35-48.

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.* 2014 Jan;9(1):97-108.

Leuzzi G, Meacci E, Cusumano G, Cesario A, Chiappetta M, Dall'Armi V, Evoli A, Costa R, Lococo F, Primieri P, Margaritora S, Granone P.  
Thymectomy in myasthenia gravis: proposal for a predictive score of postoperative myasthenic crisis.  
*Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Apr;45(4):e76-88.

Leuzzi G, Nachira D, Cesario A, Novellis P, Petracca Ciavarella L, Lococo F, Facciolo F, Granone P, Margaritora S.  
Chest wall tumors and prosthetic reconstruction: A comparative analysis on functional outcome.  
*Thoracic Cancer.* 2014 [Epub ahead of print]

Lipsi R, Rogliani P, Calzetta L, Segreti A, Cazzola M.  
The clinical use of regenerative therapy in COPD.  
*Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2014 Dec 12;9:1389-1396.

Lococo F, 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.* 2014 Jun;45(6):1115-1116.

Lococo F, Cesario A, Paci M, Filice A, Versari A, Rapicetta C, Ricchetti T, Sgarbi G, Alifano M, Cavazza A, Treglia G.  
PET/CT assessment of neuroendocrine tumors of the lung with special emphasis on bronchial carcinoids.  
*Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):8369-8377.

Lococo F, Bobbio A, Villard M, Cesario A, Magdeleinat P, Alifano M, Regnard JF.  
Is a surgical procedure really contraindicated in spontaneous pneumothorax patients who have undergone prior contralateral pneumonectomy?  
*Ann Thorac Surg.* 2014 May;97(5):1855-1856.

Lococo F, Cesario A, de Franco S, Ricchetti T, Sgarbi G, Treglia G.  
Is 18FDG PET/CT evaluation really useful in the diagnosis of elastofibroma dorsi?  
*Rev Esp Med Nucl Imagen Mol.* 2014 Jan-Feb;33(1):62.

Lococo F, Cesario A, Margaritora S, Apolone G, Cavuto S, Leuzzi G, Pasqua F, Cardaci V, Ciavarella LP, Granone P.  
Time-trend analysis of the pulmonary function after surgical treatment for esophageal cancer.  
*Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(21):3189-3198.

Lococo F, Treglia G, Cesario A, Paci M, Filice A, Versari A, Filosso PL.  
Functional imaging evaluation in the detection, diagnosis and histologic differentiation of pulmonary neuroendocrine tumors.  
*Thorac Surg Clin.* 2014 Aug;24(3):285-292.

Marzetti E, Lorenzi M, Antocicco M, Bonassi S, Celi M, Mastropaolo S, Settanni S, Valdiglesias V, Landi F, Bernabei R, Onder G.  
Shorter telomeres in peripheral blood mononuclear cells from older persons with sarcopenia: Results from an exploratory study.  
*Frontiers in Aging Neuroscience.* 2014;6(233)

Matera MG, Calzetta L, Rogliani P, Cesario A, Cazzola M.  
New Treatments for COPD in the elderly.  
*Curr Pharm Des.* 2014;20(38):5968-5982.

Matera MG, Rogliani P, Calzetta L, Cazzola M.  
Phosphodiesterase inhibitors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease: what does the future hold?  
*Drugs.* 2014 Oct 10. [Epub ahead of print] PubMed

Mazzucco W, Rossi M, Cusimano R, Franchi M, Bonifazi M, Mistretta A, Vitale F, Ricciardi W, Negri E, Boccia S, La Vecchia C.  
Use of trastuzumab for breast cancer: the role of age.  
*Curr Pharm Des.* 2014;20(38):5957-5962.

Miele L, Dall'Armi V, Cefalo C, Nedovic B, Arzani D, Amore R, Rapaccini G, Gasbarrini A, Ricciardi

W, Grieco A, Boccia S.  
A case-control study on the effect of metabolic gene polymorphisms, nutrition, and their interaction on the risk of non-alcoholic fatty liver disease.  
*Genes Nutr.* 2014 Mar;9(2):383.

Panic N, Mastrostefano E, Leoncini E, Persiani R, Arzani D, Amore R, Ricci R, Sicoli F, Sioletic S, Bulajic M, Ugo DD, Ricciardi W, Boccia S.  
Susceptibility to *Helicobacter pylori* infection: results of an epidemiological investigation among gastric cancer patients.  
*Mol Biol Rep.* 2014 Jun;41(6):3637-3650.

Panic N, Leoncini E, Di Giannantonio P, Simone B, Silenzi A, Ferriero AM, Falvo R, Silvestrini G, Cadeddu C, Marzuillo C, De Vito C, Ricciardi W, Villari P, Boccia S.  
Survey on knowledge, attitudes, and training needs of Italian residents on genetic tests for hereditary breast and colorectal cancer.  
*Biomed Res Int.* 2014;2014:418416. Epub 2014 Jun 23.

Paone G, Conti V, Biondi-Zoccai G, De Falco E, Chimenti I, Peruzzi M, Mollica C, Monaco G, Giannunzio G, Brunetti G, Schmid G, Ranieri VM, Frati G.  
Long-term home noninvasive mechanical ventilation increases systemic inflammatory response in chronic obstructive pulmonary disease: a prospective observational study.  
*Mediators Inflamm.* 2014.

Pelucchi C, Lunet N, Boccia S, Zhang ZF, Praud D, Boffetta P, Levi F, Matsuo K, Ito H, Hu J, Johnson KC, Ferraroni M, Yu GP, Peleteiro B, Malekzadeh R, Derakhshan MH, Ye W, Zaridze D, Maximovitch D, Aragonés N, Martín V, Pakseresht M, Pourfarzi F, Bellavia A, Orsini N, Wolk A, Mu L, Arzani D, Kurtz RC, Lagiou P, Trichopoulos D, Muscat J, La Vecchia C, Negri E.  
The stomach cancer pooling (StoP) project: study design and presentation.  
*Eur J Cancer Prev.* 2014 Feb 20. [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.  
*Eur J Surg Oncol.* 2014 Mar;40(3):345-351.

Rogliani P, Calzetta L, Segreti A, Barrile A, Cazzola M.  
Diabetes mellitus among outpatients with COPD attending a university hospital.  
*Acta Diabetol.* 2014 Dec;51(6):933-940.

Rossi P, Bove P, Montuori M, De Majo A, Ricciardi E, Mattei M, Bernardini R, Calzetta L, Mauti P, Intini L, Quattrini V, Chiaramonte C, Vespasiani G.  
Partial nephrectomy using radiofrequency incremental bipolar generator with multi electrode probe: experimental study in bench pig kidneys.  
*BMC Urol.* 2014 Jan 10;14:7.

Rossi A, Guerriero M, Corrado A; OPTIMO/AIPO Study Group (Pasqua F collaboratore).  
Withdrawal of inhaled corticosteroids can be safe in COPD patients at low risk of exacerbation: a real-life study on the appropriateness of treatment in moderate COPD patients (OPTIMO).  
*Respir Res.* 2014 Jul 8;15:77.

Rota M, Bosetti C, Boccia S, Boffetta P, La Vecchia C.  
Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons and respiratory and urinary tract



cancers: an updated systematic review and a meta-analysis to 2014.  
Arch Toxicol. 2014 Aug;88(8):1479-1490.

Russo P, Del Bufalo A, Frustaci A, Fini M, Cesario A.  
Beyond acetylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's Disease:  $\alpha 7$ -nAChR agonists in human clinical trials.  
Curr Pharm Des. 2014;20(38):6014-6021.

Russo P, Del Bufalo A, Milic M, Salinaro G, Fini M, Cesario A.  
Cholinergic receptors as target for cancer therapy in a systems medicine perspective.  
Curr Mol Med. 2014;14(9):1126-1138.

Russo P, Fini M, Cesario A.  
Editorial: disease control and active and healthy ageing: new paradigms of therapeutic strategy.  
Curr Pharm Des. 2014;20(38):5919-5920.

Segreti A, Calzetta L, Rogliani P, Cazzola M.  
Umeclidinium for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease.  
Expert Rev Respir Med. 2014 Dec;8(6):665-671.

Tufegdžić M, Panic N, Boccia S, Malerba S, Bulajić M, La Vecchia C, Sljivić A, Trbojević-Stanković J, Krstić M.  
The weekend effect in patients hospitalized for upper gastrointestinal bleeding: a single-center 10-year experience.  
Eur J Gastroenterol Hepatol. 2014 Jul;26(7):715-720.

Ugolini D, Bonassi S, Cristaudo A, Leoncini G, Ratto GB, Neri M.  
Temporal trend, geographic distribution, and publication quality in asbestos research.  
Environ Sci Pollut Res Int. 2014 Dec 6. [Epub ahead of print]

Ugolini D, Casanova G, Ceppi M, Mattei F, Neri M.  
Familiarity of physicians, translational researchers, nurses, and other health professionals with evidence-based medicine terms and resources.  
J Cancer Educ. 2014 Sep;29(3):514-521.



## LINEA 4

# LE DISABILITÀ DELLO SVILUPPO E NEURORIABILITAZIONE PEDIATRICA

Albani G, Cimolin V, Fasano A, Trotti C, Galli M, Mauro A.  
"Masters and servants" in parkinsonian gait: a three-dimensional analysis of biomechanical changes sensitive to disease progression.  
Funct Neurol. 2014; 29(2): 99-105.

Ancillao A, Galli M, Rigoldi C, Albertini G.  
Linear correlation between fractal dimension of surface EMG signal from rectus femoris and height of vertical jump.  
Chaos, Solitons & Fractals. 2014 9;66(0):120-126.

Cau N, Cimolin V, Galli M, Precilios H, Tacchini E, Santovito C, Capodaglio P.  
Center of pressure displacements during gait initiation in individuals with obesity.  
J Neuro Eng and Rehab. 2014;11(1):82.

Cimolin V, Galli M.  
Summary measures for clinical gait analysis: a literature review.  
Gait Posture. 2014 Apr;39(4):1005-1010.

Cimolin V, Galli M, Celletti C, Pau M, Castori M, Morico G, Albertini G, Camerota F.  
Foot type analysis based on electronic pedobarography data in individuals with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type during upright standing.  
J Am Podiatr Med Assoc. 2014 Nov;104(6):588-593.

Cimolin V, Galli M, Vismara L, Albertini G, Sartorio A, Capodaglio P.  
Gait pattern in lean and obese adolescents.  
Int J Rehabil Res. 2014 Oct 16. [Epub ahead of print]

Cimolin V, Vismara L, Galli M, Grugni G, Cau N, Capodaglio P.  
Gait strategy in genetically obese patients: A 7-year follow up.  
Res Dev Disabil. 2014 Apr 21;35(7):1501-1506.

Duarte N, Grecco LA, Galli M, Fregni F, Oliveira CS.  
Effect of transcranial direct-current stimulation combined with treadmill training on balance and functional performance in children with cerebral palsy: a double-blind randomized controlled trial.  
PLoS One. 2014 Aug 29;9(8):e105777.

Ferreira LA, Cimolin V, Costici PF, Albertini G, Oliveira CS, Galli M.  
Effects of gastrocnemius fascia lengthening on gait pattern in children with cerebral palsy using the Gait Profile Score.  
Res Dev Disabil. 2014 May;35(5):1137-1143.

Galli M, Cimolin V, Rigoldi C, Condoluci C, Albertini G.  
Effects of obesity on gait pattern in young individuals with Down syndrome.  
Int J Rehabil Res. 2014 Nov 21. [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.  
J Intellect Disabil Res. 2014 Aug;58(8):758-764.

Grecco LA, Duarte Nde A, Mendonça ME, Cimolin V, Galli M, Fregni F, Oliveira CS.  
Transcranial direct current stimulation during treadmill training in children with cerebral palsy: A

randomized controlled double-blind clinical trial.  
Res Dev Disabil. 2014 Nov;35(11):2840-2848.

Pau M, Coghe G, Atzeni C, Corona F, Pilloni G, Marrosu MG, Cocco E, Galli M.  
Novel characterization of gait impairments in people with multiple sclerosis by means of the gait profile score.  
J Neurol Sci. 2014 Oct 15;345(1-2):159-163.

Rigoldi C, Galli M, Mainardi L, Albertini G.  
Evaluation of posture signal using entropy analysis and fractal dimension in adults with Down syndrome.  
Comput Methods Biomech Biomed Engin. 2014 Apr;17(5):474-479.

Romano A, Albertini G, Guida D, Cornia R, Settecasì C, Condoluci C, Moraschi M, Fantozzi LM, Bozzao A, Pierallini A.  
A cervical flexion-extension MRI study in Down syndrome.  
Indian J Pediatr. 2014 Sep 2. [Epub ahead of print]

Salami F, Vimercati SL, Rigoldi C, Taebi A, Albertini G, Galli M.  
Mechanical energy assessment of adult with Down syndrome during walking with obstacle avoidance.  
Res Dev Disabil. 2014 Aug;35(8):1856-1862.

Siniscalchi A, Scaglione F, Sanzaro E, Iemolo F, Albertini G, Quirino G, Manes MT, Gratteri S, Mercuri NB, De Sarro G, Gallelli L.  
Effects of phenobarbital and levetiracetam on PR and QTc intervals in patients with post-stroke seizure.  
Clin Drug Investig. 2014 Dec;34(12):879-886.

Vimercati SL, Galli M, Stella G, Caiazza G, Ancillao A, Albertini G.  
Clumsiness in fine motor tasks: evidence from the quantitative drawing evaluation of children with Down syndrome.  
J Intellect Disabil Res. 2014 Apr 28. [Epub ahead of print]

## LINEA 5

# MODELLI ORGANIZZATIVI E GESTIONALI DELLE DISABILITÀ IN RIABILITAZIONE

- Onder G, Bonassi S, Abbatecola AM, Folino-Gallo P, Lapi F, Marchionni N, Pani L, Pecorelli S, San-  
carlo D, Scuteri A, Trifirò G, Vitale C, Zuccaro SM, Bernabei R, Fini M; Geriatrics Working Group  
of the Italian Medicines Agency.  
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. 2014 Apr;69(4):430-437.
- Onder G, Vetrano DL, Cherubini A, Fini M, Mannucci PM, Marengoni A, Monaco A, Nobili A, Pe-  
corelli S, Russo P, Vitale C, Bernabei R.  
Prescription drug use among older adults in Italy: a country-wide perspective.  
J Am Med Dir Assoc. 2014 Jul;15(7):531.e11-5.
- Franchi C, Mari D, Tettamanti M, Pasina L, Djade CD, Mannucci PM, Onder G, Bernabei R, Gusso-  
ni G, Bonassi S, Nobili A; ELICADHE Investigators.  
E-learning to improve the drug prescribing in the hospitalized elderly patients: the ELICADHE  
feasibility pilot study.  
Aging Clin Exp Res. 2014 Aug;26(4):435-443.
- Bettoncelli G, Blasi F, Brusasco V, Centanni S, Corrado A, De Benedetto F, De Michele F, Di Maria  
G, Donner C, Falcone F, Mereu C, Nardini S, Pasqua F, Polverino M, Rossi A, Sanguinetti C.  
The clinical and integrated management of COPD.  
An official document of AIMAR (Interdisciplinary Association for Research in Lung Disease), AIPO  
(Italian Association of Hospital Pulmonologists), SIMER (Italian Society of Respiratory Medicine),  
SIMG (Italian Society of General Medicine).  
Multidisciplinary Respiratory Medicine. 2014;9(1):25.

## PUBBLICAZIONI SU RIVISTE SENZA IMPACT FACTOR

Reichmann H, Martínez-Martin P, Stocchi F.  
Effect of therapeutic interventions on health-related quality of life in parkinson's disease.  
Eur Neurol Review, 2014;9(1):19-26.

Stocchi F.  
Editorial neuroprotection: Why it remains an unmet need.  
Focus on Parkinson's Disease 2014;24(1):1-3.

Stocchi F, Martinez-Martin P, Reichmann.  
Quality of life in Parkinson's Disease – patient, clinical and research perspectives.  
Eur Neurol Review 2014;9(1):12-18.

Frustaci A, Chimenti C.  
Immunosuppressive therapy in virus-negative inflammatory cardiomyopathy.  
Heart and metabolism. 2014/06/03(62):18-21.

Gigliuto C, De Gregori M, Malafoglia V, Raffaelli W, Compagnone C, Visai L, Petrini P, Avanzini MA, Muscoli C, Viganò J, Calabrese F, Dominiononi T, Allegri M, Cobianchi L.  
Pain assessment in animal models: Do we need further studies?  
J of Pain Res. 2014;2014(7):227-236.

Gliozzi M, Carresi C, Musolino V, Palma E, Muscoli C, Vitale C, Gratteri S, Muscianisi G, Janda E, Muscoli S, Romeo F, Ragusa S, Mollace R, Walker R, Ehrlich J, Mollace V.  
The effect of bergamot-derived polyphenolic fraction on LDL small dense particles and non alcoholic fatty liver disease in patients with metabolic syndrome.  
Adv in Biological Chemistry. 2014;04(02):129-137.

Massaro R, Caminiti G, Tulli A, Fossati C, Volterrani M, Fini M, Rosano GMC.  
Intensive cardiac rehabilitation improves glucometabolic state of non-diabetic patients with recent coronary artery bypass grafting.  
IJC Metabolic & Endocrine. 2014 6;3(0):20-24.

Paoloni M, Tavernese E, Ioppolo F, Fini M, Santilli V.  
Complete remission of plantar fasciitis with a gluten-free diet: relationship or just coincidence?  
Foot (Edinb). 2014 Sep;24(3):140-142.

Rosano G, Vitale C, Spoletini I, Volterrani M.  
Clinical utility of ivabradine in cardiovascular disease management.  
Current status Research Reports in Clinical Cardiology. 2014;2014(5):183-187.

Quattrino S, Campolongo G, Marazzi G, Cataldi C, Sposato B, Volterrani M.  
Nebivolol–An effective weapon in our therapeutical arsenal.  
Journal of Symptoms and Signs. 2014;3(4):309-313.

Tramarin R, Polverino M, Volterrani M, Girardi B, Chimini C, Ambrosino N, De Benedetto F, Proto C.  
ISMAR-study presentation: in-hospital epidemiology and clinical management of respiratory and cardiac comorbidities in cardiac and respiratory disease units.  
Multidisc Respir Med. 2014 May 20;9(1):28.

Vignetti M, Fazi P, la Sala A, Mandelli F.  
Treatment of philadelphia-positive acute lymphoid leukemia.

Int J Hematol Oncol. 2014 02/01; 2014/03;3(1):71-83.

Vitiello L, Spoletini I, Gorini S, Pontecorvo L, Ferrari D, Ferraro E, Stabile E, Caprio M, la Sala A. Microvascular inflammation in atherosclerosis. IJC Metabolic & Endocrine. 2014 6;3(0):1-7.

Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Glutathione: new roles in redox signalling for an old antioxidant. Front Pharmacol. 2014 Aug 26;5:196.

Piacentini R, De Chiara G, Li Puma DD, Ripoli C, Marcocci ME, Garaci E, Palamara AT, Grassi C. HSV-1 and Alzheimer's disease: more than a hypothesis. Front Pharmacol. 2014 May 7;5:97. Review.

Rizza S, Montagna C, Di Giacomo G, Cirotti C, Filomeni G. S-nitrosation and ubiquitin-proteasome system interplay in neuromuscular disorders. Int J Cell Biol. 2014. Epub 2014 Jan 30. Review.

Russo MA, Sansone L, Polletta L, Runci A, Rashid MM, Santis ED, Vernucci E, Carnevale I, Tafani M. Sirtuins and resveratrol-derived compounds: a model for understanding the beneficial effects of the mediterranean diet. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2014;14(4):300-308.

Capuani B, Pacifici F, Pastore D, Guadagni F, Donadel G, Palmirotta R, Sbraccia P, Lauro D, Della Morte D. Cellular repair and reversal of aging: The role of NAD. CellR4. 2014;2(2):e852.

Palmirotta R, De Marchis ML, Ludovici G, Ferroni P, Abete P, Guadagni F, Della-Morte D. Diagnostic procedures for paraffin-embedded tissues analysis in pharmacogenomic studies. Methods Mol Biol. 2014;1175:45-65.

Pignatello R, Leonardi A, Petronio G, Ruozi B, Puglisi G, Furneri PM. Preparation and microbiological evaluation of amphiphilic kanamycin-lipoamino acid ion-pairs. Antibiotics 2014, 3, 216-232.

Cardinale A, Chiesa R, Sierks M. Protein misfolding and neurodegenerative diseases. Int J Cell Biol. 2014;2014:217371.

Ates S, Leon B, Basteris A, Nijenhuis S, Nasr N, Sale P, Cesario A, Amirabdollahian F, Stienen AHA. Technical evaluation of and clinical experiences with the SCRIPT passive wrist and hand orthosis. In: Human System Interactions (HSI), 2014 7th International Conference ; 188-193.

Camerota F, Galli M, Cimolin V, Celletti C, Ancillao A, Blow D, Albertini G. The effects of neuromuscular taping on gait walking strategy in a patient with joint hypermobility syndrome/Ehlers-Danlos syndrome hypermobility type. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease. 2014 December 23 [Epub ahead of print]

Bettoncelli G, Blasi F, Brusasco V, Centanni S, Corrado A, De Benedetto F, De Michele F, Di Ma-

ria GU, Donner CF, Falcone F, Mereu C, Nardini S, Pasqua F, Polverino M, Rossi A, Sanguinetti C. La gestione clinica integrata della BPCO.

Rivista Società Italiana di Medicina Generale. 2014(1):5-19.

Erdol S, Mazzucco W, Boccia S. Cost effectiveness analysis of childhood obesity primary prevention programmes: A systematic review. Epidemiology, Biostatistics and Public Health. 2014;11(3):e9416-1.

Frustaci A, Bonassi S, Fini M. La gestione clinica dell'anziano complesso. La continuità ospedale-territorio. Giornale Italiano di Farmacoeconomia e Farmacoutilizzazione. 2014;6(3):69-74.

Mendes A, Bonassi S, Aguiar L, Pereira C, Neves P, Silva S, Mendes D, Guimarães L, Moroni R, Teixeira JP. Indoor air quality and thermal comfort in elderly care centers. Urban Climate 2014 [Epub ahead of print]

Nedovic B, Posteraro B, Leoncini E, Ruggeri A, Amore R, Sanguinetti M, Ricciardi W, Boccia S. Mannose-binding lectin codon 54 gene polymorphism and vulvovaginal candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Biomed Res Int. 2014. Epub 2014 Jan 6. Review.

Rai S, Ray H, Pan J, Barnes C, Cambon A, Wu X, Bonassi S, Srivastava D. Phase II clinical trials: issues and practices. Biometrics & Biostatistics Int J. 2014;1(2):00008.

**LIBRI E CAPITOLI DI LIBRI**

Nicola Cuomo, Gianni Biondi, Giorgio Albertini  
X fragile... il filo di Arianna e i labirinti.  
ETS Editore

Spoletini I, Vitale C, Rosano GM.  
Target organ damage and RAAS Blockade In: ACEi and ARBS in Hypertension and Heart Failure.  
Springer International Publishing; 2015; p. 119-148.

## PARTECIPAZIONI A CONGRESSI NAZIONALI ED INTERNAZIONALI

- Franceschini M. Intervento: "Il problema dell'assessment nel trattamento robot assistito: il protocollo di minima", Update sulla riabilitazione del Cammino con Robot, Monza, Febbraio 2014
- Franceschini M. Intervento: "I pattern di spasticità", 4° Corso di Riabilitazione e Neurofisiologia Clinica, Abano Terme, Marzo 2014
- Franceschini M. Coordinamento e Direzione del corso: "I.S.P.R.M. - Educational Committee "Rehabilitation of spinal cord injury patients" - Web Education draft, Aprile 2014
- Franceschini M. Interventi:
  - "Clinical assessment for robot therapy in stroke patients: a common language for physicians, therapists and researchers";
  - "Update in Gait Robotic Rehabilitation in people with Spinal Cord Injury";
 8° Congresso della Società Internazionale di Neuro-Riabilitazione (WFNR), Istanbul, Aprile 2014
- Franceschini M. Intervento: "Utilità e limiti del protocollo di minima nella robotica per lo stroke", SIRN Genova, Maggio 2014
- Sale P. Intervento: "La riabilitazione robotica nella malattia di Parkinson", SIRN Genova, Maggio 2014
- Sale P. Intervento: "La riabilitazione robotica dell'arto superiore in soggetti con esiti di ictus", SIRN Genova, Maggio 2014
- Franceschini M. Intervento: "I risultati del progetto CCM 2010", Corso di formazione sull'assistenza al paziente con ictus, dalla fase acuta alla stabilizzazione degli esiti con ictus, Azienda ospedaliera "dei Colli", Napoli, Maggio 2014
- Franceschini M. Intervento: "Dispositivi tecnologicamente avanzati nella patologia locomotoria", Congresso: Innovazione Tecnologica e Locomozione Umana", Azienda per i Servizi Sanitari Bassa Friulana, Palmanova (UD), Giugno 2014
- Franceschini M. Intervento: "Offerta tecnologica: end effector nella riabilitazione delle persone con disabilità motoria", Convegno teorico-pratico: Esoscheletri in Medicina Riabilitativa, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma, Luglio 2014
- Franceschini M. Intervento: "Body-weight-supported gait training", Corso di Aggiornamento della European Summer School su: Gait and balance rehabilitation in neurological diseases", Pavia, Settembre 2014
- Franceschini M. Interventi:
  - "Current clinical overview of rehabilitation robotics";
  - "Action-Observation in Upper Limb Stroke Rehabilitation in Sub-acute Phase";
 Congresso Annuale della Hong Kong Association of Rehabilitation Medicine, Hong Kong, Ottobre - Novembre 2014
- Franceschini M. Interventi:
  - "Robotics for rehabilitation: A clinical perspective",
  - "Clinical experiences of robotic rehabilitation in people with neurological functional limitations",
- Launching Ceremony of "Louvain bionics" Foundation of University of Louvain, Bruxelles, No-

vembre 2014

- Franceschini M. Intervento: "Cammino, aspetti bioenergetici", Convegno Ortesi, Arto Inferiore e FES, Villa Beretta - Costa Masnaga (LC), Novembre 2014
- Stocchi F. Intervento: "Neuroprotective strategies in Parkinson's disease: Which evidence?", European Frontiers in Neuropsychopharmacology (twelfth series), Università di Catania, Gennaio 2014
- Stocchi F. Intervento: "Lecture: PD update – Evidence and clinical experience of the treatment for PD: Present and Future", Neupro 1st Anniversary Symposium, Giappone, Marzo 2014
- Stocchi F. Intervento: "Treatment of Parkinson's disease: present and future", National Conference of Neurology, Bulgarian Society of Neurology, Bulgaria, Giugno 2014
- Stocchi F. Intervento: "Optimising Levodopa treatment with rasagiline", 18th International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders, Stoccolma, Giugno 2014
- Stocchi F. Intervento: "Progressive Parkinson with focus on role of apomorphine", 21th Congress of Neurology & Clinical Electrophysiology of Iran, Tehran, Giugno 2014
- Stocchi F. Interventi:
  - "Should all Parkinson's disease patients initiate treatment with levodopa? Yes/No";
  - "Delayed on and Wearing off-complications", The Joint Congress of European Neurology, Istanbul, Giugno 2014
- Stocchi F. Due interventi: "Apomorphine infusion" e "Should levodopa be the initial therapy for PD?", The 8th World Congress on Controversies in Neurology, Berlino, Maggio 2014
- Stocchi F. Intervento: "Non-motor Symptoms in Parkinson's disease: diagnosis and staging", Summer School on Rehabilitation of Parkinson Disease, Roma, Luglio 2014
- Stocchi F. Intervento: "Medical treatment of sexual Dysfunction and Hypersexual Behavior in PD", 10th International Congress on Non-Motor Dysfunctions in Parkinson's disease and Related Disorders, Nizza, Dicembre 2014
- Stocchi F. Interventi al Movement Disorders Teaching Course:
  - "Overview of movement disorders – phenomenology"
  - "Distonia"
  - "Corea and paroxysmal dyskinesia"
  - "Myoclonus and other jerks"
  - "Movement disorders in systemic disease"
  - "Psychogenic movement disorders"Sophia (Bulgaria), Dicembre 2014
- Stocchi F. Intervento: "Combinando tratamientos en la EP avanzada: ¿què beneficios adician los IMAO-B?", XXXVIII Reunión Anual de la Academia Mexicana de Neurología, Cancún, México, Noviembre 2014
- Stocchi F. Intervento: "A new drug as add-on therapy to levodopa in Mid-to-late stage Parkinson disease patients", Zambon PD Academy, Vicenza, Novembre 2014

- Stocchi F. Intervento: "Update sulla terapia della malattia di Parkinson", DISMOV School, La scuola dei disturbi del Movimento: Disturbi della marcia e della postura; approccio integrato farmacologico e riabilitativo, Pescocostanzo (Aq), Giugno 2014
- Stocchi F. Intervento: "Novità sulla cura", XII Convegno Malattia di Parkinson – Associazione Italiana Parkinsoniani Onlus – Firenze, Marzo 2014
- Stocchi F. Intervento: "Parkinson nel 2014: ridefinizione della malattia", Sharing Best Practice – Progetto in tre atti sulla Malattia di Parkinson, Roma, Giugno 2014
- Stocchi F. Intervento: "Le molte dimensioni della malattia: implicazioni terapeutiche", PD P.O.I.N.T, Roma, Gennaio 2014
- Stocchi F. Intervento: "La fatica", Liguria Parkinson 2014, Genova, Marzo 2014
- Stocchi F. Partecipazione Tavole Rotonde:
  - "Gli studi accademici";
  - "Sperimentazione sponsorizzata in ambito Accademico", Corso di Sperimentazione Clinica SIN, Genova, Settembre 2014
- Stocchi F. Intervento: "Fatica nella malattia di Parkinson", I disturbi psichiatrici nella Malattia di Parkinson e negli altri disturbi del movimento, Roma, Settembre 2014
- Stocchi F. Intervento: "Morbo di Parkinson: come trattarlo per garantire la migliore autosufficienza nel tempo", IX Congresso Nazionale FIMeG, Roma, Settembre - Ottobre 2014
- Palma E. Intervento: "Epilessia: antiche credenze e nuove scoperte", Istituto Pasteur-Fondazione Cenci-Bolognetti, Roma, Aprile 2014
- Palma E. Intervento: "Effetto dell'esercizio fisico e della stimolazione elettrica nel muscolo denervato", Clinica, diagnosi e terapia della SLA, Roma, Aprile 2014
- Palma E. Intervento: "Gaba, epilepsy and pediatric diseases", Department of Neuropathology University of Amsterdam, Novembre 2014
- Palma E. Intervento: "I meccanismi dell'infiammazione nella genesi dell'epilessia", Lega Italiana contro l'Epilessia, Bari, Novembre 2014
- Roseti C. Intervento: "Fractalkine and human temporal lobe epilepsy: Focus on GABAergic transmission", Morris-Coole Epilepsia Lecture. Simposio di Eccellenza. 11th European Congress on Epileptology, Stoccolma, Luglio 2014
- Russo M. A. Intervento: "How hypoxic tumor microenvironment influences progression and therapy from BPH to Prostate Carcinoma", IInd Advanced Robotic Surgery Symposium, Roma, Gennaio 2014
- Russo M. A. Lecture: "Sirtuins and resveratrol-derived compounds. A model for understanding the beneficial effects of the Mediterranean Diet", 7th International Immunonutrition Workshop, Carovigno, Maggio 2014
- Volterrani M. Intervento: "Current indications to eplerenone in systolic heart failure", Tavola Rotonda su Eplerenone, the current gold-standard for mineralcorticoid receptor antagonism, Londra, Marzo 2014



- Volterrani M. Moderatore II Sessione "Cardiologia interventistica", Il Corso Superiore SICOA di Aggiornamento in Cardiologia, Milano, Marzo 2014
- Volterrani M. Intervento: "Nuove evidenze: Augment HF", III Convegno Regionale SICOA, Roma, Marzo 2014
- Volterrani M. Intervento: "Ruolo dell'Ivabradina nella gestione terapeutica della malattie cardiovascolari", Cardiovascular Conference 2.0, Capri, Marzo 2014
- Volterrani M. Chairman delle sessioni:
  - "Global cardiovascular risk: management of stroke in atrial fibrillation";
  - "Strategies for stroke prevention in atrial fibrillation - Guidelines versus real life clinical practice";
  - "Workshop on prevention of stroke in atrial fibrillation";
 ISCP (International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy) Workshop on Management of Hypertension, Atrial Fibrillation and Stroke, Parigi, Marzo 2014
- Volterrani M. Intervento: "Trattamento dello scompenso cardiaco cronico e prevenzione delle recidive", IV edizione Meeting: Dai Fattori di Rischio allo Sviluppo di Scompenso Cardiaco: Strategie di Prevenzione e Trattamento, Sorrento (Na), Aprile 2014
- Volterrani M. Moderazione: "Cardiologia riabilitativa: ultimo atto della fase acuta o primo della prevenzione?", XII Congresso Nazionale SICOA, Capri, Aprile 2014
- Volterrani M. Lettura: "Ivabradina e trattamento delle malattie cardiovascolari: chi, come e quando?", XII Congresso Nazionale SICOA, Capri, Aprile 2014
- Volterrani M. Lettura: "Aggiornamento sul paziente ad alto rischio cardiovascolare: fisiopatologia dello scompenso cardiaco nella pratica quotidiana e dimensione del problema", Progetto IF (Ivabradine Friendly), Iseo, Maggio 2014
- Volterrani M. Chairman della sessione: "How to assess and treat the patient with decompensated heart failure", Heart Failure Congress 2014, Atene, Maggio 2014
- Volterrani M. Intervento: "Devices for the management of heart failure", International Symposium on New Trends in cardiovascular therapy, Catanzaro, Maggio 2014
- Volterrani M. Intervento: "How to implement the pharmacotherapy of the difficult patient with HF", 2nd Annual Meeting New Trends in Cardiovascular Drug Therapy: from bench to bedside, Roma, Maggio-Giugno 2014
- Volterrani M. Intervento: "Coinvolgimento cardiaco: destro o sinistro?", Respiro Stresa - La fasi più avanzate della BPCO, Stresa, Giugno 2014
- Volterrani M. Intervento: "I primi dati AUGMENT: l'analisi ad interim", Forum SICOA sullo Scompenso cardiaco, San Donato Milanese, Giugno 2014
- Volterrani M. Chairman della sessione: "Global cardiovascular risk: management of ischemic heart disease", Joint International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) and St George's University of London - Workshop on Management of Ischemic Heart Disease and prevention of HF, Londra, Settembre 2014



- Volterrani M. Chairman delle sessioni:
  - "Global Cardiovascular risk: Management of stroke in atrial fibrillation";
  - "Workshop on prevention of stroke in atrial fibrillation";
 Joint International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) and IK-EM: Workshop on Management of Hypertension, Atrial Fibrillation and Stroke, Praga, Settembre 2014
- Volterrani M. Interventi:
  - "Strategies for stroke prevention in atrial fibrillation - Guidelines versus real life clinical practice";
  - "Interactive discussion on prevention of stroke in atrial fibrillation";
 Joint International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) and IK-EM: Workshop on Management of Hypertension, Atrial Fibrillation and Stroke, Praga, Settembre 2014
- Volterrani M. Intervento: "Cosa suggerisce la letteratura nella sezione: "I NAO sono tutti uguali?", Seminario Nazionale SICOA, Brescia, 26-27 settembre 2014
- Volterrani M. Interventi:
  - "Linee guida per il trattamento dello scompenso cardiaco";
  - "Serum acid: a new player in cardiovascular risk",
 International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) Cardiovascular Workshop - 3rd Italian Chapter, Capri (Na), Ottobre 2014
- Volterrani M. Chairman: "Workshop on prevention of stroke in atrial fibrillation", International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy (ISCP) Workshop on Management of Hypertension, atrial fibrillation and stroke, Dubai, Ottobre 2014
- Volterrani M. Relatore Tavola Rotonda: "La BPCO nel paziente senior: comorbidità politerapie, l'aderenza alla terapia inalatoria, l'utilizzo di device inalatori in BPCO", HottoP 2014: Hot Topics in Pulmonology, Milano, Ottobre 2014
- Volterrani M. Moderatore della IV Sessione: "Malattie cardiache e polmonari: dal farmaco alla riabilitazione", Seminario SICOA "CUORE E POLMONE", Treviso, Novembre 2014
- Volterrani M. Intervento: "Terapia dell'iper-uricemia nel paziente ad aumentato rischio cardiovascolare", 1° Workshop in Medicina Interna, Vibo Valentia, Dicembre 2014
- Volterrani M. Intervento: "Ivabradina: dalle evidenze dei grandi trial all'esperienza clinica", 75° Congresso SIC, Roma, Dicembre 2014
- Marazzi G. Intervento: "Errori diagnostici in cardiologia, casi clinici: Shock settico?", XII Congresso Nazionale SICOA, Capri, Aprile 2014
- Marazzi G. Intervento: "Trattamento dei pazienti dislipidemici intolleranti alle statine: ruolo del nutraceutico", XII Congresso Nazionale Società Italiana di Cardiologia Riabilitativa e Preventiva 2014, Genova, Ottobre 2014
- Iellamo F. Intervento: "Effetti del training fisico sulla regolazione nervosa cardiaca nel paziente cardiopatico", III Convegno Nazionale SICOA Lazio, Roma, Marzo 2014
- Iellamo F. Intervento: "Tailoring exercise training in cardiac rehabilitation: promise and evidence", Summer School Updates in cardiovascular pathophysiology, Pisa, Settembre 2014

- Iellamo F. Intervento: "Autonomic adaptations in endurance athletes", 4th I.S.MU.L.T Congress, Italian Society of Muscles, Ligaments and Tendons, Roma, Dicembre 2014
- Caprio M. Intervento: "Mineralocorticoid receptor antagonism promotes brown-like remodeling of murine white adipose tissue via reduction of autophagic flux in adipocytes", ICE/ENDO Meeting, Chicago, USA, Giugno 2014
- Caprio M. Intervento: "HbA1c point of care testing: the impact on patient management", EKF Diagnostics International Distributor Meeting, Roma, Settembre 2014
- Caprio M. Intervento: "Laboratory of cardiovascular endocrinology – IRCCS San Raffaele Pisana – Team leader presentation", ADMIRE 1st European Meeting, Padova, Ottobre 2014
- Caprio M. Intervento: "Mineralocorticoid receptor in the adipose organ: new perspectives for the treatment of Metabolic Syndrome", Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Cracovia, Polonia, Dicembre 2014
- Armani A. Intervento: "Browning of white adipose tissue and Mineralocorticoid Receptor: key role of autophagy" – XXXI Giornate Endocrinologiche Pisane, Pisa, Aprile 2014
- Armani A. Intervento: "MR blockade protects against diet induced obesity, adipocyte dysfunction and cardiac inflammation in mice, through browning of the adipose organ and modulation of autophagy", ADMIRE 1st European Meeting, Padova, Ottobre 2014
- Marzolla V. Poster dal titolo: "Effects of aldosterone on early steps of atherogenesis", 2nd Meeting on New Trends in Cardiovascular Drug Therapy, Roma, Maggio – Giugno 2014
- Marzolla V. Intervento: "MR blockade reduces autophagic rate in adipocytes and promotes browning of white adipose tissue in mice", ESH-ISH satellite: Putting the A back into RAAS, Santorini, Giugno 2014
- Marzolla V. Poster dal titolo: "Transcriptional control of ICAM-1 in human coronary artery endothelial cells by Mineralocorticoid Receptor (MR): implications for the protective effects of MR antagonists in cardiovascular diseases", ADMIRE 1st European Meeting, Padova, Ottobre 2014
- Mammi C. Poster dal titolo: "Novel combined GR/MR antagonist inhibits adipocyte differentiation and fat mass expansion in mice fed a High-fat diet", ADMIRE 1st European Meeting, Padova, Ottobre 2014
- Feraco A. Poster dal titolo: "Role of Mineralocorticoid Receptor in the regulation of autophagy and differentiation of adipose tissue and skeletal muscle", ADMIRE 1st European Meeting, Padova, Ottobre 2014
- Barbanti P. Intervento: "Proposta di istituzione di un Registro Nazionale delle Cefalee Croniche", Workshop ISS, Roma, Marzo 2014
- Barbanti P. Intervento: "Cefalee e multimedialità", Congresso Nazionale ANIRCEF, Maggio 2014

- Barbanti P. Intervento: "Cefalee ed associazionismo" Romagna Cefalee, Ravenna, Ottobre 2014
- Barbanti P. Intervento: "Classificazione e fisiopatologia dell'emicrania", Congresso Società Italiana Oftalmologia, Roma, Novembre 2014
- Barbanti P. Intervento: "La stimolazione vagale nell'emicrania", Riunione sezione laziale SIN, Roma, Novembre, 2014
- Barbanti P. Intervento: "Cefalee e associazionismo", Congresso Società Italiana di Medicina Generale, SIMG, Firenze, Novembre 2014
- Barbanti P. Intervento: "Idrocefalo normoteso", Nuove Frontiere in Neurogeriatria, Stresa, Dicembre 2014
- Guadagni F. Moderatore:
  - Biobanks: a research infrastructure for the future of translational and clinical research";
  - "Immunotherapy; biotherapy; vaccines";
 Ninth International Conference of Anticancer Research, Special Symposium of the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Guadagni F. Intervento: "An Italian experience in biobanking research: the involvement of BioBIM in inter-regional research projects", Ninth International Conference of Anticancer Research, Special Symposium of the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Palmirotta R. Intervento: "Biobanking Standard Operative Procedures (SOPs) for molecular biology applications", Ninth International Conference of Anticancer Research, Special Symposium of the International Society for Biological and Environmental Repositories (ISBER), Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Riondino S. Intervento: "Dysmetabolism and cancer. Association and clinical outcomes", Nutrition and Cancer. Nutritional aspects of cancer prevention, Ninth International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Ferroni P. Moderazione: "Diagnosis and prognosis of cancer", Ninth International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Ferroni P. Intervento: "New predictors of venous thromboembolism in ambulatory cancer patients", Ninth International Conference of Anticancer Research, Sithonia, Grecia, Ottobre 2014
- Ferroni P. Intervento: "VEGF A gene promoter polymorphisms and risk of venous thromboembolism in ambulatory cancer patients", Congress on Controversies in Thrombosis and Hemostasis (CiTH), Berlino, Germania, Ottobre-Novembre 2014
- Guadagni F. Moderazione: "Breast cancer in young women", 1st Annual Congress of the European-Asian Society of Surgical Oncology (EUASSO), Atene, Grecia, Settembre 2014
- Della-Morte D. Intervento: "Association between Sirtuins Genetic Variants and Carotid Plaque Burden and Morphology", 23 European Stroke Conference 2014, Nizza, Francia, Maggio 2014.
- Condoluci C. Interventi:

- "Study of cardiac risk parameters in adult persons with Down Syndrome";
- Evaluation of fine movements in persons with Down syndrome"  
2014 IASSIDD Europe Regional Congress, University of Vienna, Vienna, Luglio 2014.
- Albertini G. Intervento: "Magic 2: an innovative informatics tool to support a multidisciplinary approach to child/family and person with Developmental Disabilities in a lifespan perspective", 2014 IASSIDD Europe Regional Congress, University of Vienna, Vienna, Luglio 2014
- Russo P. Intervento "Effect of CHRNA7 genotypes on the cognitive response to acetylcholinesterase inhibitor (AChEI) treatment (Donepezil) at different stages of Alzheimer's Disease", 23rd The Israel Society for Neuroscience (ISFN Annual Meeting), Tel Aviv, December, 2014
- Bonassi S. Intervento: "Systems Medicine in respiratory medicine", Symposium Honorary Doctorate Prof. Dr. Peter Barnes, Maastricht, Paesi Bassi, Gennaio 2014
- Bonassi S. Intervento: "From the exposome to disease platforms and Systems Medicine: the big picture is now complete", 45th Annual Meeting of the Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EMGS), Orlando, Florida (USA), Settembre 2014
- Bonassi S. Intervento: "Validation issues in the use of biomarkers in epidemiological studies, introducing omics", Third edition of the International course on Molecular Epidemiology of Chronic Diseases, Maastricht, Paesi Bassi, Giugno 2014
- Bonassi S. Chairman della session "Use of biomarkers in Nanotoxicology. NANOTOX 2014, 7th International Nanotoxicology Congress", Antalya, Turchia, Aprile 2014
- Bonassi S. Intervento: "Exoposomics in Systems Medicine", ERS International Congress 2014, Monaco, Germania, Settembre 2014.

## AREE DI RICERCA



Le attività di ricerca prevedono una organizzazione secondo Aree di Ricerca, comprendente un'Area trasversale di Epidemiologia Clinica e Molecolare che mette a disposizione dei ricercatori anche un servizio di Biostatistica.

AREE DI RICERCA	RESPONSABILE
RIABILITAZIONE NEUROMOTORIA	MARCO FRANCESCHINI
CENTRO DEL FARMACO E CLINICAL TRIAL CENTER	FABRIZIO STOCCHI
PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO	FABRIZIO STOCCHI
CEFALEE E DOLORE NEUROPATICO	PIERO BARBANTI
RIABILITAZIONE CARDIOVASCOLARE	MAURIZIO VOLTERRANI
PNEUMOLOGIA RIABILITATIVA	VITTORIO CARDACI
CENTRO DI RICERCA CLINICA E SPERIMENTALE	GIUSEPPE ROSANO
EPIDEMIOLOGIA CLINICA E MOLECOLARE	STEFANO BONASSI
DISABILITÀ DELLO SVILUPPO E RIABILITAZIONE	GIORGIO ALBERTINI
BIOBANCA - BIOTECNOLOGIE AVANZATE E BIOMARKER DISCOVERY	IORELLA GUADAGNI
ORGANIZZAZIONE E GESTIONE DEI SERVIZI	NATALE SANTUCCI
DIAGNOSTICA PER IMMAGINI	ALBERTO PIERALLINI
TELEMEDICINA E E-HEALTH	MAURIZIO VOLTERRANI
ROBOTICA RIABILITATIVA	PATRIZIO SALE

LABORATORIO	RESPONSABILE	STAFF
ENDOCRINOLOGIA CARDIOVASCOLARE	MASSIMILIANO CAPRIO	ANTONELLA ANTELMI, ANDREA ARMANI, ALESSANDRA FERACO, CATERINA MAMMI, VINCENZO MARZOLLA
PATOFISIOLOGIA DELLA CACHESSIA E METABOLISMO DEL MUSCOLO SCHELETRICO	ELISABETTA FERRARO	LUCIA GATTA, STEFANIA GORINI, FRANCESCA MOLINARI, LAURA PONTECORVO, LAURA VITIELLO
NEUROBIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE	ALESSIO CARDINALE	DANIELA MERLO
PATOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE	MATTEO ANTONIO RUSSO	CAROLINA LANE ALVES, TANIA ARCANGELI, ELENA DE SANTIS, ELEONORA FOGGIO, FEDERICA LIMANA, ELENA PONTEMEZZO, GIOVANNI PUDDIGHINU, SERENA SALADINI, LUIGI SANSONE, MARCO TAFANI
ELETTROFISIOLOGIA	ELEONORA PALMA	CRISTINA ROSETI
BIOCHIMICA DELL'INVECCHIAMENTO	MARIA ROSA CIRIOLO	KATIA AQUILANO, SARA BALDELLI, GIUSEPPE TATULLI
FARMACOGENETICA	RAFFAELE PALMIROTTA	
BRAIN CONNECTIVITY E ROBOTICA SPERIMENTALE	FABRIZIO VECCHIO	FRANCESCO INFARINATO, FRANCESCA MIRAGLIA
EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE	PATRIZIA RUSSO	STEFANIA BOCCIA, ALESSANDRA DEL BUFALO, MIRTA MILIC
PATOLOGIE CRONICO-DEGENERATIVE	ANNA TERESA PALAMARA	DOLORES LIMONGI, SIMONA PANELLA, ROSSELLA SGARBANTI

## AREE DI RICERCA

NEUROMOTORIA

## RESPONSABILE

MARCO FRANCESCHINI

## STAFF

D. LE PERA, C. DAMIANI,  
F. DEPISI, P. SALE,  
F. INFARINATO,  
D. GALAFATE, V. LOMBARDI

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'area collabora con aziende con tecnologie avanzate per la messa a punto di prototipi tecnologici con potenziale utilità nella riabilitazione dell'arto superiore nelle persone con lesione neurologica.

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.

## COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE:

- il Dipartimento di Riabilitazione dell'Area Vasta della Toscana Occidentale nell'ambito di un progetto di ricerca clinica nell'uso di sistemi robotici per la riabilitazione dell'arto superiore nelle persone con esito di stroke. Questa collaborazione ha portato alla pubblicazione congiunta di tre articoli e alla preparazione di una quarta pubblicazione.

- il Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Parma e con l'U.O. di Medicina Riabilitativa dell'Azienda Ospedaliera ed Universitaria di Parma per la messa a punto di un progetto di ricerca finalizzata presentato al Ministero per la Salute dal titolo: "Action observation treatment to improve cortical plasticity and upper limb functions in chronic stroke patients: a RCT study from basic neuroscience to traditional and home-based clinical rehabilitation."

- l'Università Cattolica di Louvain (Belgio), in quanto Marco Franceschini è stato nominato componente del Comitato Scientifico della Fondazione Louvain Bionics.

## AREE DI RICERCA

PARKINSON E DISTURBI  
DEL MOVIMENTO

## RESPONSABILE

FABRIZIO 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 nell'accrescere sia 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 nell'area clinico-farmacologica, psicologica e riabilitativa sia nella malattia di Parkinson che nei parkinsonismi atipici:

1. E' proseguita l'osservazione della casistica di pazienti affetti da Paralisi Sopranucleare 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 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. Il numero raggiunto di pazienti a tutto il 2014 è di 80 soggetti affetti da PSP.

2. Si è concluso uno Studio sull'analisi della differenza di percezione e consapevolezza dei movimenti involontari tra i pazienti con malattia di Parkinson e i loro caregivers. L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare la percezione e la consapevolezza dei movimenti involontari tra i pazienti parkinsoniani e i loro caregivers utilizzando un nuovo questionario PD-C SCL Parkinson's disease /Caregivers Symptoms Check List. A tale scopo, è stato chiesto ai 50 pazienti partecipanti allo studio (ed ai 50 caregivers) di fornire una valutazione ad una serie di sintomi della malattia di Parkinson. Il grado di accordo (o disaccordo) fra valutazione effettuata dal paziente e dal caregiver è stato valutato statisticamente attraverso il Kappa di Cohen. Per alcuni sintomi è eseguito anche il confronto con la valutazione espressa dal clinico, riportata nella scheda mAIMS.

L'accordo fra paziente e caregiver è risultato scarso in 6 aree.

- Problemi psicologici: in 21 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave di quello fornito dal paziente;
- Movimenti involontari tronco: in 22 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente;
- Movimenti involontari arti: in 25 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente (50% dei casi);
- Movimenti involontari capo: in 21 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente;
- Situazione inversa si ha nel blocco/rallentamento motorio grave, dove è il paziente a risentire maggiormente dei sintomi e questo suo malcontento si riflette nelle risposte date.
- Accordo massimo si ha nel giudicare il tremore del capo.

Come ci si aspettava, il giudizio del clinico non è in accordo con il concetto di "fastidio" sentito dal paziente. Ad esempio, nel "movimenti involontari del tronco" il confronto fra paziente e clinico presenta una concordanza scarsa ed in 28 casi su 50 totali, il clinico descrive una situazione di una certa gravità mentre il fastidio descritto dal paziente risulta essere abbastanza lieve. I pazienti

parkinsoniani tendono a sottovalutare la gravità e l'impatto dei loro sintomi sulle attività della vita quotidiana, mentre i familiari e caregivers spesso considerano i movimenti involontari come il segno principale o il più fastidioso tra i sintomi parkinsoniani. Questi risultati sono importanti nell'affrontare nella pratica clinica con la dovuta attenzione le esigenze del paziente e quelle del caregiver che spesso possono risultare completamente differenti.

3. Nell'ambito dello studio delle nuove procedure riabilitative, si è concluso un primo studio pilota per valutare l'efficacia del dispositivo medico "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da Parkinson. Nella maggior parte di questi pazienti 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, costituisce un obiettivo fondamentale, ma spesso insoddisfatto, del trattamento. L'utilizzo di dispositivi elettromeccanici, in aggiunta alle convenzionali terapie farmacologiche, nell'ultimo anno è risultato di estremo ausilio nel trattamento dei pazienti con malattia di Parkinson (PD). GONDOLA è un dispositivo personale portatile di riabilitazione 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. In questo protocollo sono stati inclusi 20 pazienti con Malattia di Parkinson affetti da fluttuazioni della risposta motoria. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: trattamento GONDOLA attivo e trattamento SHAM GONDOLA. La randomizzazione è stata effettuata con il supporto di un software dedicato. Solo l'operatore incaricato della somministrazione del trattamento era a conoscenza del gruppo di appartenenza del singolo paziente. Ogni paziente è stato sottoposto a 8 stimolazioni (2 stimolazioni a settimana GONDOLA o SHAM GONDOLA) e, dopo 4 settimane di wash-out, ad una visita di follow up. Le valutazioni cliniche sono state effettuate all'inizio (T0), alla fine del ciclo di stimolazioni (T1) e dopo il follow up di 4 settimane (T2), da osservatori in cieco rispetto al trattamento effettuato. Lo studio computerizzato del cammino (GAIT) era stato previsto, all'inizio e alla fine di ciascun ciclo di stimolazioni, in almeno il 50% dei pazienti arruolati. L'analisi statistica dei dati ottenuti ha mostrato un miglioramento significativo nei punteggi dell'UPDRS III e nel Six Minute Walking test (6MWT) tra i tempi di valutazione T0 e T1 nel gruppo di pazienti trattati con GONDOLA attivo. E' stato inoltre evidenziato un peggioramento statisticamente significativo dei punteggi UPDRS III tra i tempi di valutazione T1 (post-stimolazione) e Follow up (dopo 4 settimane di wash out). Nessuna variazione statisticamente significativa è stata evidenziata per tutte le altre scale di valutazione ad eccezione della CGI - Investigator e Paziente che ha mostrato un peggioramento significativo nel gruppo di stimolazione attiva tra la valutazione di fine stimolazione (T1) e la valutazione effettuata al Follow-up (T2). Nessuna variazione significativa è stata riportata nel gruppo SHAM. I risultati ottenuti hanno mostrato un trend di miglioramento nelle performance motorie nei pazienti trattati con Gondola® attivo rispetto al gruppo placebo.

4. Sempre nell'ambito dello studio di nuove procedure terapeutiche, è stato condotto uno studio utilizzando la Deep TMS (DTMS- Deep Transcranial Magnetic Stimulation), tecnica che consente la attivazione diretta e non-invasiva di strutture cerebrali profonde fino a 6 cm. La Deep TMS utilizza un coil (H-coil) brevettato ed unico nel suo disegno ed architettura, che grazie al suo particolare disegno raggiunge le strutture più profonde modulando eccitazione e/o inibizione neuronale, anche nel sistema limbico implicato nei disturbi dell'umore come depressione, sindromi bipolari, tossicodipendenze, disturbo ossessivo-compulsivo, ed altri ancora in fase di studio. In particolare, la DTMS a bassa frequenza sull'area motoria primaria potrebbe avere effetti significativi sulla modulazione delle discinesie indotte da levodopa (LID), ipotizzando che una stimolazione magnetica profonda e con un più largo volume di attivazione, possa determinare una maggiore inibizione delle aree corticali con conseguenti maggiori e duraturi effetti benefici sulle LID. Lo studio, longitudinale cross-over randomizzato in doppio cieco, ha avuto lo scopo di investigare l'efficacia nel recupero funzionale, nella riduzione dei movimenti involontari e negli aspetti neuropsicologici

indotti dalla terapia con Deep TMS® in 15 pazienti affetti da Malattia di Parkinson e 20 pazienti con PSP. Nei pazienti parkinsoniani con discinesie la Deep TMS a bassa frequenza ha dimostrato di determinare una lieve ma significativa riduzione dell'intensità delle discinesie, con minimi effetti residui una settimana dopo la fine del trattamento. Tale miglioramento dell'intensità non ha avuto però un significato clinico nel migliorare la disabilità causata dai movimenti involontari. Nei pazienti con PSP i risultati hanno mostrato un miglioramento dei sintomi motori e non motori in quasi tutti i pazienti in aree quali l'attenzione e il linguaggio, il sonno e la stanchezza, la stipsi, l'andatura e l'instabilità posturale. Si è trattato di un miglioramento a breve termine (stimato in 6/7 giorni dopo l'ultimo trattamento), ma molto apprezzato dai pazienti e dai loro caregivers. I feedback ottenuti da tutti i pazienti sono stati molto positivi, dopo la fine del trattamento, e tutti erano disposti a proseguire il trattamento. La DTMS è una tecnologia molto costosa e assicurare un trattamento continuo ai pazienti è difficile per la maggior parte delle strutture sanitarie italiane.

5. Il Parkinson è una malattia cronica con progressiva disabilità. Alla luce del progresso sia delle terapie farmacologiche che in generale dell'assistenza, sono sempre di più i pazienti che hanno una storia di malattia molto lunga. E' stato condotto uno studio volto a descrivere le caratteristiche cliniche, la qualità della vita e la progressione della malattia nei pazienti con Parkinson diagnosticato e trattato da più di 20 anni, mirando: all'identificazione di diversi fenotipi clinici nella malattia di Parkinson avanzata e la loro caratterizzazione farmacologica; alla valutazione dell'impatto delle differenti comorbidità; alla individuazione dei sintomi che causano maggiore disabilità; alla individuazione delle differenti disabilità. Nel primo anno di studio sono stati arruolati 20 pazienti (13 M, 7 F) con diagnosi di malattia di Parkinson idiopatica. La durata media di malattia è di  $21 \pm 1,2$  anni, la media di età è di  $75 \pm 3,5$ , stadio H&Y  $4 \pm 0,7$ . Una analisi preliminare ha evidenziato che il 48% dei pazienti presenta deterioramento cognitivo; le allucinazioni sono presenti in circa il 40% dei pazienti. Disturbi della sfera urinaria sono presenti in circa il 60%. Il 65% presenta discinesie indotte da levodopa e l'80% wearing off disabilitanti. La maggior parte dei pazienti necessita di ausili per la deambulazione. Durante il secondo anno di studio si provvederà a terminare l'arruolamento dei pazienti e ad effettuare una accurata analisi statistica dei dati, che permetterà di definire meglio la popolazione parkinsoniana in fase avanzata con lo scopo di individuare nuovi target per ottimizzare la gestione di questi pazienti.

6. Tra i sintomi non motori della malattia di Parkinson (PD) i disturbi del comportamento rivestono un ruolo significativo. Tra questi disturbi psichiatrici, si possono distinguere quelli indipendenti dalla terapia, come la depressione e i disturbi d'ansia, e quelli invece, amplificati dalla terapia dopaminergica, come la psicosi e i disturbi del controllo degli impulsi. In questa categoria rientrano il gioco d'azzardo patologico, lo shopping compulsivo, l'ipersessualità, il punding, ecc. Caratteristiche comuni sono: incapacità di resistere all'impulso, alla spinta o alla tentazione di eseguire l'atto; un crescente senso di tensione o attivazione prima di commettere l'atto; un senso di piacere, gratificazione o "release" al momento di commettere l'atto. Il gioco d'azzardo patologico (gambling) è caratterizzato dall'impossibilità da parte del paziente di resistere all'impulso del gioco nonostante conseguenze personali, familiari o occupazionali, e significative ripercussioni sulla vita sociale dei pazienti. Negli anni passati diversi studi hanno evidenziato dipendenze patologiche nei pazienti affetti da PD. La degenerazione del sistema dopaminergico presente nella PD e la continua e obbligatoria assunzione di farmaci dopaminergici causa in alcuni pazienti disfunzioni nel sistema della gratificazione. E' iniziato questo studio con lo scopo di testare l'ipotesi che specifici fattori molecolari giochino un ruolo nei processi cognitivi ed emotivi alla base dello sviluppo del gioco d'azzardo patologico (GAP), in pazienti con PD. In particolare verranno valutati sistematicamente una serie di plimorfismi genetici, ad oggi studiati specialmente in soggetti gambler senza altro disturbo psichiatrico o neurologico. Lo studio prevede l'arruolamento di un numero minimo di 20 pazienti con PD e GAP presso gli ambulatori neurologici dell'IRCCS San Raffaele Pisana e sarà svolto in collaborazione con l'Università Sapienza e la UOD di Diagnostica molecolare Avanzata della Azienda Universitaria Ospedaliera Sant'Andrea II.

7. Nel corso del 2014 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, ecc. 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 (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. Il campione finora analizzato è composto da 520 casi affetti e da 257 controlli non affetti da malattia. Il target da raggiungere è di 1000 soggetti.

8. E' proseguito lo studio dei fattori predittivi nello sviluppo della malattia di Parkinson (PD): analisi della variabilità dell'intervallo cardiaco R-R in familiari di pazienti, che 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 e c) gruppi di controllo correlati per sesso ed età. In questo studio, si effettua un elettrocardiogramma di routine con misurazione della variabilità dell'intervallo R-R su un gruppo di familiari di primo grado di pazienti e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso. Questo tipo di ricerca potrebbe 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.

Inoltre, è proseguita la partecipazione a trial clinici (internazionali, multicentrici) inerenti la sperimentazione di nuovi farmaci.

## AREE DI RICERCA

CENTRO DEL FARMACO  
E CLINICAL TRIAL CENTER

## RESPONSABILE

FABRIZIO STOCCHI

## STAFF

M. CASALI, C. FOSSATI,  
P. GRASSINI,  
F.G. RADICATI, P. STIRPE,  
M. TORTI, L. VACCA.

Il Clinical Trial Center dell'IRCCS San Raffaele Pisana è la struttura organizzativa che promuove e gestisce tutte le fasi dei Trial clinici farmacologici e con dispositivi medici sponsorizzati.

Il Clinical Trial Center (CTC) è nato con l'esigenza di organizzare ed eseguire a livello locale quanto avviene in ambito nazionale e internazionale, con studi clinici promossi da industrie, società scientifiche, enti di ricerca e singoli ricercatori. Il CTC ha lo scopo di rappresentare il punto di riferimento della sperimentazione clinica e farmacologica in tali ambiti e di promuovere l'eccellenza e la qualità della sperimentazione clinica in accordo con le Good Clinical Practices.

Viene effettuata l'attivazione/consulenza scientifica per le sperimentazioni cliniche farmacologiche dalla fase I alla fase IV; consulenza scientifica per la preparazione di dossier per la registrazione di farmaci; avvio di sperimentazioni con altra modalità di somministrazione di farmaci già registrati in commercio.

Recentemente il Centro si è dotato di dispositivi innovativi per la terapia dei pazienti affetti da Parkinson e altre patologie neurodegenerative, quali la Stimolazione Plantare Meccanica (GONDOLA), ed ha condotto studi con metodiche di Stimolazione transcranica Elettrica e Stimolazione transcranica Magnetica profonda.

Inoltre, è proseguita la partecipazione a trial clinici (internazionali, multicentrici) inerenti la sperimentazione di nuovi farmaci.

## AREE DI RICERCA

CEFALEE E DOLORE  
NEUROPATICO

## RESPONSABILE

PIERO BARBANTI

## STAFF

C. AURILIA, G. EGEO,  
L. FOFI, S. PIROSO,  
A. PESENTI

Il dolore è una delle prime cause di disabilità della popolazione mondiale. Una legge (n° 38 del 15/3/10) in Italia impone 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:

a) 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).

b) 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 noxiousinhibitory 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.

c) 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

d) Farmacologico:

- attuazione di protocolli terapeutici con farmaci in sperimentazione clinica (anticorpi monoclonali anti CGRP/anti recettore per il CGRP; vaccini con l'Herpes Zoster).

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);
- è coordinatore Clinico per l'Italia del Registro Nazionale delle Cefalee Croniche.

## COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE:

- Università "Sapienza" di Roma - Unità per la Terapia del Dolore, Dipartimento di Scienze Neurologiche – collaborazione con il Prof. Giorgio Cruccu per: validazione di protocolli diagnostici e clinici (DN4) per il dolore cronico e neuropatico; studio neurofisiologico delle vie termiche e nocicettive nella regione trigeminale mediante stimolazione Nd-YAP-laser nei pazienti con dolore cefalico episodico e cronico; riabilitazione del dolore cronico.

- Azienda Policlinico Umberto I, Università "Sapienza" di Roma - Centro dei Disordini del Movimento" Dipartimento di Scienze Neurologiche – Da 3 anni è in atto una collaborazione clinica e scientifica continua con i Professori Alfredo Berardelli e Giovanni Fabbrini per una valutazione integrata ambulatoriale di pazienti affetti da malattia di Parkinson e/o altri disturbi del Movimento.

- Azienda Policlinico Umberto I, Università "Sapienza" di Roma – UTN - Unità di Trattamento Neurovascolare, Dipartimento di Scienze Neurologiche, Policlinico - Collaborazione scientifica e clinica con il Prof. Danilo Toni per studi non sponsorizzati, per il trattamento in riabilitazione neuromotoria di pazienti affetti da malattie cerebrovascolari acute-subacute.

- Istituto Superiore di Sanità, Roma - CNESPS, Reparto di Farmacoepidemiologia – Collaborazione con il Dr. Nicola Vanacore per la valutazione ed elaborazione dati di progetti scientifici.

- Fondazione IRCCS Istituto Neurologico Nazionale Carlo Besta, Milano - Dipartimento di Scienze Neurologiche, U.O. Cefalea e Disordini Vascolari – collaborazione con la Dr.ssa Licia Grazi. L'Unità della Cefalea e del Dolore dell'IRCCS San Raffaele è Centro di Riferimento per il Lazio dell'Associazione Neurologica Italiana per la Ricerca della Cefalea (ANIRCEF), la cui sede principale è l'Istituto Neurologico Nazionale Carlo Besta.

- Azienda Ospedaliera O.I.R.M. S. Anna di Torino - Centro Cefalee della Donna e Servizio di Agopuntura in Ginecologia e Ostetricia. La collaborazione scientifica con il Prof. Giovanni Battista Allais e la sua equipe mira a studiare gli effetti clinici dell'agopuntura nei pazienti affetti da varie forme di cefalea ad andamento cronico.

- Università di Torino "Molinette" - S.C.D.U. Neurologia - III Centro Cefalee (collaborazione con il Prof. Innocenzo Rainero) e Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze - Centro Cefalee e Farmacologia Clinica (collaborazione scientifica con il Prof. Pierangelo Geppetti) per la definizione di efficacie e tollerabilità della profilassi dell'emicrania mestruale mediante stimolazione vagale non invasiva con dispositivo Gamma Core.



## AREE DI RICERCA

PNEUMOLOGIA  
RIABILITATIVA

## RESPONSABILE

VITTORIO CARDACI

## STAFF

V. CONTI, E. STIRPE, S. DI  
TORO, A. ZARZANA, E. LE-  
MONTZI, C. POZZUTO, A.  
MATTIA, E. DI COSIMO, M.  
SCOTTO, M. BISCEGLIA

La Pneumologia Riabilitativa si occupa di pazienti con gravi patologie respiratorie (broncopneumopatia cronica ostruttiva, insufficienza respiratoria cronica e scompensata in ventilazione meccanica non invasiva, sindrome per le apnee del sonno, enfisema, asma) in accordo con la missione standard per queste tipologie cliniche valutando l'effetto della Riabilitazione Respiratoria sui principali parametri clinico-funzionali (test del cammino dei sei minuti -6MWT-, parametri emogasanalitici -pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>-, test di funzionalità respiratoria, monitoraggio della saturazione ossi-emoglobinica nelle 24 ore) e sulla Qualità di Vita.

Inoltre, l'Area si occupa della gestione dei protocolli riabilitativi per pazienti sottoposti a chirurgia resettiva polmonare (per neoplasie e per patologie non neoplastiche).

Recentemente, in stretta collaborazione con l'Area di Epidemiologia Clinica e Molecolare, la ricerca si è focalizzata sulla valutazione del ruolo della Riabilitazione Respiratoria su parametri di outcome funzionale e Qualità di Vita (QoL) in pazienti sottoposti a riabilitazione respiratoria, con temi specifici quali: la valutazione dell'efficacia clinica della Riabilitazione Respiratoria in pazienti affetti da Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), lo studio della funzione respiratoria, la valutazione e misurazione della consistenza di indici di outcome clinico (es. BODE index). L'approccio utilizzato è di tipo prevalentemente traslazionale in modo da consentire l'integrazione fra valutazioni di ambito prettamente molecolare con l'outcome clinico.

L'Area ha aperto canali di cooperazione scientifica con centri di ricerca di rilevanza nazionale ed internazionale, orientando le proprie ricerche sull'approccio integrato alle patologie respiratorie causa di disabilità (infiammatorie e neoplastiche).

L'Area è altresì impegnata sul fronte della Formazione aziendale ed ECM oltre che in attività di fund raising. L'Area inoltre pianifica e conduce trials di ricerca clinica sponsorizzata.

## AREE DI RICERCA

AREA  
CARDIOVASCOLARE

## RESPONSABILE

MAURIZIO VOLTERRANI

## STAFF

A. ANELMI, D. ARESTIA,  
A. ARMANI, ML BARBU-  
TO, D. BATTAGLIA, G.  
CAMPOLONGO,  
M. CAPRIO, F. CARETTA,  
V. D'ANTONI, A. DI LUC-  
CIO, L. GATTA, S. GORINI,  
F. IELLAMO, A. FERACO,  
E. LIPPI, C. MAMMI, R.  
MASSARO, V. MARZOLLA,  
F. MOLINARI, E. FERRARO,  
G. NASSO, M. PIERGALLI-  
NI, L. PONTECORVO,  
R. POSCIA, N. PUNZO,  
G. ROSANO, D. SANTINI,  
B. SPOSATO, I. SPOLETINI,  
C. VITALE, L. VITIELLO,  
CD. VIZZA.

L'Area focalizza gli interessi di ricerca sui meccanismi di recupero funzionale delle malattie cardiovascolari e cerebrovascolari.

Principali ambiti:

Clinico/Gestionale:

Riabilitazione in malattie cardiovascolari in riferimento alle seguenti Linee di Ricerca Corrente istituzionali:

- Linea 2: Meccanismi di recupero funzionale della patologia cronica e disabilitante: analisi dei determinanti di out come;
- Linea 3: Sistemi innovativi di prevenzione/controllo e promozione della salute, con un interesse specifico per i sistemi di telemedicina e robotica nella riabilitazione: implementazione e validazione di sistemi di teleassistenza e teleriabilitazione;
- Linea 5: Modelli organizzativi e gestionali delle disabilità in riabilitazione: implementazione di modelli di "Integrated Care" di gestione delle malattie croniche in ambito territoriale.

Cardiologico/Clinico:

- Modelli e percorsi riabilitativi: esercizio fisico e modalità innovative di riallenamento allo sforzo. Sviluppo e validazione di device e modalità di training fisico dedicati;
- Individuazione di nuovi biomarkers e loro validazione come indicatori di outcome in aterosclerosi, cardiopatia ischemica, valvolare e scompenso cardiaco;
- Terapie farmacologiche e device innovativi nel trattamento di pazienti per la prevenzione primaria e secondaria delle malattie cardiovascolari;
- Nuovi percorsi educazionali in ambito di stile di vita e compliance terapeutica;
- Modelli organizzativi innovativi per la continuità assistenziale: telemonitoraggio, tele riabilitazione.

## AREE DI RICERCA

CENTRO DI RICERCA  
CLINICA E SPERIMENTALE

## RESPONSABILE

GIUSEPPE ROSANO

## STAFF

A. ANTELMI, D. ARESTIA,  
A. ARMANI, P. BARATTA,  
G. CAMPOLONGO, M.  
CAPRIO, V. D'ANTONI, A.  
DI LUCCIO, L. GATTA, S.  
GORINI, F. IELLAMO, A. LA  
SALA, C. MAMMI, V. MAR-  
ZOLLA, M. MASTRANTO-  
NI, R. MELCHIONNA, G.  
NASSO, L. PONTECORVO,  
N. PUNZO, I. SPOLETINI,  
C. VITALE, L. VITIELLO, CD.  
VIZZA.

Le linee di ricerca del Dipartimento di Scienze Internistiche sono incentrate sui meccanismi di recupero funzionale delle malattie cardiovascolari, cerebrovascolari. La attività di ricerca del Dipartimento sono coordinate dal Centro di Ricerca Clinica e Sperimentale. Tali attività sono volte, in particolare, alla valutazione degli effetti dell'esercizio fisico da solo o in associazione a terapie patogenetiche sul recupero funzionale e metabolico.

Le attività di ricerca sia clinica che sperimentale sono state rivolte verso la identificazione dei meccanismi responsabili del danno d'organo nei pazienti con malattie croniche evolutive e particolarmente quelle cardiovascolari e nell'investigare meccanismi di recupero funzionale associati con i processi riabilitativi, 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. Particolare interesse è stato rivolto a patologie croniche debilitanti ad alto impatto sociale come lo scompenso cardiaco.

Le linee di ricerca del Dipartimento di Scienze Internistiche sono rivolte alla 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 comorbilità 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.
- Utilizzazione 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.

## AREE DI RICERCA

ROBOTICA  
RIABILITATIVA

## RESPONSABILE

PATRIZIO SALE

## STAFF

D. GALAFATI,  
V. LOMBARDI

L'attività di ricerca in ambito della robotica applicata alla riabilitazione ha visto un crescente e notevole incremento in termini di nuovi device sviluppati e sperimentati e pubblicazioni internazionali.

L'IRCCS San Raffaele Pisana nell'anno 2014 si è distinto per la sperimentazione clinica di vari trials come ROBOSCIEKSO "ROBOTics Spinal Cord Injury EKSO", ROBOPARK "Robot Walking Rehabilitation in Parkinson's Disease", MITEEG "Robot-aided Therapy in Stroke Patients for Upper Limb Rehabilitation" e ROBOSTROKE "Robot Walking Rehabilitation in Stroke Patients" per il recupero funzionale dell'arto superiore e del cammino in soggetti con esiti di ictus, spinal cord injury e con disturbi del movimento (come Parkinson e Paralisi Sopranucleare Progressiva). Dal punto di vista ingegneristico, nel 2014 sono stati sviluppati 2 nuovi device robotici per la mano, attivi e passivi: Supervised Care & Rehabilitation Involving Personal Tele-robotics (SCRIPT) e Fingers Extending e Xoskeleton (FEX).

La peculiarità di questi device risiede nella possibilità di essere utilizzati come device a domicilio e in ambito ospedaliero per il recupero funzionale dell'arto superiore. Il device FEX può essere anche utilizzato come ortesi robotizzata nelle attività di vita quotidiana per i soggetti che, a seguito di un deficit neurologico, sviluppano una spasticità di tipo medio o grave che ne limita le attività di vita quotidiana.

FEX è una struttura meccanica indossabile e collegata direttamente alla mano, progettata per guidare i movimenti di estensione delle dita, la necessità clinica più rilevante per soggetti con deficit di origine neurologica. Per raggiungere questo obiettivo sono stati seguiti due criteri principali di progettazione ritenuti essenziali per il successo clinico del sistema robotico: massimizzare la libertà degli utenti adottando soluzioni leggere e non restrittive e ottimizzare l'interfaccia uomo-robot adottando nuove soluzioni che combinassero assistenza meccanica, elettrica (fisiologica) e cognitiva. L'esoscheletro FEX è costruito in modo tale che la sua mobilità corrisponde alla mobilità della mano, con la possibilità di uno scambio di forze naturale e bidirezionale e una reazione di forze tra FEX e la mano umana. Per ottenere un movimento uniforme all'interno dell'area di lavoro dell'esoscheletro e della mano, il dispositivo è stato progettato tenendo in considerazione confini cinematici quali la mobilità delle dita, i gradi di libertà e il poco spazio per il meccanismo. Grazie alla particolare struttura meccanica flessibile sotto-attuata, FEX soddisfa i seguenti requisiti: è facilmente adattabile a qualsiasi configurazione della mano, comprese forme altamente distorte o prossimali iperestese o iperflesse; possiede una configurazione stabile dell'esoscheletro rispetto alle dita garantendo un carico costante e progressivo dalla punta al palmo, senza alcuna concentrazione di carico; mantiene il palmo completamente libero limitando la dimensione e il peso sulla superficie esterna della mano, compatibile con qualsiasi compito quotidiano; corretta libertà di movimento del dito (adduzione/abduzione).

## AREE DI RICERCA

EPIDEMIOLOGIA  
CLINICA E  
MOLECOLARE

## RESPONSABILE

STEFANO BONASSI

## STAFF

S. BOCCIA, V. DALL'ARMI, A. DEL BUFALO, A. FRUSTACI, F. INFARINATO, M. MILIC, R. MORONI, M. NERI, G. PRINZI, P. RUSSO, G. SALINARO

L'attività di ricerca di questa Area è caratterizzata da una visione di insieme sulla patogenesi e sul trattamento delle principali malattie non trasmissibili. La denominazione dell'Area è stata cambiata divenendo Epidemiologia Clinica e Molecolare e riassume competenze ed interessi che spaziano dalla prevenzione alla gestione clinica del paziente, incluso il trattamento farmacologico e, particolarmente, quello riabilitativo.

Per affrontare il duplice impegno di operare sugli eventi precoci delle malattie e sulla parte di interazione con il paziente, l'area è strutturata in due gruppi: a) il laboratorio di Epidemiologia Molecolare e b) l'Unità di Epidemiologia Clinica e Biostatistica. Nel primo vengono esplorati i meccanismi molecolari delle malattie, con particolare attenzione agli aspetti di suscettibilità e di danno genomico precoce, mentre il gruppo di Epidemiologia Clinica e Biostatistica, nel contesto della Direzione Scientifica, fornisce il contributo alla progettazione ed analisi degli studi condotti all'interno dell'area, oltre a fornire un servizio di assistenza a tutte le strutture del San Raffaele nella pianificazione ed analisi statistica degli studi clinici.

L'Area di Epidemiologia Clinica e Molecolare è basata su una componente clinica, per lo più in ambito pneumologico. L'approccio utilizzato è prevalentemente traslazionale in modo da consentire l'integrazione fra valutazioni di ambito prettamente molecolare e l'outcome clinico.

Il consolidamento di collaborazioni esterne con centri di rilevanza internazionale per la Ricerca di Base (biologia molecolare e cellulare) in bronco-pneumologia ha permesso un significativo incremento dei prodotti di ricerca relativi a questa componente. L'esperienza acquisita nel corso di queste collaborazioni, unitamente alla programmazione di progetti di ricerca prospettici e condivisi, rende possibile l'estensione della metodologia finora utilizzata in campo pneumologico ad attività di ricerca traslazionale, anche in altri campi, quali quello cardiologico, delle patologie neurodegenerative, ed in patologie psichiatriche. Ne è un esempio l'attività di ricerca di marcatori molecolari (pattern di infiammazione e stress ossidativi) di outcome e correlazione tra la BPCO e la patologia cardiovascolare, ma anche il ruolo di questi meccanismi nella patogenesi di alcune patologie psichiatriche quali l'autismo.

A partire dal 2013, l'Area di Ricerca ha intrapreso un sostanziale impulso verso la Medicina della Complessità dotandosi di una Piattaforma di dati clinico-epidemiologici associata ad una repository di materiale biologico, denominata San Raffaele Respiratory Diseases Platform, improntata ai principi della Systems Biology e Systems Medicine.

Le attività in quest'ambito sono supportate dalla standardizzazione clinica e dall'attività di laboratorio volta ad ottimizzare la gestione delle risorse a disposizione con una pianificazione che consente lo sviluppo di piani adeguati di trasferimento tecnologico di conoscenze di valore in ambito commerciale. Tale attività è stata allargata a livello Europeo, con alcuni passi di rilievo quali l'inserimento dell'IRCCS san Raffaele Pisana fra i soci fondatori dell'Istituto Europeo di Systems Biology e Systems Medicine, con sede a Lione, Francia. Fra gli scopi principali di questa attività vi è la descrizione dell'outcome riabilitativo con un'ottica di systems medicine, dando quindi rilevanza alla personalizzazione dei risultati ed al coinvolgimento del paziente nelle scelte terapeutiche. Sempre con un approccio personalizzato, la valutazione dei fattori predittivi della risposta

riabilitativa avviene in funzione del singolo paziente, raccogliendo un notevole quantitativo di informazioni, legate sia allo stile di vita che alla compresenza di altre patologie croniche. In ultimo sono stati presentati quest'anno due progetti che ricostruiscono la storia espositiva dei pazienti con BPCO (Exposomics) per valutarne il ruolo nella progressione e severità della patologia.

Gli interessi scientifici del gruppo includono gli aspetti di potenziale trasferibilità (tecnologica e gestionale) verso il Sistema Sanitario Regionale. In quest'ambito l'interesse del gruppo è anche testimoniato dalla partecipazione ad un progetto finanziato dal Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero legato alla identificazione, codifica e management clinico organizzativo della complessità in medicina.

La collaborazione scientifica con il reparto di riabilitazione respiratoria si realizza anche tramite l'attività di ricerca clinica sponsorizzata centrata essenzialmente sulla valutazione della fattibilità, sicurezza ed efficacia di trattamenti farmacologici investigativi. 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.

L'area di Ricerca ha espresso inoltre un importante impegno nel campo della geriatria, con particolare attenzione alla appropriatezza delle prescrizioni farmaceutiche negli anziani. Quest'attività si è svolta in collaborazione con AIFA, tramite la partecipazione alle attività del Geriatric Working Group e utilizzo dei dati OsMed. Nel corso del 2014 è stato pubblicato un primo lavoro nel quale sono stati individuati 13 indici di inappropriatezza che hanno dimostrato come una larga parte di questa popolazione riceva terapie non appropriate (Onder et al, J Gerontol A Biol Sci Med Sci., 2014).

Un altro importante progetto in ambito geriatrico è il progetto Sc@rabeo, un database multidimensionale mirato a raccogliere e gestire dati (attualmente solo clinici) da tutti i pazienti geriatrici ricoverati nelle RSA del gruppo (oltre 1200 posti letto). Questa attività è stata condotta in collaborazione con un gruppo nazionale di ricerca geriatrica nell'ambito di due progetti AIFA. Nel corso dell'anno è stato inoltre concluso e pubblicato uno studio mirato ad 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.

In particolare sono stati pubblicati dati sul ruolo dei telomeri (Marzetti et al., Front Aging Neurosci, 2014). Sempre con lo stesso set di dati sulla fragilità sono in corso analisi per valutare il ruolo del danno al DNA (Università di La Coruña, Spagna) e del proteoma, valutato con analisi calorimetriche (Università di Louisville, USA).

Infine quest'anno il responsabile dell'area è stato nominato dal Ministero come rappresentante Italiano nel comitato di coordinamento di un progetto COST dedicato all'ageismo, il cui PI è la Prof.ssa Lyat Ayalon, dell'Università Bar Ilan, Israele.

## A) Laboratorio di Epidemiologia Clinica e Molecolare

Nel corso dell'anno si sono conclusi e sono proseguiti vari studi di popolazione. Conclusi i due grandi studi GWAS pubblicati nel corso del 2013, è proseguita la raccolta dei campioni e delle informazioni dei soggetti esposti ad amianto, come previsto dal protocollo dello studio finanziato da un grant INAIL. Il progetto, coordinato dalla unità in collaborazione con le Università di Genova, Firenze, e Pisa si è concluso a settembre ed i dati sono in corso di analisi.

Le attività di questo gruppo di maggior rilievo consistono nel coordinamento epidemiologico di due progetti collaborativi internazionali, rispettivamente sull'instabilità genomica (HUMN) e sul danno al DNA (ComNet). Sebbene avviato da molti anni il progetto HUMN (Human Micro-nucleus) continua a produrre evidenze. Nel corso dell'anno in particolare è stato pubblicato un articolo che affronta in dettaglio tutte le problematiche relative all'uso del test del micronucleo nei linfociti periferici (Kirsch-Volders et al., Rev Mutat Res, 2014). Contemporaneamente è in corso la stesura di uno special issue sull'uso del test del Micronucleo per monitorare l'esposizione occupazionale e ambientale. HUMN ha un data set di circa 12.000 persone e coinvolge circa 50

laboratori internazionali che collaborano alle attività proposte dallo steering committee ([www.HUMN.org](http://www.HUMN.org)). Il secondo progetto è dedicato alla validazione del test della Cometa. Si tratta di un saggio di danno e riparo del DNA molto usato in studi di popolazione e sempre più anche in clinica. Il progetto ComNet ([www.comnetproject.org](http://www.comnetproject.org)) lanciato nel 2013 coinvolge circa 100 laboratori in tutto il mondo con un dataset potenziale di alcune decine di migliaia di soggetti. Il position paper pubblicato nel marzo 2014 ha già raccolto 11 citazioni.

#### B) Unità di Epidemiologia Clinica e Biostatistica

L'attività dell'Unità si è prevalentemente concentrata sulla funzione di supporto metodologico alle diverse strutture del San Raffaele o esterne, incluso varie realtà internazionali. Sono stati analizzati e pubblicati studi con le unità di Riabilitazione Respiratoria, Cardiologica, e Neurologica. Con il Centro dedicato alla malattia di Parkinson e ai disturbi del movimento sono stati avviati studi epidemiologici sul ruolo della familiarità e dei fattori di rischio occupazionali in pazienti affetti da morbo di Parkinson, finanziati tra gli altri da un grant INAIL. Con il Centro dedicato allo studio delle cefalee e del dolore sono stati analizzati dataset clinici di pazienti con cefalea oltre alla stesura di una review sul ruolo del danno ossidativi come possibile marcatore della patologia. Una importante attività del gruppo degli statistici è legata alle analisi bibliometriche. Si tratta di un settore di grande importanza che, tramite una analisi mirata della letteratura, permette di quantificare e caratterizzare la produzione scientifica in un settore e orientare le scelte dei ricercatori. Temi recenti sono stati: la produzione scientifica in riabilitazione respiratoria, in oncologia, in cardiologia e per le malattie neurodegenerative. Da alcuni anni si è consolidato il ruolo del gruppo degli statistici come consulenti per l'analisi di studi (specialmente di epidemiologia molecolare) di grande complessità. Ad esempio, in questi ultimi due anni ricercatori dall'Istituto di igiene pubblica di Porto, Portogallo e dell'Università di Coruña, Spagna, hanno trascorso alcuni mesi a Roma per analizzare i loro dati. Questa attività ha generato una intensa produzione scientifica.

Tutto il gruppo è da tempo attivamente impegnato in attività di formazione. A fronte di impegni nella realizzazione di corsi FAD quali, ad esempio, il corso sulla appropriatezza prescrittiva in pazienti anziani per il progetto ELICADHE in collaborazione con l'Istituto Mario Negri di Milano, vi è l'organizzazione di corsi residenziali di Epidemiologia molecolare per PostDoc e studenti PhD in Italia e vari altri paesi (es. Portogallo, Turchia, Spagna). A questi eventi si aggiunge l'impegno in corsi permanenti come il master in Epidemiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma e, più recentemente, l'incarico da parte della FIMMG di formare i Medici di Famiglia su temi epidemiologici e statistici.

#### COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE:

Oltre alle collaborazioni istituzionali, sono in essere anche le collaborazioni scientifiche per alcuni ambiti specifici di ricerca per lo sviluppo di nuovi progetti, la partecipazione a bandi ricerca e per la stesura di pubblicazioni scientifiche, quali ad esempio:

- Università Cattolica del Sacro Cuore: Istituto di Neurologia, Divisione di Chirurgia Toracica ed Istituto d'Igiene (Formazione; Collaborazione nella gestione degli specializzandi; analisi statistica dei dati provenienti da studi epidemiologici; Conservazione di campioni biologici).
- Università di Maastricht, Paesi Bassi - Formazione: Corso per giovani investigatori di Epidemiologia Molecolare.
- Hebrew University Gerusalemme, Israele - Jerusalem's Edmond and Lily Safra Center for Brain Sciences - collaborazione con la Prof. ssa Hermona Soreq per studi sulla eziologia e patogenesi delle malattie neurodegenerative.
- Università di Bologna - Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie – Collaborazione con il Prof. Alessandro Serretti per la conduzione di studi di suscettibilità genetica in pazienti psichiatrici.
- University of California, Irvine - Laboratory of Molecular Psychiatry, Psychiatry & Human Beha-

avior; School of Medicine Center for Epigenetics and Metabolism - Collaborazione con il Prof. Fabio Macciardi per studi di suscettibilità genetica in pazienti psichiatrici.

- Ospedale San Filippo Neri, Roma
- European Institute for Systems Biology and medicine, Lyon, Francia -Collaborazione nell'utilizzo di tecniche high throughput in studi di Systems medicine
- AFAR, Isola Tiberina, Roma (Collaborazione su studi di bibliometria) Dott. Patrizio Pasqualetti
- University of Copenhagen, DK (partecipazione al progetto SCRIPT e conduzione di studi ICT)
- IRCCS Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genova (Accordo quadro per la conduzione di progetti di Epidemiologia Molecolare)
- Genome Health and Personalised Nutrition Laboratory, University of South Australia, Flinders University, University of Adelaide, Adelaide, Australia (Coordinamento congiunto del progetto internazionale HUMN ([www.humn.org](http://www.humn.org)))
- University of California, Berkeley, California USA (Coordinamento congiunto del progetto internazionale HUMN ([www.humn.org](http://www.humn.org)))
- Institute for Medical Research and Occupational Health Zagreb, Croazia (Studi su predittori cromosomici precoci di cancro)
- Gazi University. Pharmacy, Toxicology Department, Ankara, Turkey (Scambio di personale e organizzazione di conferenze)
- Department of Nutrition, University of Oslo, Oslo, Norway (Coordinamento congiunto progetto internazionale ComNet ([www.comnetproject.org](http://www.comnetproject.org)))

## AREE DI RICERCA

DISABILITÀ  
DELLO SVILUPPO

## RESPONSABILE

GIORGIO ALBERTINI

## STAFF

G. BRUNNER, C. CONDOLU-  
CI, A. CORBELLINI, E. CHIO-  
DI, G. DI GIROLAMO, M.  
GALLI, E. GIULITTI, M. JANI-  
CKI, G. LA MALFA, L. MAJO-  
LINI, P. ONORATI, G. ORSINI,  
C. THELLUNG, N. TENORE.

Il Dipartimento di Scienze delle Disabilità Congenite ed Evolutive Motorie e Sensoriali dell'IRC-  
CS San Raffaele Pisana ha svolto nel 2014 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 cog-  
nitiva. Nello specifico, si pone attenzione alle funzioni neuropsicologiche di base, come le funzioni  
esecutive e le prassie. Di particolare rilevanza sono gli studi sui correlati neurofisiologici e neuro-  
biologici 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.

## AREE DI RICERCA

ORGANIZZAZIONE E  
GESTIONE DEI SERVIZI

## RESPONSABILE

NATALE SANTUCCI

## STAFF

E. PASCAZIO

La gestione della persona con malattia cronica e con disabilità necessita di protocolli e linee gui-  
da definite e condivise.

La Clinical Governance, intesa come razionalizzazione e organizzazione della diagnosi e della te-  
rapia 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 vin-  
coli 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'individu-  
azione e alla valutazione degli aspetti essenziali al miglioramento della qualità dei trattamenti  
- dall'accezione più prettamente organizzativo-gestionale a quella più specificamente clinico-ri-  
abilitativa.

Gli obiettivi che l'Area di ricerca si prefigge sono:

1. Formulazione del PARM (Piano Aziendale di Risk Management);
2. Regolamento C.C.I.O. (Controllo Comitato Infezioni Ospedaliere).

## AREE DI RICERCA

BIOTECNOLOGIE  
AVANZATE

## RESPONSABILE

FIORELLA GUADAGNI

## STAFF

J.ALESSANDRONI, R.  
D'ALESSANDRO, D.  
DELLA MORTE, P.FER-  
RONI, 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 identificare nuovi fattori in grado di influenzare la risposta al trattamento riabilitativo, nonché il recupero e la qualità di vita di pazienti con patologie croniche disabilitanti. In particolare, l'applicazione clinica di tecniche di genomica e l'analisi di modelli di rischio potrebbe rivelarsi estremamente utile all'inquadramento clinico e prognostico non solo nella valutazione del rischio di insorgenza di patologie future, ma anche, e soprattutto, durante il trattamento riabilitativo del paziente orientato a creare uno stile di vita che, almeno in linea teorica, dovrebbe prevenire ulteriori manifestazioni. Inoltre, la possibilità fornita dalle moderne tecniche di farmacogenomica (attraverso l'integrazione tra le conoscenze genetiche e quelle sugli effetti dei farmaci) di predire per ogni paziente la mancata risposta al trattamento farmacologico, o di individuare l'insorgenza di effetti indesiderati, potrebbe permettere l'applicazione in tempi rapidi di protocolli terapeutici ottimizzati per ogni singolo paziente ed un uso razionalizzato dei farmaci.

In tale contesto, si collocano i progetti di ricerca corrente afferenti all'Area di Biomarker Discovery e Biotecnologie Avanzate (BioDAT), il cui obiettivo principale è l'analisi di determinanti di outcome in 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 il rischio di insorgenza di eventi futuri, la 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.

Progetto BioBIM: BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM)

Il notevole sviluppo delle biotecnologie ha determinato un parallelo avanzamento delle conoscenze ed un consequenziale progresso nel settore della biomedicina. Alcuni settori hanno visto il maggior sviluppo per quanto riguarda il trasferimento dalla ricerca di base alla applicazione clinica. Tra questi, la biologia molecolare che con l'avvento delle scienze "omiche" (genomica, proteomica, trascrittomica, metabolomica, interattomica, ecc.) ha determinato un impatto di rilievo sulla diagnostica di laboratorio.

Considerate le potenzialità applicative di questi settori, si può comprendere il notevole interesse della ricerca biomedica nei confronti delle "Banche Biologiche". Infatti, il rapido successo di molti studi 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. Pertanto, la disponibilità di campioni biologici ha oggi assunto un ruolo cruciale nel campo della ricerca biomedica, da quella di base a quella finalizzata, dalla comprensione dei meccanismi etio-pato-

genetici, dei fattori prognostici/predittivi, e dei parametri diagnostici, alla suscettibilità alla terapia. 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". Essa rappresenta un centro di riferimento interistituzionale, in quanto consente la partecipazione alla realizzazione della BioBanca a strutture periferiche che non dispongono delle infrastrutture dedicate. La BioBIM rappresenta, pertanto, un network di strutture sanitarie pubbliche e private, ognuna di esse punto di riferimento e di eccellenza nel settore specifico, che ha determinato la possibilità di realizzare nel corso del tempo numerosi progetti di ricerca traslazionale interistituzionali, cui ha fatto seguito una considerevole produzione di pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali.

Attualmente afferiscono alla BioBIM alcune Strutture Sanitarie e di Ricerca: Sovrano Ordine Militare dei Cavalieri di Malta (ACISMOM), Azienda Ospedaliera San Camillo Forlanini di Roma, ASL 2 di Salerno, Azienda Ospedaliera "Complesso Ospedaliero San Giovanni Addolorata" di Roma, l'area vasta Romagna e I.S.T., la Stroke Unit dell'Università degli studi di Perugia ed il San Raffaele Cassino. In tale ottica sono state stipulate apposite convenzioni nelle quali sono formalizzate modalità e 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, al fine di studiare i processi etio-patogenetici nella loro complessità e dinamicità (Patologie Cardiovascolari e Respiratorie, Patologie Neurodegenerative, Patologie Oncologiche, Patologie dello sviluppo motorio e cognitivo, Patologie Rare).

## COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE:

- Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Unità Operativa di Oncologia Medica, Dipartimento di Medicina Interna
- Università degli Studi di Roma "Sapienza", Dipartimento di Scienze Cardiovascolari
- Università degli Studi "G. D'Annunzio" Chieti - Pescara, Dipartimento di Medicina Interna
- National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA - Laboratory of Tumor Immunology and Biology, diretto dal Dr. Jeffrey Schlom, per uno studio disegnato allo scopo di analizzare l'espressione della proteina Brachyury, un induttore di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) in cellule di carcinoma mammario umano, al fine di verificarne l'idoneità quale bersaglio molecolare in protocolli di immunoterapia. Infatti, la capacità di linee di cellule T Brachyury-specifiche di lisare cellule tumorali Brachyury-positivo in vitro, sostiene lo sviluppo di approcci immunoterapeutici basati sulla positività per Brachyury, nel trattamento del carcinoma della mammella. Altri studi sono in corso di esecuzione, i cui dati preliminari sono stati discussi nel corso della visita in qualità di Consultant della Prof. Guadagni e della Prof. Ferroni presso il Laboratory of Tumor Immunology and Biology - Center for Cancer Research - National Cancer Institute - National Institute of Health (NIH) - U.S. Department of Health and Human Services (Ottobre 2014).

## AREE DI RICERCA

DIAGNOSTICA PER  
IMMAGINI

## RESPONSABILE

ALBERTO PIERALLINI

## STAFF

M. DE SANTIS, E. FERONE,  
G. SIMONELLI,  
C. SETTECASI,  
D. VRICELLA

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 all'Istituto, che esterne quali l'Università degli Studi di Roma Sapienza e 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.

## AREE DI RICERCA

BRAIN CONNECTIVITY  
ROBOTICA  
SPERIMENTALE

## RESPONSABILE

FABRIZIO  
VECCHIO  
FRANCESCO  
INFARINATO

## STAFF

F. MIRAGLIA

Il laboratorio si occupa della valutazione dei network cerebrali attraverso lo studio della connettività funzionale, strutturale ed effettiva.

L'attività è specificatamente rivolta alla valutazione delle modulazioni di questi network dovuti a patologie neurodegenerative e non (come, ad esempio, in pazienti affetti da Alzheimer, epilessia, sclerosi multipla, Parkinson, Stroke) come anche al trattamento terapeutico e di riabilitazione motoria o cognitiva (ad esempio in Alzheimer, Stroke, etc).

Le metodiche di acquisizione utilizzate sono: dati elettroencefalografici (EEG) anche ad alta risoluzione, dati di risonanza magnetica sia strutturale (MRI) che funzionale (fMRI), registrazioni simultanee di dati elettroencefalografici e stimolazione elettrica e magnetica (EEG-TMS, EEG-tDCS, EEG-tACS).

Le maggiori innovazioni apportate dalle ricerche riguardano principalmente l'approccio multimodale alla patologia e l'integrazione tra dati di origini diverse (come quelli elencati), ma sono relative anche alla registrazione durante il movimento. Inoltre, con il supporto della Gait analysis, i dati provenienti da test neuropsicologici e clinici permettono una correlazione con le valutazioni neurofisiologiche per seguire il paziente durante la progressione della malattia o il recupero funzionale e cognitivo. Ciò è reso possibile anche dall'utilizzo di nuovi approcci di riabilitazione come quelli legati a compiti cognitivi e stimolazioni magnetiche ed elettriche, mirati allo specifico recupero cognitivo di determinate aree cerebrali.

Tutto ciò è ottenuto grazie a l'utilizzo di moderne tecniche di analisi che vengono utilizzate nel Laboratorio, come le valutazioni delle sorgenti corticali cerebrali, la loro interazione funzionale e le loro interconnessioni strutturali, ma anche grazie allo sviluppo e all'implementazione di nuovi algoritmi di calcolo basati su applicazioni d'avanguardia della teoria dei grafi.

Il laboratorio inoltre è impegnato nella disseminazione dei risultati ottenuti dagli studi mediante la stesura pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali e tramite la partecipazione a congressi scientifici del settore.

## AREE DI RICERCA

BIOCHIMICA  
DELL'INVECCHIAMENTO

## RESPONSABILE

MARIA ROSA CIRIOLO

## STAFF

K. AQUILANO,  
S. BALDELLI,  
G. TATULLI

Il laboratorio focalizza gli interessi di ricerca prevalentemente su:

### A. Funzionalità mitocondriale in modelli in vitro ed in vivo di invecchiamento

Durante l'invecchiamento si osserva una progressiva perdita della funzionalità mitocondriale che sembra essere principalmente causata da: 1) calo della difesa antiossidante; 2) diminuzione della produzione di ATP (es. diminuzione dell'efficienza della catena di trasporto, calo di Bcl-2); 3) ossidazione/nitrazione delle proteine; 4) accumulo di mutazioni all'mtDNA; 5) deficit nell'importo di proteine nel mitocondrio. Nelle cellule nervose, a questi eventi va aggiunta anche una forte diminuzione dell'incorporazione di glucosio, che si ripercuote fortemente sull'efficienza bio-energetica della cellula.

I mitocondri irreversibilmente compromessi possono essere adeguatamente eliminati e rigenerati per inibire l'insorgere del processo apoptotico e garantire la sopravvivenza cellulare. Il turnover mitocondriale è regolato dall'avvicinarsi di due processi:

1) biogenesi, fissione (sintesi di nuovi mitocondri);

2) autofagia (autodigestione lisosomiale di mitocondri invecchiati e mal funzionanti: mitofagia).

Studi recenti hanno dimostrato che durante l'invecchiamento si assiste ad una graduale diminuzione dell'efficienza di entrambi questi processi. In particolare, il blocco dell'autofagia è imputabile all'accumulo di prodotti di scarto non digeribili (lipofuscina o 'ceroidi'), derivanti dal processo di smaltimento dei mitocondri (ed altri organelli) invecchiati, all'interno dei lisosomi. Il blocco della biogenesi sembra essere invece dovuto ad una diminuzione della sintesi di Ossido Nitrico (NO) che rappresenta il più importante mediatore di tale processo. In particolare, l'NO promuove l'espressione GMPc-dipendente dell'enzima PGC1 $\alpha$ , a monte del processo di segnalazione che culmina nella proliferazione mitocondriale.

Questa linea di ricerca dell'unità ha come intento principale quello di studiare le vie di segnalazione redox alla base dell'induzione del processo di autofagia e/o biogenesi mitocondriale, allo scopo: i) individuare possibili target cellulari per prevenire o ritardare l'invecchiamento e la morte neuronale; ii) individuare molecole naturali (nutraceutici) in grado di inibire la morte neuronale favorendo il ricambio mitocondriale attraverso l'induzione dell'autofagia/biogenesi.

### B. Ruolo dell'alterazione redox (stress ossidativo) durante l'invecchiamento

Nonostante il ruolo dell'alterazione redox (stress ossidativo) durante l'invecchiamento di modelli animali sia un argomento ampiamente riconosciuto, sono ancora pochi gli studi a livello clinico mirati ad individuare molecole redox quali bio-markers associati all'invecchiamento e/o a patologie correlate. Inoltre, poco è ancora noto sulla specificità delle vie di segnalazione cellulari in risposta a stimoli redox differenti (ad es. over-produzione di specie radicaliche o stress da over-load da disolfuri). Tuttavia, è ben noto che lo stato di ossidazione (potenziale redox) dei tioli

extracellulari (glutazione, cisteina, omocisteina, proteine solforate) risente in maniera ampiamente documentata della dieta (rapporto ossidanti/antiossidanti) e di molte patologie quali malattie metaboliche, neurodegenerative, cardio-vascolari e muscolo-scheletriche. D'altra parte la dieta dell'anziano è notoriamente insufficiente per quanto riguarda l'apporto di proteine ad alto valore nutrizionale, minerali come rame e selenio essenziali per l'azione di enzimi antiossidanti e alimenti vegetali ricchi di vitamine e non-nutrienti (polifenoli) antiossidanti.

Questa linea ha come intento principale quello di analizzare in vitro la specificità delle vie di segnalazione cellulari a stress ossidativo di varia natura e come queste possano determinare differenti risposte (morte o sopravvivenza), specialmente a livello neuronale, muscolare e del tessuto adiposo.



## AREE DI RICERCA

ELETTROFISIOLOGIA

## RESPONSABILE

ELEONORA  
PALMA

## STAFF

C. ROSETI

Il laboratorio si occupa principalmente delle seguenti tematiche:

A. Lo studio dei meccanismi molecolari dell'epilettogenesi.

L'interesse della ricerca è volto a caratterizzare il ruolo dei recettori GABAA in tessuti cerebrali di pazienti affetti da epilessia farmacoresistente. In particolare, viene studiato il fenomeno della desensitizzazione del recettore GABAA (run-down), una caratteristica che nei pazienti affetti da epilessia del lobo temporale è significativamente aumentata. Lo studio del meccanismo che sottende questo alterato fenomeno, risulta essere molto importante, in quanto potrebbe aprire la strada per la scoperta di nuove molecole farmacologiche in grado di contrastarlo, permettendo il riequilibrio tra trasmissione eccitatoria ed inibitoria. Questa parte della ricerca è svolta grazie a collaborazioni nazionali ed internazionali, tra le quali il Dipartimento di Neuropatologia dell'Università di Amsterdam e l'Università di Ferrara. Inoltre, in collaborazione con l'IRCCS Mario Negri di Milano, ulteriore interesse del laboratorio, è lo studio del ruolo dell'infiammazione nell'epilessia farmacoresistente con particolare attenzione all'azione modulatrice di citochine e chemochine, rilasciate nel sistema nervoso durante un attacco epilettico, sulla funzionalità del recettore GABAA.

B. Funzione di recettori nicotinici muscolari in pazienti affetti da SLA.

Questa ricerca, in collaborazione con il Centro per la SLA, dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Umberto I, e con Irvine University, CA, USA, è volta a comprendere le differenze molecolari esistenti nella composizione del suddetto recettore e di come queste siano in grado di alterare la sua funzionalità nelle fibre muscolari di pazienti affetti da SLA. Inoltre, con la stessa tecnica, viene valutata l'effettiva efficacia di diversi trattamenti terapeutici a cui i pazienti vengono sottoposti, e di come questi siano in grado di modificare la composizione e la funzionalità recettoriale nel tempo.

## AREE DI RICERCA

PATOFISIOLOGIA  
DELLA CACHESSIA E  
METABOLISMO DEL  
MUSCOLO SCHELETRICO

## RESPONSABILE

ELISABETTA FERRARO

## STAFF

A. FERACO, L. GATTA, S. GO-  
RINI, F. MOLINARI, L. PONTE-  
CORVO, L. VITIELLO

In linea con l'attività di ricerca clinica, la ricerca preclinica e traslazionale svolta nel laboratorio si occupa di studiare meccanismi fisiopatologici, metabolici e molecolari in organi rilevanti ai fini della riabilitazione in malattie cardiovascolari/neurodegenerative/polmonari e di validare strumenti farmacologici a supporto della funzionalità di tali organi.

In particolare il laboratorio si occupa: A) del muscolo scheletrico e B) della maturazione neuronale.

A. Il muscolo scheletrico

Il muscolo scheletrico è un organo chiave nella messa a punto delle terapie riabilitative in caso di malattie cardiovascolari, neurodegenerative e polmonari. L'obiettivo principale degli studi sul muscolo scheletrico è l'analisi dell'effetto di molecole che funzionano come modulatori del metabolismo sulla funzionalità e sulla massa muscolare, nell'ottica di un loro possibile utilizzo nel trattamento di pazienti con disordini caratterizzati da perdita della massa muscolare (Ferraro et al. Antioxidants & redox signaling 2014). L'atrofia muscolare associata alle malattie croniche viene definita cachessia. Sia la forza che la massa muscolare si riducono in molte malattie croniche a carico di vari organi (scompenso cardiaco, BPCO, cancro ecc..) e nel corso dell'invecchiamento. Nel laboratorio è in corso la valutazione dell'effetto di alcuni modulatori del metabolismo sulla massa e sulla funzionalità muscolare di modelli murini di cachessia e di invecchiamento. In particolare, si valuta la capacità di alcuni modulatori metabolici di ottimizzare il metabolismo del muscolo scheletrico e di contrastare l'atrofia muscolare e quindi aumentare la forza muscolare nelle condizioni patologiche riassunte dai modelli murini. E' stata già confermata la capacità della trimetazidina (TMZ) di proteggere cellule muscolari in coltura dall'atrofia (Ferraro et al. The FEBS journal. 2013). E' stato inoltre osservato un aumento delle performance fisiche sia in modelli murini di invecchiamento trattati con TMZ, che in modelli murini di cachessia soggetti allo stesso trattamento.

Il ruolo dell'apoptosi e dell'autofagia in seguito al trattamento con modulatori metabolici è, inoltre, oggetto di studio. Si è ipotizzato che l'effetto dei modulatori metabolici sul muscolo scheletrico possa essere mediato dalla loro capacità di modulare l'autofagia e l'apoptosi; questa capacità potrebbe contrastare l'atrofia muscolare tipica di alcune condizioni patologiche. Ci si propone inoltre di individuare i sensori metabolici attivati dai modulatori metabolici usati e le conseguenze della loro attivazione a livello trascrizionale e di attivazione genica. In particolare, si studia PGC-1alfa e AMPK e il loro ruolo e la loro correlazione con l'autofagia e l'apoptosi.

Sono stati, infine, identificati la rigenerazione del muscolo scheletrico e il differenziamento dei mioblasti come potenziali meccanismi-bersaglio del modulatore metabolico TMZ. La TMZ potenzia entrambi i meccanismi che sono fondamentali per il mantenimento della massa (e quindi della forza) muscolare sia in condizioni di cachessia sia nell'invecchiamento. Ciò rende questa classe di farmaci interessanti per la messa a punto di terapie riabilitative in molteplici condizioni caratterizzate da atrofia muscolare.

Recentemente, è stata attivata una nuova collaborazione per lo studio del recettore purinergico P2X7 nella patogenesi della cachessia tumorale. P2X7 è un recettore dell'ATP extracellulare che ha un ruolo importante nell'infiammazione. Si ritiene che potrebbe anche avere un ruolo nel differenziamento muscolare e, come tale, essere verosimilmente in grado di influenzare la progres-

sione della cachessia.

B. Maturazione neuronale: allungamento dell'assone

La maturazione neuronale prevede l'emissione di prolungamenti che si distinguono in svariati dendriti e un solo assone. E' stato scoperto un nuovo ruolo della proteina apoptotica Apaf1 che si è rivelata necessaria per una corretta maturazione dell'assone e, verosimilmente per una corretta neurogenesi.

Apaf-1 è una proteina chiave nel processo apoptotico. Essa è la molecola adattatrice attorno cui si assembla l'apoptosoma, il complesso multiproteico che promuove l'attivazione delle caspasi. Recentemente è stato suggerito un ruolo aggiuntivo per Apaf-1; è stato dimostrato che Apaf-1 media il corretto funzionamento del centrosoma. In particolare, è stato osservato che la delezione di Apaf-1 rallenta la divisione cellulare e altera la migrazione cellulare, processi entrambi dipendenti dal citoscheletro e dal centrosoma. Il centrosoma è considerato l'organizzatore del citoscheletro nella specificazione assonale e quindi Apaf1 influenza anche la maturazione neuronale. Per questo studio sono stati utilizzati sia approcci in vitro che approcci in vivo. Nello specifico sono stati usati topi Apaf-1-KO e cellule corticali primarie prelevate da questi topi a stadio embrionale. Lo studio e l'identificazione di nuove molecole coinvolte nell'assogenesi contribuisce a comprendere le cause di anomalie neurologiche causate da condizioni di stress durante lo sviluppo embrionale.

### COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE

- Università degli Studi di Torino - Collaborazione con la Prof.ssa Paola Costelli, relativamente alla generazione e analisi di modelli murini C26 di cachessia tumorale e al ruolo di P2X7 nella rigenerazione muscolare.
- CNR-Roma-Collaborazione con la Dr.ssa Maria Teresa Ciotti, relativamente all messa in coltura di neuroni corticali primari KO per Apaf1.
- Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen - Collaborazione con la Dr.ssa Daniela De Zio, relativamente allo studio del ruolo di Apaf1 nella maturazione assonale.
- Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen - Collaborazione con il Dr. Giuseppe Filomeni, relativamente allo studio del ruolo della deficienza di S-nitrosoglutatione riduttasi nelle disfunzioni neuro-muscolari e allo studio del ruolo di Apaf1 nella maturazione assonale.
- ISS-Roma- Collaborazione con il Prof. Walter Malorni, relativamente allo studio del ruolo dell'autofagia e dell'apoptosi nella cachessia in seguito a trattamento con modulatori metabolici.
- Università Magna Grecia, Catanzaro - Collaborazione con la Dr.ssa Natalia Malara, relativamente allo studio delle cellule endoteliali circolanti nella cachessia.
- Charite, Berlino - Collaborazione con il Prof Wolfram Döhner, relativamente all' analisi di biopsie muscolari umane di soggetti CHF cachettici.
- Castle Hill Hospital, Hull - Collaborazione con il Dr. Pierpaolo Pellicori, relativamente all'analisi di biopsie muscolari umane di soggetti CHF cachettici.
- Università Tor Vergata, Roma - Collaborazione con il Dr. Cesare Gargioli, relativamente all'analisi del ruolo dei modulatori del metabolismo nella messa a punto di muscoli artificiali.
- Università Sapienza, Roma - Collaborazione con il Prof. Maurizio Muscaritoli, relativamente all'analisi di sieri umani di soggetti con cachessia tumorale e cachessia cardiogena.
- Università La Sapienza, Roma - Collaborazione con il Prof. Antonio Musarò, relativamente all'analisi della forza di muscoli murini trattati con trimetazidina.

## AREE DI RICERCA

FARMACOGENETICA

## RESPONSABILE

RAFFAELE PALMIROTTA

Il settore di Farmacogenetica Molecolare, afferente all'Area di Biomarker Discovery and Advanced Technologies (BioDAT) dell'IRCCS San Raffaele Pisana, rappresenta una unità specialistica dedicata ad analisi di Genetica e Biologia Molecolare. La principale attività del laboratorio consiste nella validazione di nuovi determinanti di outcome e di efficacia terapeutica, tramite l'identificazione di varianti di sequenza genica associabili ad un particolare decorso clinico della patologia o a differenti risposte alla terapia farmacologica (farmacogenetica).

Il fondamentale obiettivo delle linee di ricerca del Laboratorio è rappresentato dalla realizzazione di studi di associazione genetica caso-controllo e dall'identificazione di nuovi marcatori genetici correlati ai meccanismi etio-patogenetici o a particolari aspetti clinici delle patologie croniche, disabilitanti ed età-correlate. Questi studi presentano il duplice scopo di mettere a punto trattamenti farmacologici personalizzati ("targeted therapy") e sviluppare misure preventive e/o di sorveglianza clinica per evitare l'insorgenza della patologia nei soggetti a "rischio genetico". Infine, l'aspetto più innovativo del Laboratorio è legato alla realizzazione di studi di "nutrigenetica", finalizzati alla individuazione di quegli alimenti o integratori in grado di favorire la prevenzione o la "terapia naturale" della patologia, in base al peculiare background genetico del paziente. Grazie all'esteso campionamento avviato da diversi anni presso la Biobanca InterIstituzionale Multidisciplinare (BioBIM) dell'IRCCS San Raffaele Pisana, è stato possibile collezionare campioni appartenenti ad individui con caratteristiche cliniche e socio-demografiche dettagliate e documentate per i quali, oltre all'effetto dei fattori ambientali, si presuppone una particolare predisposizione di tipo genetico/familiare alle suddette patologie. Il carattere multidisciplinare di questa attività ha inoltre consentito l'instaurarsi di diverse collaborazioni con numerosi enti di ricerca. A partire dal 2008, infatti, tutti i pazienti emicranici afferenti al Centro Cefalee dell' IRCCS San Raffaele Pisana, sono stati sistematicamente reclutati con lo scopo di istituire una sezione della BioBanca dedicata all' emicrania, una patologia molto diffusa e considerata tra le più invalidanti a livello mondiale. Sono già stati realizzati degli studi sulla correlazione tra polimorfismi dei geni PRNP, ACE, SOD2, PGR, COMT e particolari aspetti fenotipici ed eziopatogenetici dell'emicrania. In ambito oncologico, il laboratorio annovera molteplici collaborazioni con il gruppo dell' Unità Medica Oncologica dell' Università di Roma di "Tor Vergata", con il quale sono stati portati avanti studi procedurali, di suscettibilità farmacologica e di analisi mutazionale dei geni cKIT e PDGFRA in pazienti affetti da tumore stromale gastrointestinale (GIST) e dei geni K-ras, BRAF e VEGF in pazienti affetti da cancro colonrettale metastatico (mCRC). In collaborazione con il Dipartimento di Medicina Molecolare dell'Università "Sapienza" di Roma sono stati realizzati degli studi di associazione tra lo stato mutazionale dei geni PRKCSH e PAI1 e l'instabilità dei microsatelliti in pazienti affetti da carcinoma gastrico. Di recente, inoltre, il laboratorio ha partecipato ad uno studio sul ruolo dell'analisi mutazionale dei geni EGFR, K-ras, BRAF, c-KIT e PDGFRA nella definizione di terapie personalizzate in pazienti affetti da varie forme di cancro (Carcinoma non a piccole cellule-NSCLC, GIST e mCRC), in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Interna e Oncologia Clinica dell'Università "Aldo Moro" di Bari.

Attualmente è in corso una collaborazione con il Dipartimento di Scienze Cardiovascolari, Respiratorie, Geriatriche, Anestesiologiche e Nefrologiche del "Policlinico Umberto I" di Roma, che

ha già prodotto importanti risultati sull'associazione tra polimorfismi dei geni KCNJ11, SCN5A e NOS3, la patofisiologia delle disfunzioni coronariche microvascolari e la cardiopatia ischemica, e sulla suscettibilità alla terapia in pazienti cardiologici in base allo specifico genotipo esibito dal gene CYP2C19.

## AREE DI RICERCA

PATOLOGIE  
CRONICO-DEGENERATIVE

## RESPONSABILE

ANNA TERESA PALAMARA

## STAFF

D. LIMONGI, S. PANELLA, R.  
SGARBANTI

Il laboratorio ha come obiettivo principale quello di individuare e caratterizzare il ruolo di vari microrganismi nella patogenesi e nell'evoluzione di diverse patologie tipiche dell'anziano. Tra queste sono considerate sia quelle di natura francamente infettiva (ad esempio, infezioni respiratorie croniche), sia quelle cronic-degenerative (ad esempio, malattia di Alzheimer e di Parkinson) per le quali è stato recentemente dimostrato il ruolo patogenetico di alcuni agenti infettivi.

Il razionale su cui si fondano gli studi portati avanti nel laboratorio si basa sulla osservazione secondo la quale la suscettibilità alle infezioni, così come la loro severità ed il loro esito, dipendono da una molteplicità di fattori, tra i quali l'età del paziente (che riveste una importanza fondamentale). In particolare, è ormai accertato che nell'anziano si verifichi una aumentata produzione di radicali liberi ed una riduzione delle difese antiossidanti che producono una sorta di "stress ossidativo cronico". Questo, unitamente a stress ambientali che si accumulano nel tempo, potrebbe contribuire all'attivazione di uno stato infiammatorio, anch'esso cronico, che condiziona l'esito di molte infezioni.

Attualmente il laboratorio è impegnato nel far luce sui meccanismi molecolari coinvolti nelle alterazioni delle risposte immunitarie tipiche dell'età avanzata e nel valutare l'efficacia di alcune molecole capaci di ripristinare lo stato redox fisiologico in diversi organi e tessuti, al fine di individuare strategie terapeutiche di supporto adeguate all'età del paziente.

Il laboratorio è impegnato anche nella individuazione dei meccanismi molecolari con i quali alcuni virus, tra i quali il virus herpes simplex 1, possono svolgere un ruolo co-fattoriale nell'insorgenza della malattia di Alzheimer. Il disvelamento di tali meccanismi può essere di grande rilevanza nell'identificazione di nuove strategie per la prevenzione/terapia di una malattia neurodegenerativa così temibile.

## AREE DI RICERCA

ENDOCRINOLOGIA CAR-  
DIOVASCOLARE

## RESPONSABILE

MASSIMILIANO CA-  
PRIO

## STAFF

ANTONELLA ANELMI,  
ANDREA ARMANI, ALES-  
SANDRA FERACO, CATE-  
RINA MAMMI, VINCENZO  
MARZOLLA.

In linea con l'attività di ricerca clinica, la ricerca preclinica traslazionale volta nel laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare si occupa di studiare meccanismi fisiopatologici, metabolici e molecolari in organi rilevanti ai fini della riabilitazione in malattie cardiovascolari/neurodegenerative/polmonari e di validare strumenti farmacologici in supporto della funzionalità di tali organi. In particolare, il laboratorio si occupa dell'organo adiposo, dell'endotelio, del muscolo scheletrico e della maturazione neuronale.

Negli ultimi anni è emerso che il recettore mineralcorticoide (MR), noto per mediare gli effetti dell'aldosterone sull'assorbimento renale del sodio, è espresso nel sistema cardiovascolare e a livello dell'organo adiposo e svolge un ruolo chiave nella malattie cardiovascolari. Studi in vitro e in vivo hanno dimostrato che l'attivazione dell'MR determina stress-ossidativo e infiammazione vascolare, fibrosi e rimodellamento. Studi clinici con antagonisti dell'MR hanno inoltre evidenziato i benefici dell'utilizzo di queste molecole sulla patologia cardiovascolare.

Nel corso degli ultimi anni, sono stati chiariti diversi aspetti del ruolo di MR nell'infiammazione endoteliale, nella funzione adipocitaria e nella sindrome metabolica. La ricaduta assistenziale è immediata, in quanto il recettore è implicato direttamente nello sviluppo dell'obesità, dell'ipertensione e delle sindromi coronariche acute. La conoscenza dettagliata dei meccanismi fisiopatologici alla base della disfunzione del sistema mineralcorticoide è fondamentale nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche e riabilitative nell'obesità, nell'ipertensione e nelle cardiopatie.

Studi effettuati nel laboratorio hanno dimostrato che 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.

Inoltre è stato valutato l'impatto di diverse terapie farmacologiche (inibitori delle fosfodiesterasi, antagonisti del recettore mineralcorticoide, etc) e riabilitative (riabilitazione cardiovascolare) su modelli cellulari disponibili in laboratorio, al fine di validare e chiarire l'eventuale efficacia sul paziente.

Il laboratorio ha inoltre pubblicato diverse revisioni sistematiche sui modelli cellulari di tessuto adiposo disponibili attualmente per studiare i meccanismi fisiopatologici dell'obesità. Ciò è di fondamentale importanza per individuare nuovi bersagli terapeutici nella riabilitazione nelle disfunzioni locomotorie e metaboliche riscontrate nel paziente obeso.

## PREMI E RICONOSCIMENTI

Gennaio 2014: Working Group Leader, Management Committee Member – COST (European Cooperation in Science and Technology) Action BM 1301 "Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor"

Febbraio 2014: Abilitazione scientifica nazionale alle funzioni di professore di seconda fascia nel settore concorsuale 06/D2 – Endocrinologia, Nefrologia e Scienza dell'Alimentazione e del Benessere

Maggio 2014: First prize as Young Investigator at 2nd Meeting on New Trends in Cardiovascular Drug Therapy (Vincenzo Marzolla)

Giugno 2014: Travel Grant: ESH-ISH satellite: Putting the A back into RAAS (Vincenzo Marzolla)

Giugno 2014: Travel grant - International Society of Endocrinology, ICE-ENDO meeting, Chicago, USA

Novembre 2014: Membro della Commissione Scientifica della SIAMS

## COLLABORAZIONI

Chemo France, Sevres, Francia (Ottobre 2014);

Jagiellonian Centre for Experimental Therapeutics, Cracovia, Polonia (Dicembre 2014).

## AREE DI RICERCA

PATOLOGIA  
MOLECOLARE E  
CELLULARE

## RESPONSABILE

MATTEO ANTONIO RUSSO

## STAFF

C. LANE ALVES, T. ARCAN-  
GELI, E. DE SANTIS,  
E. FOGLIO, F. LIMANA, E.  
PONTEMEZZO,  
G. PUDDIGHINU, S. SALADI-  
NI, L. SANSONE, M. TAFANI

Il laboratorio si occupa dello studio del recupero di funzione in tessuti postmitotici dopo danno subletale. In particolare lo studio riguarda l'individuazione di meccanismi molecolari che possono essere modificati tramite intervento a livello cellulare al fine di impedire la morte della cellula postmitotica quale neurone, cardiomiocita, ecc, favorendone il recupero di funzione.

Le proteine oggetto di studio, appartengono a due famiglie:

- La prima è quella della sirtuine, deacetilasi di classe III la cui funzione è quella di modificare post traduzionalmente le proteine modulandone la funzione. Le sirtuine sono infatti coinvolte nella risposta metabolica, nell'invecchiamento, nei tumori, ecc... Quindi una loro maggiore espressione o attivazione (per es. farmacologica) potrebbe facilitare la sopravvivenza o il recupero cellulare dopo danno (ischemia, ecc.).

- La seconda è quella delle proteine con dominio LIM anche note come proteine ricche in cisteine (CSRP) che hanno una funzione strutturale importante per le cellule muscolari ma anche di coattivatori o corepressori trascrizionali una volta traslocati nel nucleo. Alcuni membri di tali proteine sono stati identificati come sensori di stimolo meccanico. Quindi una loro attivazione dopo danno o durante il recupero sarebbe importante per garantire la sopravvivenza del miocita. Infine è stata recentemente osservata una interazione tra le sirtuine e le CSRP, importante ai fini della ricerca condotta dal laboratorio, per dimostrare un grande meccanismo comune che collega metabolismo e recupero di struttura e funzione cellulare.

## AREE DI RICERCA

EPIDEMIOLOGIA  
MOLECOLARE

## RESPONSABILE

PATRIZIA RUSSO

## STAFF

A. DEL BUFALO, M. MILIC

Il laboratorio ha lavorato nel corso del 2014 sullo sviluppo di diversi ambiti di ricerca:

- Creazione e validazione di una Piattaforma per sviluppare e studiare modelli innovativi di patologia umana non trasmissibili [BPCO, cancro (NSCLC) e malattie neurologiche geriatriche (Alzheimer).

Negli ultimi decenni si è assistito a un incremento senza precedenti delle possibilità offerte dalle tecnologie "high throughput" in termini di qualità e quantità (oltre che ottimizzazione) della "misura" molecolare e cellulare a livello, soprattutto, genomico e proteomico. Lo sviluppo, in specifico, di tecnologie di analisi sempre più sensibili e sofisticate (genetica, profili, funzionalità, ecc.) richiede la disponibilità di materiale biologico raccolto e trattato secondo tecniche standardizzate sempre più definite ed affidabili in accordo alle attuali procedure europee. Alla luce di queste indicazioni viene realizzata una raccolta di campioni biologici (siero, plasma, linfociti) umani provenienti da pazienti affetti da malattie non trasmissibili quali ad esempio la Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO), allo scopo di facilitare la traslazione delle informazioni di biologia, in particolare di omica, alla pratica clinica, permettendo una rapida risposta a quesiti sperimentali di potenziale valenza (terapia e/o diagnosi) garantendo la qualità e la quantità di campioni utilizzabili per queste pratiche.

La piattaforma permette di ottimizzare e personalizzare le strategie terapeutiche riabilitative dei pazienti. Vengono studiati metodi per l'individuazione di nuovi farmaci o terapie, marcatori prognostici e di risposta, e test tossicologici e funzionali.

- 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.

La riabilitazione respiratoria consiste 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 disostruzione bronchiale, l'allenamento dei muscoli respiratori, il ricondizionamento allo sforzo, lo svezzamento dalla ventilazione meccanica. Lo scopo della piattaforma riabilitativa consiste nell'implementare un database 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.

- 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 nascono 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.

- 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 sia di effettuare una diagnosi sempre più precoce sia di individuare nuovi bersagli terapeutici. L'obiettivo è quello di indagare il contributo della configurazione genetica alla patogenesi dell'autismo e della schizofrenia con particolare riferimento alle abilità cognitive e di individuare possibili biomarcatori periferici sia nell'autismo che nella schizofrenia, utili sia per una diagnosi precoce che per una personalizzazione del trattamento.

- 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.

- 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.

Il disegno dello studio prevede di comparare una batteria di biomarcatori di instabilità genetica (micronuclei), di danno ossidativo (addotti della malondialdeide al DNA, 8-idrossi-deossiguanosina, 8-isoprostano, leucotriene B4), e di lesioni precoci (mesotelina, PDGF, HGF, bFGF e VEGF) in soggetti esposti ad amianto e controlli. Il progetto prevede inoltre di comparare i livelli dei biomarcatori ottenuti nei linfociti con quelli rilevati nelle cellule esfoliate da mucosa boccale. Verificare la fattibilità dell'utilizzo di esalato bronchiale per l'analisi di 8-isoprostano, leucotriene B4 per rilevare l'esposizione ad amianto.

- Chemoprevenzione nei pazienti esposti all'asbesto. Nella versione originale di questo progetto, presentato nel corso del 2009, il disegno di studio proposto prevedeva l'effettuazione di

un trial randomizzato di fase IIb finalizzato a confrontare la frequenza di micronuclei (MN) e di altri endpoints secondari nei linfociti periferici del sangue di soggetti, precedentemente esposti ad asbesto, in soggetti trattati con N-acetilcisteina (NAC) versus placebo. Vista la tipologia dei soggetti target per il trattamento chemiopreventivo - cioè lavoratori esposti ad asbesto in passato - si è reso necessario valutare la persistenza dei danni di instabilità genetica e di tipo ossidativo in situazioni in cui l'esposizione ad asbesto risaliva a molti anni addietro. In parallelo, l'effetto antiossidante e di protezione dall'instabilità genetica della NAC - ampiamente dimostrato in caso di esposizioni recenti - richiedeva una conferma sugli effetti di esposizioni pregresse. Anche la capacità dei principali polimorfismi genetici interessati da questi meccanismi di modificare l'attività genotossica dell'asbesto era da testare in queste condizioni di esposizione. L'interesse per un potenziale ruolo dei polimorfismi genetici tiene anche in considerazione la possibilità di identificare, tramite questa informazione, sottogruppi di soggetti particolarmente suscettibili al danno indotto da esposizione ad asbesto, o particolarmente sensibili all'effetto della NAC, da proporsi quindi in modo elettivo per un trattamento chemiopreventivo con questo agente.

## AREE DI RICERCA

NEUROBIOLOGIA  
MOLECOLARE E  
CELLULARE

## RESPONSABILE

ALESSIO CARDINALE

## STAFF

DANIELA MERLO

Le malattie da "protein misfolding", o malattie conformazionali, rappresentano una classe di patologie umane caratterizzate dall'accumulo di proteine con una struttura alterata che causa la formazione di aggregati e/o conformeri proteici con potenzialità altamente citotossiche. Le malattie neurodegenerative costituiscono una sottoclasse di queste patologie in cui la formazione e l'accumulo di queste specie proteiche causano la morte di specifiche popolazioni neuronali e quindi scatenano il processo di neurodegenerazione. Il fattore di rischio per eccellenza delle malattie neurodegenerative è l'invecchiamento e poiché la vita media della popolazione mondiale è aumentata considerevolmente, il numero di casi clinici di queste patologie sta raggiungendo proporzioni elevate. L'esempio più eclatante è quello della malattia di Alzheimer, che costituisce la forma più comune di demenza. Attualmente i meccanismi molecolari alla base della patogenesi della malattia di Alzheimer, così come più in generale del processo di neurodegenerazione sono poco compresi. Inoltre, non sono ancora disponibili strategie terapeutiche efficaci per bloccare o quanto meno rallentare il decorso di questa terribile patologia, anche se negli ultimi anni le immunoterapie si stanno dimostrando uno strumento potenzialmente efficace.

L'obiettivo principale del Laboratorio è lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base delle patologie neurodegenerative, utilizzando modelli sperimentali in vitro ed in vivo. In particolare, l'attività di ricerca mira a:

1. Determinare il ruolo svolto dall'alterazione dei meccanismi di riparazione del DNA e della funzionalità nucleolare nella patogenesi della malattia di Alzheimer e più in generale nel processo neurodegenerativo.
2. Individuare biomarcatori periferici della malattia di Alzheimer al fine di sviluppare nuovi strumenti diagnostici precoci ed accurati così come di individuare eventuali bersagli terapeutici. Ulteriore obiettivo del laboratorio è quello di applicare nuove strategie immunoterapeutiche specifiche per la malattia di Alzheimer, basate sulla tecnologia degli anticorpi intracellulari. Per il raggiungimento di tali obiettivi è adottato un approccio multidisciplinare, basato su tecniche di tipo molecolare, biochimico ed elettrofisiologico.



## LA RETE

COLLABORAZIONI SCIENTIFICHE  
PER PROGETTI DI RICERCA DI BASE-TRASLAZIONALE

## Laboratorio di Patologia molecolare e cellulare

- Centro Cardiologico Monzino: la collaborazione con questo IRCCS e' nata in seguito all'approvazione del progetto ministeriale Giovani Ricercatori dal titolo "Ruolo dello stato redox della proteina HMGB1 nella rigenerazione del tessuto cardiaco e nell' attivita' della cellula progenitrice cardiaca". Il laboratorio rappresenta una delle unità operative che si occupa prevalentemente degli studi in vivo. In particolare, si utilizza un modello murino di infarto del miocardio indotto mediante legatura della coronaria sinistra, tecnica utilizzata solo in pochi laboratori italiani.
- Istituto Dermopatico dell'Immacolata (IDI): la collaborazione con questo IRCCS è legata al progetto ministeriale Giovani Ricercatori dal titolo "miRNAs del tessuto adiposo: legame tra insulino resistenza nel diabete di tipo 2 e malattia vascolare". Il laboratorio rappresenta una delle unità operative che si occupa degli studi in vivo rappresentati dall'ischemia dell'arto inferiore effettuata mediante rimozione dell'arteria femorale. Anche questa tecnica, non viene praticata in molti laboratori italiani. Inoltre la collaborazione con il Laboratorio di Patologia Vascolare (Dr. M. Capogrossi) dell'IDI consente la condivisione di alcuni strumenti quali: inclusore automatico di campioni, strumenti necessari per l'inclusione dei pezzi in paraffina, microtomo.
- Policlinico Universitario "Agostino Gemelli": la collaborazione con questo Policlinico riguarda in particolare il Dipartimento di Scienze Cardiovascolari (Prof. F. Crea). Questa collaborazione non riguarda solo la ricerca, ma anche la ricerca clinica. In particolare, vi è la possibilità di acquisire campioni (quali, ad esempio, biopsie di tessuto cardiaco) provenienti da pazienti con diverse patologie cardiovascolari, nonché relativi dati funzionali, quali quelli ecocardiografici. Inoltre è stata data la possibilità di effettuare studi su colture di cellule staminali cardiache ckit+, sia murine che umane, difficilmente reperibili in altri laboratori.
- Ospedale San Filippo Neri: la collaborazione con questo Ospedale riguarda sia il Dipartimento Cardiovascolare (Cardiologia e Cardiocirurgia) che il Dipartimento di Anatomia Patologica. Tale collaborazione consente di ottenere prelievi ematici e biopsie provenienti da pazienti affetti da diverse patologie cardiovascolari, quali l'infarto acuto del miocardio e lo scompenso cardiaco.
- Eppley Institute for Cancer Research, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA (Prof. Pankaj S Singh): la collaborazione con questo centro di ricerche riguarda il gruppo del Prof. Singh che si occupa dello studio metabolomico delle sirtuine e dei loro inibitori in cellule tumorali. Lo studio prevede di individuare le vie metaboliche principali che sono affette da una inibizione delle sirtuine partendo da quelle mitocondriali e, in particolare, SIRT5. Successivamente l'analisi verrà estesa anche alle altre sirtuine. Inoltre tale collaborazione permetterà di effettuare studi anche su modelli animali con tumore del pancreas.

## Laboratorio di Elettrofisiologia

- Policlinico Umberto I – La collaborazione con il Centro SLA del Policlinico Umberto I è stata avviata per il progetto di ricerca dal titolo: "I recettori dell'acetilcolina nel muscolo di pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica: un nuovo target nella patogenesi della malattia" che ha fornito le biopsie muscolari dei pazienti con SLA e traumatizzati.
- University of California, Irvine - Neurobiology and Behavior Department - La collaborazione è stata avviata per il progetto di ricerca dal titolo: "I recettori dell'acetilcolina nel muscolo di pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica: un nuovo target nella patogenesi della malattia" con il Prof. Ricardo Miledi per l'organizzazione e lo sviluppo di alcuni progetti scientifici del laboratorio e con il Dr. Reyes-Ruiz che ha effettuato lo studio dei meccanismi molecolari.
- Università di Amsterdam - Dipartimento di Neuropatologia – La collaborazione con l'università di Amsterdam (Dr.ssa Aronica), che ha fornito i tessuti cerebrali umani epilettici e di controllo, è legata ad un progetto riguardante lo studio di citochine nelle epilessie umane.
- Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano - Laboratorio di Neurologia Sperimentale, Collaborazione con la Dott.ssa Annamaria Vezzani per l'organizzazione e lo sviluppo di alcuni progetti scientifici del laboratorio.

## Laboratorio di Patologie cronico-degenerative

- Università "Sapienza" di Roma – Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive – La collaborazione è relativa prevalentemente ai progetti di ricerca inerenti il "Ruolo dello stress ossidativo legato all'ageing nell'aumentata severità delle infezioni respiratorie nell'anziano" e "Identificazione di biomarcatori diagnostiche e prognostici delle infezioni respiratorie nell'anziano".
- Università Cattolica di Roma – Istituto di Fisiologia Umana, collaborazione con il Prof. Claudio Grassi, relativamente alla caratterizzazione del processamento mitocondriale APP indotto dalle infezioni da HSV-1 nelle cellule nervose, mediante tecniche di immunofluorescenza confocale.
- Università degli studi di Roma, Tor Vergata – Dipartimento di Biologia, collaborazione con la Prof. Maria Rosa Ciriolo, per la quantificazione di alcuni parametri dello stress ossidativo indotto da HSV-1 nelle cellule neuronali e in modelli cellulari di senescenza che meglio possano mimare le condizioni fisiologiche dell'anziano.
- Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo" - Dipartimento di Scienze Biomolecolari, collaborazione con il Prof. Mauro Magnani finalizzata a chiarire il ruolo dello stato redox intracellulare nel modulare la risposta immunitaria durante l'infezione virale, in particolare durante l'invecchiamento, che è associato ad un incremento dell'infezione e ad una diminuita e rallentata risposta cellulare di tipo T.
- Università degli Studi di Ferrara - Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica, collaborazione con il Prof. Roberto Manservigi finalizzata allo studio del ruolo di alcune specifiche proteine virali nel processamento mitocondriale di APP indotto da HSV-1 nelle cellule neuronali.



- Istituto Superiore di Sanità – Dipartimento di malattie Infettive, Parassitarie e Immunomediate, collaborazione con il Dott. Andrea Savarino finalizzata a definire il ruolo dello stato redox intracellulare nel ciclo replicativo virale all'interno di varie sottopopolazioni linfo-monocitarie isolate da sangue umano.

## Laboratorio di Neurobiologia molecolare e cellulare

- Istituto Superiore di Sanità - Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, collaborazione con le Dott.sse Daniela Merlo e Francesca Cirulli, relativamente allo studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base del danno neuronale nelle patologie neurologiche e neurodegenerative e, in particolare, allo studio del ruolo delle proteine coinvolte nella riparazione del DNA nelle malattie neurodegenerative. Inoltre in collaborazione con l'ISS verranno condotti esperimenti volti a valutare in vivo, a livello comportamentale, gli effetti immunoterapeutici degli anticorpi intracellulari anti-A  $\beta$  1-42 oligomerica in un modello murino di AD.

- Università degli studi di Roma, Tor Vergata – Dipartimento di Medicina dei Sistemi, collaborazione con i Dottori Silvia Biocca, Giovanna D'Arcangelo, Virginia Tancredi, Cristiano Zona, per lo studio: (i) delle proprietà elettrofisiologiche di neuroni sovraespressanti il miR-34; (ii) della malattia di Niemann-Pick di tipo C ed in particolare gli effetti del Miglustat, unico farmaco attualmente disponibile per il trattamento dei pazienti, sulla plasticità sinaptica in termini di ripristino delle condizioni di induzione/mantenimento della LTP; (iii) degli effetti immunoterapeutici degli anticorpi intracellulari anti-A  $\beta$  1-42 oligomerica sulla plasticità sinaptica in un modello murino di AD.

- "Sapienza" Università di Roma – Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive – collaborazione con le Prof.ssa Anna Teresa Palamara e la Dr.ssa Giovanna De Chiara, per lo studio del ruolo svolto dalle infezioni del virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) nella compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA nei neuroni.

- Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Istituto di Farmacologia Traslazionale – collaborazione sullo studio degli effetti di variazione dell'espressione del miR-34a, mediata da virus adenoassociati ricombinanti, come strategia terapeutica per l'invecchiamento e le patologie neurodegenerative.

- Arizona State University, Tempe, USA – Department of Chemical Engineering – in collaborazione con il Prof. Michael Richard Sierks si stanno generando nuovi anticorpi intracellulari diretti contro diverse isoforme conformazionali del peptide  $\beta$ -amiloide, il principale candidato nella patogenesi della malattia di Alzheimer.

- Columbia University, New York, USA – Department of Pathology and Cell Biology (Taub Institute for Research on Alzheimer's Disease and the Aging Brain) – collaborazione con il Prof. Ottavio Arancio l'Università di "Tor Vergata" per lo sviluppo di nuove opzioni immunoterapeutiche contro la malattia di Alzheimer attraverso la combinazione dell'approccio degli anticorpi intracellulari con i sistemi di "delivery" intranasale. L'obiettivo è quello di indirizzare nel cervello anticorpi ricombinanti specifici per uno dei principali recettori dell' A  $\beta$  1-42 oligomerica, il prione, e prevenire gli effetti neurotossici e sinaptotossici associati all'interazione A  $\beta$ /prione.

- Imperial College London, UK - Department of Life Sciences – Collaborazione con il Professore William Wisden per la generazione di modelli animali transgenici ed in particolare lo sviluppo di modelli preclinici innovativi per l'identificazione e la validazione di potenziali target

terapeutici da perseguire in trial clinici.

- University of Heidelberg, Germany – Department of Neurobiology – Collaborazione con il Professore Hilmar Bading per mettere a punto l'utilizzo di virus adenoassociati ricombinanti che rappresentano un potente sistema per il trasferimento di geni nel cervello al fine di curare le malattie neurologiche e studiare le funzioni del SNC.

## Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare

- Centre de recherche des Cordeliers, Parigi, Francia – Collaborazione interistituzionale con il Dr. Frederic Jaisser per il progetto dal titolo: "Cross-talk between adipose tissue and myocardium: role of Mineralocorticoid Receptor on adipose secretome in the pathogenesis of cardiovascular disease"

## Laboratorio di Patofisiologia della cachessia e metabolismo del muscolo scheletrico

- Paola Costelli, Università degli Studi di Torino
- Maria Teresa Ciotti, CNR Roma
- Daniela De Zio, Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen
- Giuseppe Filomeni, Danish Cancer Society Research Center, Copenhagen
- Walter Malorni, ISS, Roma
- Natalia Malara, Università Magna Grecia, Catanzaro
- Wolfram Döhner, Charite, Berlin
- Pierpaolo Pellicori, Castle Hill Hospital, Hull
- Cesare Gargioli, Università Tor Vergata, Roma
- Maurizio Muscaritoli, Università La Sapienza, Roma
- Antonio Musaro, Università La Sapienza, Roma

## Laboratorio di Neurobiologia Molecolare e Cellulare

- Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia, Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze: D. Merlo, F. Cirulli - per lo studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base del danno neuronale nelle patologie neurologiche e neurodegenerative ed in particolare lo studio del ruolo delle proteine coinvolte nella riparazione del DNA nelle malattie neurodegenerative. Inoltre, in collaborazione con l'ISS vengono condotti esperimenti volti a valutare in vivo, a livello comportamentale, gli effetti immunoterapeutici degli anticorpi intracellulari anti-A $\beta$  1-42 oligomerica in un modello murino di AD.
- Università Tor Vergata, Roma, Italia, Dipartimento di Medicina dei sistemi: V. Tancredi, G. D'Arcangelo; C. Zona; S. Biocca - per lo studio di: (i) le proprietà elettrofisiologiche di neuroni sovraespressanti il miR-34; (ii) la malattia di Niemann-Pick di tipo C ed in particolare gli effetti del Miglustat, unico farmaco attualmente disponibile per il trattamento dei pazienti, sulla plasticità sinaptica in termini di ripristino delle condizioni di induzione/mantenimento della LTP; (ii) gli effetti immunoterapeutici degli anticorpi intracellulari anti-A $\beta$  1-42 oligomerica sulla plasticità sinaptica in un modello murino di AD.
- "Sapienza" Università di Roma, Italia, Dipartimento di Scienze di Sanità Pubblica: AT Palamara, G. De Chiara - per lo studio del ruolo svolto dalle infezioni del virus Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1) nella compromissione dei meccanismi di riparazione del DNA nei neuroni.
- CNR, Istituto di Farmacologia Traslazionale: C. Mollinari - per lo studio degli effetti di variazione dell'espressione del miR-34a, mediata da virus adenoassociati ricombinanti, come strategia terapeutica per l'invecchiamento e le patologie neurodegenerative.
- Department of Life Sciences, Imperial College London, UK: W. Wisden - per la generazione di modelli animali transgenici ed in particolare lo sviluppo di modelli preclinici innovativi per l'identificazione e la validazione di potenziali target terapeutici da perseguire in trial clinici.
- Department of Neurobiology, University of Heidelberg, Germany: H. Bading - per mettere a punto l'utilizzo di virus adenoassociati ricombinanti che rappresentano un potente sistema per il trasferimento di geni nel cervello al fine di curare le malattie neurologiche e studiare le funzioni del SNC.
- Department of Chemical Engineering, Arizona State University, Tempe, USA: M. Sierks - per la generazione di nuovi anticorpi intracellulari diretti contro diverse isoforme conformazionali del peptide  $\beta$ -amiloide, il principale candidato nella patogenesi della malattia di Alzheimer.
- Columbia University, Dept. Pathology & Cell Biology and Taub Institute New York, USA: O. Arancio - per lo sviluppo di nuove opzioni immunoterapeutiche contro la malattia di Alzheimer attraverso la combinazione dell'approccio degli anticorpi intracellulari con i sistemi di "delivery" intranasale. L'obiettivo è quello di indirizzare nel cervello anticorpi ricombinanti specifici per uno dei principali recettori dell'A $\beta$ 1-42 oligomerica, il prione, e prevenire gli effetti neurotossici e sinaptotossici associati all'interazione A $\beta$ /prione.

## LINEE DI RICERCA

ATTIVITA' SCIENTIFICA



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 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 risposta 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 Riabilitazione Neuromotoria

### Valutazione dei cambiamenti cinematici nei pazienti con Malattia di Parkinson che eseguono un trattamento riabilitativo con robot del cammino

Nella maggior parte dei pazienti affetti da malattia di Parkinson 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, 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. Mentre la levodopa e gli altri farmaci anti parkinsoniani risultano efficaci nel ridurre i sintomi motori tipici della malattia, alcuni disturbi della deambulazione persistono nonostante il trattamento farmacologico sia "ottimale". In particolare, il fenomeno del freezing, definito come brusca e repentina incapacità di iniziare movimenti volontari, in particolare il cammino. Questo fenomeno può verificarsi all'inizio o nel corso della marcia, nell'attraversare passaggi stretti o nei cambiamenti di direzione (esitazione a svoltare). Questo stato transitorio di completa immobilità si protrae solo da pochi secondi a pochi minuti, può manifestarsi sia in periodi "on", sia "off", con frequenza occasionale o ripetuta durante la giornata e rappresenta un importante fattore di rischio cadute.

L'obiettivo di questo studio è analizzare l'efficacia in termini di recupero funzionale del cammino in soggetti affetti da Malattia di Parkinson che effettuano un trattamento riabilitativo robotico e di confrontarli con un gruppo che effettua un trattamento riabilitativo mediante treadmill. La scelta del gruppo di controllo che effettua il trattamento con il treadmill è secondaria alle evidenze scientifiche fino ad ora prodotte dove è stata dimostrata l'efficacia del trattamento riabilitativo con il treadmill.

Sono stati arruolati 30 pazienti ricoverati nel reparto di Riabilitazione Neuromotoria (art. 56), Day Hospital, o in regime ambulatoriale (ex art 26) con malattia di Parkinson diagnosticata sulla base della storia clinica, dell'esame obiettivo e confermato secondo i protocolli internazionali della diagnosi delle malattia di Parkinson.

I criteri di esclusione prevedevano:

- Una precedente altra malattia neurologica o ortopedica nota in anamnesi;
- Manifestazione nella storia clinica prossima o remota del paziente (in trattamento farmacologico o non) di crisi epilettiche;
- Demenza o storia di depressione endogena o disordini psichiatrici severi;
- Donne in gravidanza e/o in allattamento.

I pazienti arruolati nello studio mostravano evidenza clinica di deficit motorio di un arto inferiore. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a visita di screening per verificare l'eleggibilità allo studio e se eleggibili, sono stati arruolati e sottoposti a randomizzazione computerizzata per l'assegnazione ad un braccio dello studio.

a) Gruppo GEO (TG): Ad ogni seduta giornaliera di riabilitazione per l'arto inferiore il paziente ha effettuato un trattamento di 45 minuti sul robot con scarico di peso tra il 30 e il 20%, con una velocità minima uguale a quella valutata a T0 e che è stato incrementato durante l'esercizio e con il passare dei giorni.

b) Gruppo TREADMILL (TT): Ad ogni seduta giornaliera di riabilitazione per l'arto inferiore il paziente ha effettuato un trattamento di 45 minuti sul treadmill ove possibile con scarico di peso tra il 30 e il 20%, con una velocità minima uguale a quella valutata a T0 e che è stata incrementata

durante l'esercizio e con il passare dei giorni.

Sono state effettuate valutazioni pre-trattamento (base-line) (T0) post-trattamento alla fine delle 20 sedute (T1). Durante queste valutazioni sono state somministrate le seguenti scale cliniche:

- Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)
- Hoehn and Yahr
- PSP Rating Scale and Staging System
- Freezing of gait questionnaires
- Timed up and go test
- The six minute walking test (6MWT)
- Ten meter walk test (TMWT)
- Functional Ambulation Classification (FAC)
- Walking Handicap Scale (Perry e Garrett)
- Gait Analysis
- The Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39)

Tutti i pazienti hanno eseguito un ciclo di trattamenti riabilitativi (siano essi standard o sperimentali) della durata di 20 sedute.

Nessuna differenza statisticamente significativa è stata trovata a T0 tra il gruppo del treadmill e il gruppo del robot.

L'analisi dei dati dei soggetti che hanno eseguito un trattamento riabilitativo al robot mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra per la scala UPDRS una significatività statistica per l'UPDRS parte 1 con una p pari a 0.0039, una significatività statistica per la UPDRS parte 2 e parte 3 con una p pari a 0.0020, una significatività statistica per la UPDRS parte 5 con una p pari a 0.0078. L'analisi della FOG e del 6 minuti walking test mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra una significatività statistica una p pari a 0.0020. L'analisi della BORG mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra una significatività statistica con una p pari a 0.0039. Infine l'analisi della PDQ39 mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra una significatività statistica con una p pari a 0.0020. Gli altri test TUG, FAC e WHS non mostrano significatività statistiche.

L'analisi dei dati dei soggetti che hanno eseguito un trattamento riabilitativo al treadmill mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra per la scala UPDRS una significatività statistica per l'UPDRS parte 2 con una p pari a 0.0039. L'analisi del TUG mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra una significatività statistica con una p pari a 0.0158. Infine l'analisi della PDQ39 mediante il Wilcoxon matched-pairs signed rank test mostra una significatività statistica con una p pari a 0.0234. Gli altri test non mostrano significatività statistiche. I risultati di tutti i test clinici sono riportati nella tabella sottostante.

	T0 ROBOT	T1 ROBOT	P	T0 TREADMILL	T1 TREADMILL	P
ETÀ	64±9			72±9		
DURATA MALATTIA	7,8±4,2			7,1±2,6		
H&Y	2,9±0,6			2,9±0,6		
UPDRS 1	6,0±1,944	4,3±1,829	0,0039	1,8±1,476	1,6±1,430	NS
UPDRS 2	22,8±8,535	19,2±7,361	0,0020	11,9±2,234	9,9±3,143	0,0195
UPDRS 3	44,80±12,76	38,90±10,08	0,0020	19,60±10,55	18,05±10,71	NS
UPDRS 4	6,7±2,710	5,6±2,797	0,0078	2,7±3,199	1,9±2,424	NS
FOG	11,5±3,535	8,3±2,214	0,0020	10,5±6,786	6,1±4,748	NS
TUG	20,44±5,003	17,67±5,268	NS	19,90±8,319	16,8±6,941	0,0156
6MWT	153,0±46,14	227,0±55,34	0,0020	242,2±112,8	264,7±113,3	NS
BORG	5,3±1,829	4,0±1,155	0,0039	5,4±2,221	4,6±2,503	NS
FAC	3,9±0,8756	3,9±1,287	NS	3,3±1,116	3,4±0,8433	NS
WHS	4,2±0,788	4,2±1,135	NS	3,6±1,174	3,6±0,9661	NS
PDQ 39	80,50±18,49	61,90±17,34	0,0020	47,70±19,87	42,50±21,30	0,0234

## Robot ed entropia. Un nuovo approccio riabilitativo del controllo posturale nella malattia di Parkinson

Le persone con malattia di Parkinson soffrono di una progressiva perdita nel controllo posturale. Nella letteratura, vari lavori documentano il controllo posturale durante il cammino con l'elaborazione del segnale Centro di Pressione (CoP) nel dominio del tempo e della frequenza, che offre una serie di caratteristiche peculiari, che descrivono il controllo posturale e il relativo rischio di cadute nelle persone con malattia di Parkinson.

Le correzioni continue e consapevoli fatte da persone con malattia di Parkinson per mantenere la postura verticale dovrebbero cambiare la natura automatica del controllo posturale, rendendo i soggetti consapevoli del rischio di cadute a causa dei segnali afferenti ed efferenti.

Negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi per esplorare la complessità delle traiettorie COP durante stazione eretta, offrendo una misura in materia di automatismo del controllo: in questo studio è stato analizzato il controllo posturale dei partecipanti con malattia di Parkinson usando l'analisi dell'entropia in soggetti che hanno effettuato un trattamento riabilitativo robotico.

Sono stati arruolati 10 soggetti con malattia di Parkinson (PD) e 10 partecipanti sani come gruppo di controllo (CG). Criteri di esclusione per il CG, sono: storia di disturbi cardiovascolari, neurologici o muscolo-scheletrici. L'acquisizione dei dati posturali del gruppo patologico è stata eseguita presso IRCCS San Raffaele Pisana di Roma, mentre il gruppo di controllo è stato arruolato presso il Politecnico di Milano.

I criteri d'inclusione sono: diagnosi di malattia di Parkinson idiopatica, basata sui criteri della Brain Bank (UK), in assenza di altri deficit neurologici significativi o di patologie ortopediche; età compresa tra i 30 e gli 75 anni; dose stabile di farmaco per le ultime due settimane prima dell'inizio dello studio; capacità di camminare per 25 piedi senza assistenza o con minima assistenza;

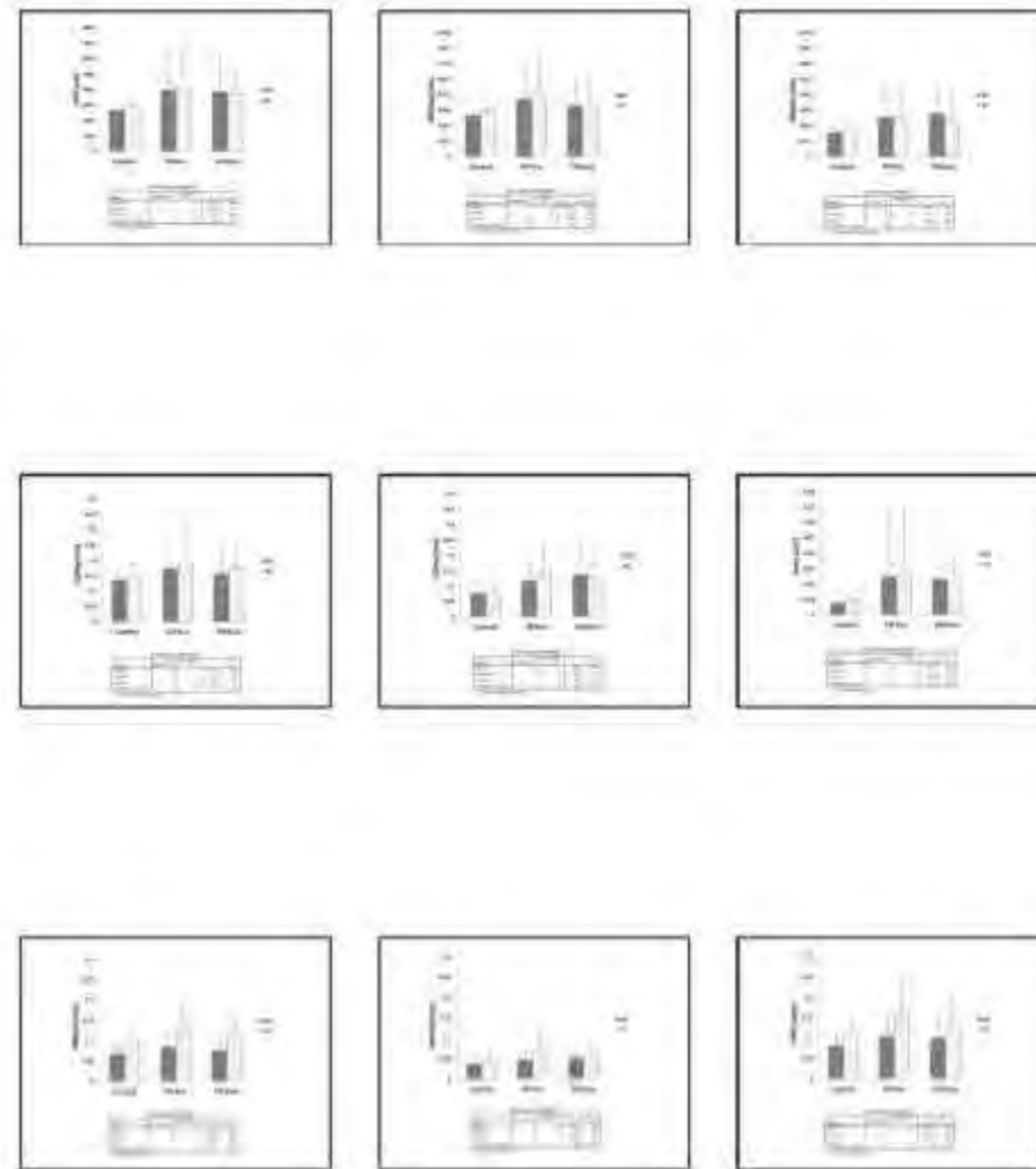
resistenza sufficiente a mantenere la posizione eretta per 20 minuti senza assistenza. Ogni paziente, che rispondeva ai criteri d'inclusione elencati e che ha firmato il consenso informato dichiarando di voler aderire allo studio, ha ricevuto un trattamento robotico, utilizzando il dispositivo G-EO System. Esso prevedeva la deambulazione robot-assistita a velocità variabile per 40 minuti, con un parziale sgravio del peso corporeo. Tutti i partecipanti hanno iniziato con uno sgravio pari al 30-40% del peso corporeo, per poi diminuire progressivamente fino al 15-20%. La velocità impostata inizialmente era superiore rispetto a quella rilevata nell'analisi del cammino (velocità media) ed è stata aumentata gradualmente in base alla risposta del paziente durante le varie sessioni. Il trattamento prevedeva 20 sedute robot-assistite per gli arti inferiori, della durata di 40 minuti, eseguite 5 volte alla settimana per 4 settimane.

Il protocollo di valutazione è stato effettuato su tutti i soggetti all'inizio del trattamento (T0) e alla fine del trattamento (T1).

Sono stati effettuati 2 test stabilometrici a T0 e T1 dove l'oscillazione posturale è stata misurata per 30/60 secondi, mentre i partecipanti stavano su una piattaforma di forza (Kistler, CH; frequenza di acquisizione: 500 Hz) integrato con un sistema video (BTS, IT). Essi sono stati invitati a tenere le braccia tese lungo i fianchi e a concentrarsi su un punto di riferimento visivo fisso 1,5 m di fronte a loro alla singola linea di visione. Sono state testate due condizioni sperimentali: con occhi aperti (EO) e con gli occhi chiusi (CE). Le acquisizioni della piattaforma di forza hanno permesso di calcolare la serie storica COP in direzione AP (COPAP) e la direzione di ML (COPML). L'intervallo dei primi 10 secondi è stato scartato per evitare la fase di transizione raggiungere lo stato stazionario posturale (Galli et al. 2008). I risultati della piattaforma sono stati elaborati per calcolare parametri quantitativi nel tempo e nel dominio della frequenza e inoltre è stato utilizzato l'algoritmo di analisi di entropia.

Tutti i parametri precedentemente definiti sono stati calcolati per ogni partecipante. Il Mann-Whitney U-test è stato utilizzato per confrontare i controlli normali e patologici partecipanti. In ciascun gruppo sono stati confrontati condizioni EO e CE utilizzando il test di Wilcoxon per rilevare differenze significative. Una differenza statisticamente significativa è stata accettata quando  $p < 0.05$ .

Come riportato nella Figura il robot non modifica il controllo posturale nè l'entropia del sistema ad occhi chiusi ed occhi aperti nei soggetti con Malattia di Parkinson, nè rispetto ai soggetti normali. Il riapprendimento motorio e posturale dopo riabilitazione robotica non influisce sui controlli cerebrali corticali. Nuove strategie riabilitative devono dunque essere applicate in questo ambito.



## Stimolazione dei neuroni mirror nei pazienti con malattia di Parkinson per il recupero funzionale dell'arto inferiore e superiore

I neuroni specchio sono una classe di neuroni che si attivano quando si osserva un'azione finalizzata (bere un bicchiere d'acqua, rispondere al telefono, vestirsi, camminare) compiuta da un altro soggetto. I primi studi su questa classe di neuroni sono stati eseguiti sugli animali. Nell'essere umano questi neuroni oltre ad essere localizzati in aree motorie e premotorie, si trovano anche nell'area di Broca e nella corteccia parietale inferiore. Il sistema umano dei neuroni specchio, a differenza di altre specie animali, codifica atti motori transitivi e intransitivi; è cioè capace di codificare sia il tipo di azione che la sequenza dei movimenti da cui essa è composta. Nell'uomo non è necessaria una effettiva interazione con gli oggetti: i suoi neuroni-specchio si attivano anche quando l'azione è semplicemente mimata. Anche se il loro ruolo primario rimane quello di comprendere le azioni altrui, il contesto umano è evidentemente più complesso. Il gruppo di ricerca ha pubblicato due studi clinici che utilizzando la stimolazione dei neuroni mirror in soggetti affetti da ictus sia cronico che acuto, hanno dimostrato un recupero funzionale della destrezza nei soggetti che effettuavano il trattamento sperimentale rispetto al gruppo di controllo. La ricerca si prefigge di utilizzare un core-set di video specificamente creati per i soggetti affetti da malattia di Parkinson (MP) che possano migliorare le performance del cammino e dell'arto superiore. Si tratta di uno studio longitudinale randomizzato e controllato (RCT).

L'obiettivo principale di questo studio consiste nel valutare l'efficacia di un trattamento riabilitativo mediante la stimolazione di neuroni mirror somministrati sia dal vivo (attori) che mediante video in soggetti affetti da MP e con limitazioni funzionali del cammino (freezing) e dell'arto superiore (bradicinesia).

Il secondo obiettivo consiste nel valutare se l'osservazione finalizzata di azioni (Action Observation), aggiunta ad un programma di riabilitazione specifico (imitazione delle azioni che finalizzano strategie per freezing e per la velocizzazione di atti motori dell'arto superiore) possano rappresentare un alternativo approccio riabilitativo.

L'ultimo obiettivo consiste nel valutare se il miglioramento delle performance delle attività di questi soggetti possa influire sulle varie attività di vita quotidiana e di conseguenza sulla qualità della vita.

Nella fase preliminare dello studio, sono stati inclusi soggetti con malattia di Parkinson e disturbi dell'andatura per la scelta delle azioni e dei video da utilizzare. 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 ottenuti 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.

Tutti i pazienti arruolati nello studio beneficiano di un ciclo di trattamenti riabilitativi (siano essi standard o sperimentali) della durata di 20 sedute, potenzialmente in grado di migliorare la performance motoria del paziente, ma sicuramente in grado di prevenire tutte le complicanze connesse ad un ridotto utilizzo dell'arto inferiore e superiore oggetto della sperimentazione.

Ci si attende che la stimolazione dei neuroni mirror possa risultare efficace in un recupero funzionale statisticamente significativo nei soggetti con Malattia di Parkinson e che l'effetto sia mantenuto al follow-up.

Tutti i gruppi effettuano un trattamento uguale per durata e per numero di sedute.

Le performance motorie dell'arto superiore e del cammino associate al recupero vengono inoltre analizzate tramite metodica di motion analysis e analisi del cammino mediante Gait Analysis, somministrata all'inizio e alla fine del trattamento riabilitativo e tramite somministrazione di scale

cliniche specifiche del recupero del cammino per i pazienti con malattia di Parkinson. Sono stati arruolati 45 pazienti ricoverati nel Reparto di NeuroRiabilitazione (art. 56), Day Hospital o ambulatoriale (ex art 26) che abbiano manifestato malattia di Parkinson.

Criteri di inclusione:

- Diagnosi di Malattia Parkinson;
- Età compresa tra 18 e 80 anni;
- Consenso informato scritto.

Criteri di esclusione:

- Una precedente altra malattia neurologica o ortopedica nota in anamnesi;
- Manifestazione nella storia clinica prossima o remota del paziente (in trattamento farmacologico o non) di crisi epilettiche.
- Demenza o storia di depressione endogena o disordini psichiatrici severi.
- Donne in gravidanza e/o in allattamento

Lo studio prevede che i pazienti vengano 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) e post-trattamento alla fine delle 20 sedute (T1) e follow up a 2/3 mesi (T2);
- Somministrazione di analisi Video-optocinematica del cammino (Gait Analysis) e dell'arto superiore.

Vengono somministrati i seguenti strumenti: Unified Parkinsons' Disease Rating Scale (UPDRS); Box and Block test; Hoehn and Yahr; Freezing of Gait Questionnaires; Timed Up and Go Test; The Six-Minute Walking Test; Ten Meter Walking Test (TMWT); Functional Ambulation Classification (FAC); Walking Handicap Scale (Perry e Garrett); Gait Analysis; The Parkinsons's Disease Questionnaire (PDQ-39).

Il trattamento riabilitativo secondo quanto previsto dai 2 diversi bracci sperimentali ha una durata di 20 sedute.

I pazienti risultati eleggibili alla visita di screening vengono randomizzati a:

- gruppo A Neuroni Mirror Video (NMV) (15 pazienti)
- gruppo B Neuroni Mirror attori (NMA) (14 pazienti)
- gruppo C Terapia Occupazionale e Fisiochinesiterapia.

La randomizzazione è effettuata tramite un software specifico, garantendo la privacy dei pazienti.

## Caratterizzazione clinica, disabilità, risposta terapeutica ed outcome dell'emicrania in pazienti con segni di attivazione del riflesso trigemino-autonomico

I sintomi autonomi 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 riguardo. Obiettivo di questo studio è, dunque, valutare la prevalenza di UAs negli emicranici ed identificare le caratteristiche cliniche di tale popolazione.

A tutti pazienti partecipanti allo studio è stato richiesto di firmare un Consenso Informato. È 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 identificati con uno stato civile di coppia rispetto agli emicranici senza UAs ( $p = 0.046$ ). È in corso la stesura del lavoro che al termine sarà inviato a rivista internazionale.

## 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 (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 Barnet in uno studio condotto per verificare il ruolo dell'esercizio fisico e l'emicrania conclusero 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 correlata 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 studio 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, con i seguenti criteri di inclusione: età  $\geq 14$  anni, attività sportiva agonistica, atleti in buona salute secondo l'opinione del medico basandosi sulla valutazione iniziale che include la storia medica e l'esame fisico, atleti in grado di comprendere le procedure dello studio e che acconsentano volontariamente a partecipare allo studio firmando il consenso informato ed in grado di completare i questionari valutativi previsti da protocollo e diario.

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.

È in corso una elaborazione statistica più dettagliata per la stesura del lavoro.



### 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 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 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 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, genetico (SNPs), ambientale (Occupazione, life-style, etc.), clinico (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 dell'IRCCS per prestazioni non legate a patologie di tipo neurodegenerative.

A tutti i soggetti che 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. 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 (p1). Pertanto, dato  $p1=.20$ ; Ratio Case to Controls 1:1;  $\alpha = 0.05$ ;  $1-b=.80$ , 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 è necessario reclutare 1000 pazienti affetti dalla malattia di Parkinson ed altrettanti controlli (2000 soggetti complessivamente).

Il campione finora analizzato è composto da 520 casi affetti da Malattia di Parkinson e da 257 controlli non affetti da malattia.

Nella tabella che segue sono riassunte le caratteristiche socio-demografiche, le abitudini al fumo e l'esposizione a sostanze tossiche per il gruppo dei casi e dei controlli.

Socio-Demographic Information, Smoking Habits and Exposure to Toxic Substances	CASES (520)	CONTROLS (N257)	Comparison p-value
	N (%) / MEAN $\pm$ SD	N (%) / MEAN $\pm$ SD	
<b>SEX</b>			
Female (n=378)	208 (40%)	170 (66%)	< 0.001*
Male (n=399)	312 (60%)	87 (34%)	
<b>AGE (YRS)</b>	68.28 $\pm$ 8.55	66.18 $\pm$ 9.50	< 0.001*
< 55 years old (n=90)	54 (10%)	36 (14%)	0.004*
55-59 years old (n=67)	36 (7%)	31 (12%)	
60-64 years old (n=110)	65 (12%)	45 (18%)	
65-69 years old (n=146)	96 (18%)	50 (19%)	
70-74 years old (n=186)	133 (26%)	53 (21%)	
75-79 years old (n=116)	88 (17%)	28 (11%)	
$\geq 80$ years old (n=62)	48 (9%)	14 (5%)	
<b>EDUCATION</b>			
Primary School or Analphabets (n=110)	91 (18%)	28 (11%)	0.070
Secondary School (n=194)	119 (23%)	66 (26%)	
Diploma (n=285)	181 (35%)	104 (41%)	
University Degree (n=183)	129 (24%)	57 (22%)	
<b>BMI (usual)</b>	25.58 $\pm$ 3.77	25.52 $\pm$ 4.30	0.850
Underweight - BMI < 18.50 (n=15)	10 (2%)	7 (3%)	0.850
Normal Range - BMI: 18.50-24.99 (n=470)	222 (43%)	105 (42%)	
Pre-Obese - BMI: 25-29.99 (n=286)	204 (40%)	100 (40%)	
Obese - BMI $\geq 30$ (n=34)	80 (15%)	40 (15%)	
<b>BMI (current)</b>	25.78 $\pm$ 4.16	26.03 $\pm$ 4.31	0.450
Underweight - BMI < 18.50 (n=17)	8 (2%)	7 (3%)	0.100
Normal Range - BMI: 18.50-24.99 (n=327)	240 (47%)	130 (52%)	
Pre-Obese - BMI: 25-29.99 (n=304)	208 (40%)	80 (32%)	
Obese - BMI $\geq 30$ (n=120)	59 (12%)	36 (14%)	
<b>BMI change</b>	-0.18 $\pm$ 2.39	-0.50 $\pm$ 1.88	0.070
Weight loss - shift down in BMI class (n=108)	75 (15%)	33 (13%)	0.001*
No weight change - no shift in BMI class (n=612)	397 (77%)	215 (85%)	
Weight increase - shift up in BMI class (n=47)	43 (8%)	4 (2%)	
<b>SMOKING HABITS</b>			
No (n=399)	271 (52%)	128 (50%)	0.060
Ex Smoker (n=258)	186 (36%)	82 (32%)	
Yes (n=110)	63 (12%)	47 (18%)	
<b>Cigarette Smokers (n=367)</b>	240 (60%)	127 (98%)	0.250
Age at which started smoking (n=367)	19.49 $\pm$ 6.98	18.91 $\pm$ 6.37	0.440
Age at which stopped smoking (n=7)	37.50 $\pm$ 19.42	35.67 $\pm$ 7.50	0.820
Average no. of cigarettes (n=366)	19.73 $\pm$ 11.72	15.63 $\pm$ 10.51	0.470
<b>Cigar Smokers (n=18)</b>	15 (7%)	3 (2%)	0.080

Age at which started smoking (n=78)	32.87 ± 13.77	37.67 ± 19.76	0.610
Age at which stopped smoking (n=14)	51.23 ± 16.00	30 (none subject only)	not-applicable
Average no. of cigarettes (n=78)	2.06 ± 1.54	1.83 ± 0.29	0.810
<b>Pipe Smokers (n=16)</b>	14 (88%)	2 (2%)	0.050
Age at which started smoking (n=10)	26.37 ± 0.68	43.00 ± 32.53	0.190
Age at which stopped smoking (n=9)	43.43 ± 23.75	48.50 ± 26.16	0.800
Average no. of pipes (n=10)	1.54 ± 0.86	1.50 ± 0.71	0.960
<b>LIVES WITH SMOKERS</b>			
No (n=350)	230 (44%)	120 (47%)	0.520
Yes (n=425)	289 (50%)	136 (53%)	
No. hours with smokers (n=424)	4.61 ± 3.71	4.66 ± 4.58	0.630
No. years with smokers (n=423)	27.00 ± 12.90	26.02 ± 14.65	0.480
<b>WORKS WITH SMOKERS</b>			
No (n=471)	318 (61%)	153 (60%)	0.710
Yes (n=302)	200 (38%)	102 (40%)	
No. hours with smokers (n=302)	6.81 ± 2.31	6.43 ± 3.37	0.310
No. years with smokers (n=301)	21.98 ± 10.83	20.55 ± 12.59	0.310
<b>TOXIC SUBSTANCES</b>			
No (n=659)	456 (88%)	243 (95%)	0.003*
Yes (n=78)	64 (12%)	14 (5%)	
List of Substances			not-performed
Pesticides and fertilizers (n=25)	19 (30%)	6 (43%)	
Inhalant substances (n=3)	3 (5%)	0 (0%)	
Paint (n=9)	9 (14%)	0 (0%)	
Car Body Paint (n=2)	2 (3%)	0 (0%)	
Glue (n=4)	3 (5%)	1 (7%)	
Tetrachloroethylene (n=2)	1 (2%)	1 (7%)	
Leather (n=1)	1 (2%)	0 (0%)	
Potassium cyanide (n=1)	0 (0%)	1 (7%)	
Pesticides and fertilizers: trichloroethylene (n=2)	2 (3%)	0 (0%)	
Paint: solvents (n=6)	4 (6%)	2 (14%)	
Paint, glue, solvents (n=2)	1 (2%)	1 (7%)	
Paint, inhalant substances (n=1)	1 (2%)	0 (0%)	
Other (n=3)	3 (5%)	0 (0%)	
Unspecified (n=17)	15 (23%)	2 (14%)	

E' emerso che nel primo gruppo vi era una maggiore numerosità di maschi (60%) mentre nel secondo gruppo erano prevalenti le femmine (66%), e tale differenza nella distribuzione per sesso è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ).

I casi avevano un'età media di  $68.28 \pm 9.55$  anni mentre i controlli di  $65.18 \pm 9.60$ . Benché questa differenza sia risultata statisticamente significativa ( $p < 0.001$ ), la probabilità che i tre anni di differenza - e quindi la possibilità che i controlli abbiano avuto tre anni di tempo in meno per sviluppare la malattia - possano avere distorto i risultati appare poco probabile.

Il campione è stato ulteriormente suddiviso in classi di età così definite: <55 anni, 55-59 anni, 60-64 anni, 65-69 anni, 70-74 anni, 75-79 anni,  $\geq 80$  anni; è apparso che una maggiore proporzione di controlli si distribuiva nelle classi di età inferiori ai 65 anni ( $p = 0.004$ ), tuttavia non è emersa una netta differenza.

Per lo studio del Body-Mass-Index (BMI) sono stati messi in relazione il peso attuale e il peso abituale di ciascun individuo e i soggetti sono stati classificati in base alle seguenti classi di BMI: sottopeso BMI < 18.50; normopeso BMI: 18.50-24.99; pre-obesità BMI: 25-29.99; obesità BMI  $\geq 30$ . E' emerso che una proporzione maggiore di casi rispetto ai controlli (8% vs 2%) ha subito un aumento di peso (attuale) tale da determinare un salto di classe di BMI, ed una proporzione maggiore di controlli rispetto ai casi è rimasta nella stessa classe (85% vs 77%) ( $p$ -value=0.001). Infine, un numero maggiore di casi (12% vs 5%) è risultato esposto a sostanze tossiche (quali pesticidi e concimi, vernici, colle, solventi e colori per pittura, vernici per carrozzeria, trielina, cianuro di potassio ecc) nelle attività di tempo libero ( $p = 0.003$ ).

Nei pazienti inclusi sono stati indagati i seguenti possibili sintomi di esordio di malattia: tremore, stitichezza, depressione, iposmia, e disturbi del sonno. Il primo era presente in circa la metà del gruppo (54%), mentre gli altri sono risultati più rari, essendo presenti in circa il 30%-40% dei pazienti (stitichezza 42%; depressione 40%; iposmia 32%; disturbi del sonno 39%). La localizzazione iniziale di malattia era a destra nel 46% dei casi, a sinistra nel 49% e bilaterale nell'1%, non nota nel restante 4%. La severità di malattia è classificata secondo la scala di Hoehn & Yahr, che copre un range da 1 a 5. In base a questa scala è risultato che la maggior parte dei casi aveva un punteggio tra 2 e 3 (28%).

Le abitudini alimentari sono state studiate approfondendo il quantitativo di frutta, verdura carne, pesce, salumi ed affettati, caffè, té, coca-cola/altre bibite, bibite energetiche, integratori alimentari, vino, birra e liquori assunto. E' emerso che i casi consumano meno verdura rispetto ai controlli (68% vs 78% di consumo giornaliero,  $p$ -value=0.023), mangiano più affettati e salumi (14% vs 6% di consumo giornaliero,  $p$ -value=0.016), e tendono a bere più frequentemente vino (41% vs 32% beve con regolarità,  $p = 0.002$ ). Non è emersa differenza statisticamente significativa tra casi e controlli rispetto ai restanti alimenti, bibite e integratori.

Dall'analisi sulle aree di residenza degli individui è emersa una differenza statisticamente significativa soltanto relativamente alla residenza più recente; nello specifico, i casi hanno vissuto più a lungo in una zona urbana rispetto ai controlli ( $37.23 \pm 20.39$  anni vs  $31.67 \pm 18.40$  anni,  $p < 0.001$ ), mentre non è emersa differenza per il numero medio di anni trascorsi in una zona rurale. Questo dato probabilmente è stato influenzato dall'ubicazione del Centro, a cui afferiscono principalmente pazienti residenti in zone urbane.

Dall'analisi delle occupazioni professionali è emerso che, relativamente all'occupazione più recente, un gran numero di soggetti erano pensionati o non lavoravano (64% casi e 47% controlli), un numero maggiore di controlli erano casalinghe (22% vs 12%), oppure lavoravano in ufficio o negozio (24% vs 16%) ( $p = 0.001$ ). Questi risultati sono tuttavia da leggere in relazione all'età della campione che è mediamente di 67 anni, e alla distribuzione del sesso (66% di femmine fra i controlli). Per tale ragione sono state studiate anche le professioni precedenti, per cui nel gruppo dei controlli è risultato prevalente il lavoro in ufficio o in negozio, mentre nel gruppo dei casi era più frequente il lavoro come artigiano od operaio. Infine, per ciascun individuo si è considerato il lavoro eseguito per il maggior numero di anni ed è emerso che il 20% dei casi era stato artigiano o operaio, contro l'8% dei controlli; inoltre una proporzione maggiore di controlli aveva riportato come occupazione prevalente pensionato, nessuna attività lavorativa oppure casalinga (29% vs

11%) ( $p < 0.001$ ).

Il presente studio ha confermato i dati di letteratura che riportano un maggior rischio di malattia in soggetti che effettuano professioni che comportano il contatto con sostanze potenzialmente tossiche (ad es. artigiani, operai, agricoltori). Per meglio indagare questo interessante risultato, è in corso una classificazione delle esposizioni a tossici professionali mediante costruzione di job exposure matrixes.

Dall'analisi di regressione logistica semplice è stato stimato che i maschi hanno un odds di malattia quasi tre volte superiore rispetto alle femmine ( $p < 0.001$ ); tuttavia, come precedentemente accennato, questo risultato andrebbe verificato in un campione con ugual numero di casi e controlli e bilanciato per sesso. Inoltre, emerge un trend crescente per età, per cui soggetti con età compresa tra 75 e 80 anni hanno un odds di malattia di 2 volte superiore rispetto a soggetti di età  $< 55$  anni ( $p = 0.015$ ), e i soggetti con 80 anni o più hanno un odds di 2.30 volte superiore ( $p = 0.026$ ). È stata inoltre evidenziata un'associazione tra malattia e incremento di classe del BMI, per il quale è stato stimato un odds quasi 6 volte superiore rispetto ad una classe di BMI invariata ( $p = 0.001$ ). Si ritiene che quest'ultimo dato sia da confermare con un'analisi statistica su un campione meglio bilanciato. Il fumo attivo è risultato avere un effetto protettivo, con un odds ratio (OR) di 0.63 ( $p = 0.038$ ), e l'esposizione a sostanze tossiche nel tempo libero è risultata essere nociva (OR=3.52,  $p = 0.001$ ). È inoltre emerso un trend per il consumo di carne e insaccati che raggiunge significatività statistica al consumo giornaliero (carne: OR=2.88,  $p = 0.018$ ; insaccati: OR=2.75,  $p = 0.014$ ). L'associazione con il consumo di vino è confermata, per cui risulta un odds di 1.97 ( $p$ -value=0.001) per un bevitore occasionale e un odds di 1.58 ( $p = 0.019$ ) per un bevitore regolare, rispetto ad un soggetto astemio. Infine per l'analisi di regressione sono state considerate soltanto le professioni prevalenti. Rispetto ad un'occupazione casalinga, ed escludendo il pensionamento o l'inattività, tutte le professioni sono risultate fortemente associate alla Malattia di Parkinson.

Dall'analisi di regressione multipla mediante il metodo 'backward stepwise' è emerso che il sesso, l'età, la variazione di classe del BMI, il fumo attivo, il fumo passivo in casa, l'esposizione a sostanze tossiche nel tempo libero e il consumo di insaccati, il consumo di bevande energetiche e di liquori, e le professioni prevalenti nel campione sono tutti fattori associati alla Malattia di Parkinson. L'assunzione di bevande energetiche, molte delle quali contenenti caffeina e taurina, è risultata come fattore protettivo anche se al limite della significatività (OR=0.40,  $p = 0.065$ ), così come l'assunzione di liquori (OR=0.56,  $p = 0.038$ ).

Dopo aver implementato e meglio bilanciato il campione, si provvederà ad effettuare un'attenta analisi delle relazioni di confondimento e interazione fra tutti i potenziali fattori di rischio. Sarà inoltre eseguita un'analisi di regressione multipla che tenga conto di tali relazioni, al fine di verificare i reali fattori di rischio per la Malattia di Parkinson.

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 (età pensionabile) infatti i soggetti sono per il 57.1% pensionati.

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 2015.

## Utilizzo del dispositivo medico "Gondola" per la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da paralisi sopranucleare progressiva

L'utilizzo di dispositivi elettromeccanici, in aggiunta alle convenzionali terapie farmacologiche, nell'ultimo anno è risultato di estremo ausilio nel trattamento dei pazienti con Malattia di Parkinson.

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, il dispositivo stimola specifiche aree plantari 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. Possono quindi riappropriarsi di parte della propria autonomia e capacità di relazione.

Gli specifici obiettivi di questo progetto sono stati:

- verificare l'effettiva efficacia nel ridurre il deficit motorio soprattutto negli arti inferiori del dispositivo Gondola;
- analizzare l'eventuale miglioramento attraverso analisi cinetiche 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.

Il protocollo originale (GONDOLA PILOTA) è stato modificato sulla base dei risultati preliminari ottenuti, includendo solo pazienti con malattia di Parkinson affetti da fluttuazioni motorie.

Il disegno dello studio è variato da cross-over a doppio cieco randomizzato per gruppi paralleli a causa della difficoltà rilevata nel protocollo pilota 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 sono stati inclusi 20 pazienti con Malattia di Parkinson affetti da fluttuazioni della risposta motoria. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi: trattamento GONDOLA® attivo e trattamento SHAM GONDOLA. La randomizzazione è stata effettuata con il supporto di un software dedicato. Solo l'operatore incaricato della somministrazione del trattamento era a conoscenza del gruppo di appartenenza del singolo paziente. Ogni paziente è stato sottoposto a 8 stimolazioni (2 stimolazioni a settimana GONDOLA o SHAM GONDOLA) e, dopo 4 settimane di wash-out, ad una visita di follow up.

Le valutazioni cliniche sono state effettuate all'inizio (T0), alla fine del ciclo di stimolazioni (T1) e dopo il follow up di 4 settimane (T2), da osservatori in cieco rispetto al trattamento effettuato. Lo studio computerizzato del cammino (GAIT) era stato previsto, all'inizio e alla fine di ciascun ciclo di stimolazioni, in almeno il 50% dei pazienti arruolati.

Le valutazioni cliniche comprendevano UPDRS part III, Hoehn & Yahr, Non Motor Symptoms Scale, Clinical Global Impression of Change Scale per Investigator (CGI-I) e Paziente (CGI-P), Timed up and go test, il six-minute walking test, il ten meter walk test (TMWT), Hamilton Rating Scale for depression, the Parkinson's disease questionnaire (PDQ-39) e Euro QoL 5d e MoCA (Montreal Cognitive Assessment).

Le caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati sono mostrate nella Tabella sottostante.

codice	età	sexo	esordio sintomi	data diagnosi
1	75	M	2002	2002
2	52	F	2005	2005
3	79	M	2004	2005
4	74	F	1991	1993
5	77	M	2009	2010
6	66	F	2000	2000
7	83	M	1999	1999
8	71	M	2009	2009
9	74	M	2005	2005
10	75	M	2010	2010
11	44	M	1998	1999
12	75	M	1998	1998
13	58	F	2006	2007
14	65	F	2010	2010
15	66	M	1997	1998
16	71	M	2010	2010
17	74	M	2010	2010
18	73	M	2008	2007
19	78	M	2001	2001
20	69	M	2003	2005

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha mostrato un miglioramento significativo nei punteggi dell'UPDRS III e nel Six Minute Walking test (6MWT) tra i tempi di valutazione T0 e T1 nel gruppo di pazienti trattati con GONDOLA® attivo. E' stato inoltre evidenziato un peggioramento statisticamente significativo dei punteggi UPDRS III tra i tempi di valutazione T1 (post-stimolazione) e follow up (dopo 4 settimane di wash out).

Nessuna variazione statisticamente significativa è stata evidenziata per tutte le altre scale di valutazione ad eccezione della CGI - Investigator e Paziente che ha mostrato un peggioramento significativo nel gruppo di stimolazione attiva tra la valutazione di fine stimolazione (T1) e la valutazione effettuata al follow-up (T2). Nessuna variazione significativa è stata riportata nel gruppo SHAM.

Non è stato possibile raggiungere il target previsto per lo studio della GAIT Analysis: la complessità e la lunghezza dell'esame non hanno permesso alla maggior parte dei pazienti (valutati in stato di OFF farmacologico) di portare a termine l'esame. Hanno concluso l'esame 4 pazienti in trattamento attivo e due pazienti in trattamento SHAM. Pertanto, i dati raccolti non sono stati sufficienti ad una appropriata analisi statistica.

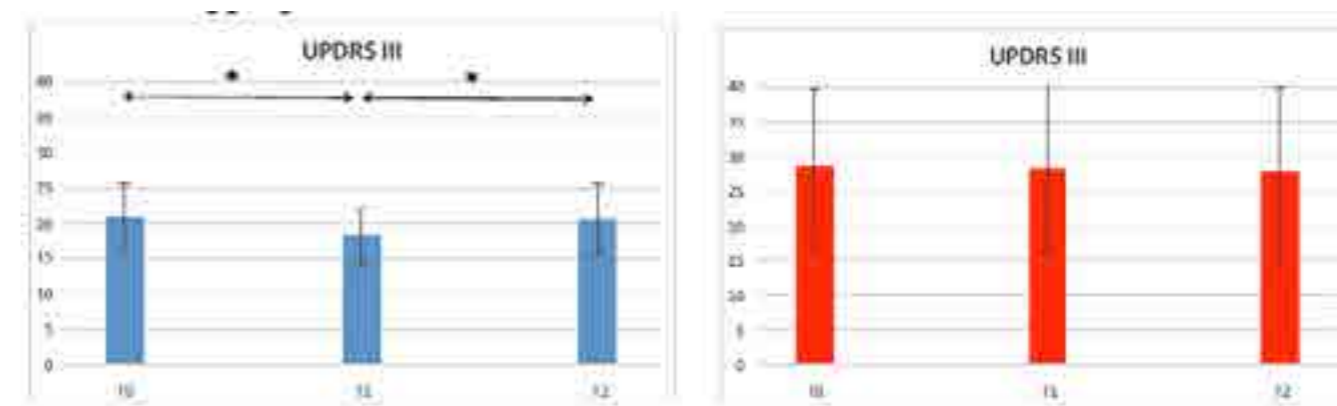


Figura 1: Punteggi UPDRS III nel gruppo attivo (blu) e sham (rosso)

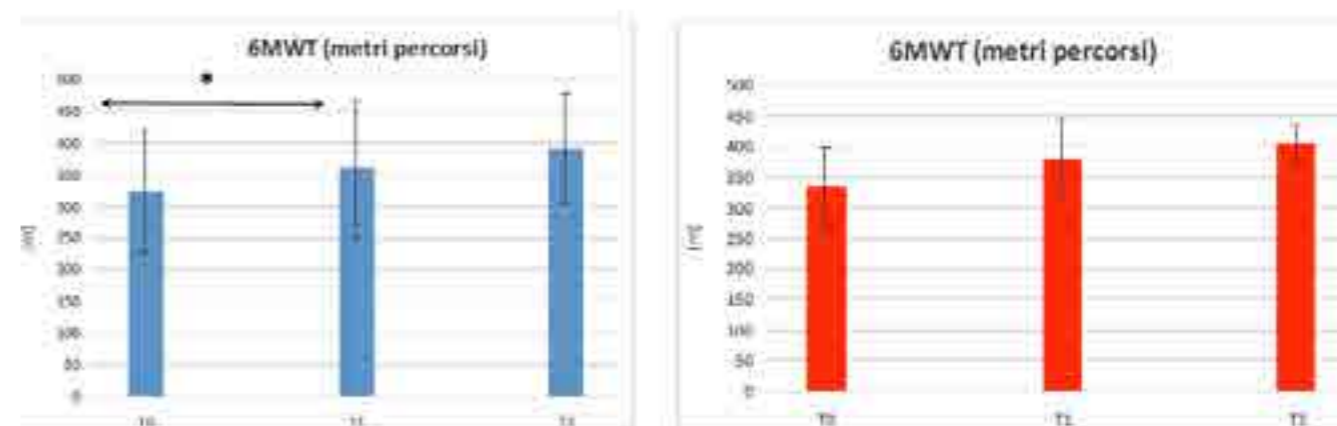


Figura 2: Punteggi 6MWT nel gruppo attivo (blu) e sham (rosso)

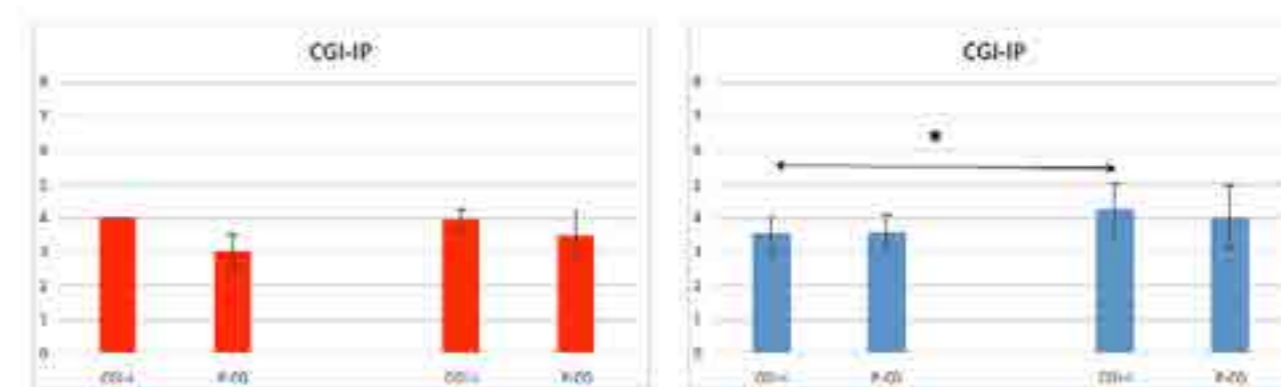


Figura 3: Punteggi CGI-IP nel gruppo attivo (blu) e sham (rosso)

I risultati ottenuti hanno mostrato un trend di miglioramento nelle performance motorie nei pazienti trattati con Gondola® attivo rispetto al gruppo placebo. L'analisi dei dati ha fatto però emergere una eterogeneità significativa tra il gruppo di stimolazione attiva e il gruppo SHAM, probabilmente dovuta all'assegnazione randomizzata dei pazienti nei due gruppi. Tali risultati andranno quindi confermati con uno studio multicentrico su un gruppo molto più numeroso di pazienti. Sarà inoltre opportuno fissare dei criteri di inclusione che permettano di arruolare un campione di soggetti omogeneo per caratteristiche cliniche.

## Studio sulla differenza di percezione consapevolezza dei movimenti involontari tra i parkinsoniani e i loro caregivers

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 stato quello di analizzare la percezione e la consapevolezza dei movimenti involontari tra le persone con malattia di Parkinson e i loro caregivers utilizzando un nuovo questionario PD-C SCL Parkinson's disease /Caregivers Symptoms check list.

Le aree analizzate sono state: 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 hanno dato il consenso a partecipare allo studio è stato somministrato un questionario da personale addestrato. Durante la visita della durata di circa 45 minuti sono stati somministrati: il questionario sulle discinesie PD-C SCL Parkinson's disease/Caregivers Symptoms check list, MOCA, UPDRS, H&Y. Ai caregivers è stato somministrato esclusivamente il PD-C SCL.

Il presente studio osservazionale ha avuto lo scopo di mettere a confronto il modo in cui il paziente percepisce i sintomi del Parkinson e come questi vengono appunto percepiti e valutati diversamente dal medico e dal caregiver. A tale scopo, è stato chiesto ai 50 pazienti facenti parte dello studio (ed ai 50 caregivers) di dare una valutazione ad una serie di sintomi della malattia di Parkinson.

Il grado di accordo (o disaccordo) fra valutazione data dal paziente e dal caregiver è stato valutato statisticamente attraverso il Kappa di Cohen.

Per alcuni sintomi è eseguito anche il confronto con la valutazione espressa dal clinico, riportata nella scheda mAIMS. Si è eseguita anche una descrizione demografica del campione in studio (pazienti e caregivers). Il questionario è stato somministrato a 100 soggetti, 50 pazienti e caregivers. I dati hanno mostrato una notevole differenza nella percezione dei sintomi da parte dei pazienti e dei loro caregivers.

L'accordo fra paziente e caregiver è risultato scarso in 6 aree.

- Problemi psicologici: in 21 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave di quello fornito dal paziente;
- Movimenti involontari tronco: in 22 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente;
- Movimenti involontari arti: in 25 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente (50% dei casi);
- Movimenti involontari capo: in 21 casi su 50 il caregiver ha dato un giudizio più grave del paziente;
- Situazione inversa si ha nel blocco/rallentamento motorio grave, dove è il paziente a risentire maggiormente dei sintomi e questo suo malcontento si riflette nelle risposte date;
- Accordo massimo si ha nel giudicare il tremore del capo;
- Come ci si aspettava, il giudizio del clinico non è in accordo con il concetto di "fastidio" sentito dal paziente. Ad esempio, nei "movimenti involontari del tronco" il confronto fra paziente e clinico presenta una concordanza scarsa ed in 28 casi su 50 totali, il clinico descrive una situazione di una certa gravità mentre il fastidio descritto dal paziente risulta essere abbastanza lieve.

Si è ulteriormente studiato l'accordo (o il disaccordo) fra pazienti, caregivers e clinici attraverso la correlazione ed in particolare, trattandosi di scale ordinali, si è scelto il coefficiente di Spearman. Il valore minimo (0,28) si è presentato nel confronto fra paziente e clinico sulle variabili "movimenti involontari arti" vs "media 4 arti". Il valore massimo di correlazione (0,85) si è presentato per la

variabile "tremore arti superiori" (la variabile "cadute" ha presentato un coefficiente pari a 0,84) ed è relativo al confronto fra paziente e caregiver.

Classificando i pazienti per sesso e ricalcolando i coefficienti Kappa di Cohen per i vari confronti, si evidenzia che l'accordo fra paziente e caregiver relativamente al fastidio dei problemi psicologici, è nettamente più alto se il paziente è una donna rispetto a un paziente uomo; analogo risultato si evidenzia per i comportamenti compulsivi. Nei confronti fra caregiver e clinico si evidenziano dei risultati negativi (che possono essere approssimati a 0 ed indicano assenza di accordo).

Il test del Chi quadro (presentato nella tabella sottostante) ha evidenziato una differenza di genere solamente per la variabile "tronco" (Chi quadro pari a 12,140 e p-value pari a 0,016). Per le restanti variabili prese in considerazione non è evidenziata alcuna differenza fra pazienti uomini e donne.

	Chi-squared	p-value
Arto sup SX	2,401	0,662
Arto sup DX	2,233	0,693
Arto inf SX	0,788	0,94
Arto inf DX	3,272	0,352
Tronco	12,14	<b>0,016</b>
Faccia collo	5,053	0,282

I pazienti parkinsoniani tendono a sottovalutare la gravità e l'impatto dei loro sintomi sulle attività della vita quotidiana, mentre i familiari e caregivers spesso considerano i movimenti involontari come il segno principale o il più fastidioso tra sintomi parkinsoniani.

## Valutazione genetica di un campione di soggetti parkinsoniani affetti da gioco d'azzardo patologico

La malattia di Parkinson (MP) è una malattia neurodegenerativa, prevalentemente caratterizzata da sintomi motori, come il tremore, la rigidità e la bradicinesia, e sintomi non motori, tra i quali i disturbi del comportamento, rivestono un ruolo significativo. Tra questi disturbi psichiatrici, possiamo distinguere quelli indipendenti dalla terapia, come la depressione e i disturbi d'ansia, e quelli invece, amplificati dalla terapia dopaminergica, come la psicosi e i disturbi del controllo degli impulsi. In questa categoria rientrano il gioco d'azzardo patologico, lo shopping compulsivo, l'ipersessualità, il punding, ecc. Caratteristiche comuni sono: incapacità di resistere all'impulso, alla spinta o alla tentazione di eseguire l'atto; un crescente senso di tensione o attivazione prima di commettere l'atto; un senso di piacere, gratificazione o "release" al momento di commettere l'atto. Il gioco d'azzardo patologico (gambling) è caratterizzato dall'impossibilità da parte del paziente di resistere all'impulso del gioco nonostante conseguenze personali, familiari o occupazionali, e significative ripercussioni sulla vita sociale dei pazienti. Negli anni passati diversi studi hanno evidenziato dipendenze patologiche nei pazienti con PD. La degenerazione del sistema dopaminergico presente nella PD e la continua e obbligatoria assunzione di farmaci dopaminergici causa in certi pazienti disfunzioni nel sistema della gratificazione. Lo scopo dello studio è testare l'ipotesi che specifici fattori molecolari giochino un ruolo nei processi cognitivi ed emotivi alla base dello sviluppo del gioco d'azzardo patologico (GAP), in pazienti con PD. In particolare

vengono valutati sistematicamente una serie di plimorfismi genetici, ad oggi studiati specialmente in soggetti gambler senza altro disturbo psichiatrico o neurologico.

Lo studio prevede l'arruolamento di minimo 20 pazienti con PD e GAP presso gli ambulatori neurologici dell'IRCCS San Raffaele Pisana.

Questo studio è in collaborazione con l'Università Sapienza e la UOD di Diagnostica molecolare Avanzata della Azienda Ospedaliera Sant'Andrea II.

Per essere inclusi nello studio i soggetti devono rispondere ai seguenti criteri:

- età compresa tra 18 e 80 anni;
- quadro clinico di gambling patologico secondo la SOGS inferiore a 5 e confermato dal colloquio clinico;
- consenso informato alla partecipazione allo studio.

Viene compilata una scheda con i dati demografici, anamnestici e clinici. I reattivi mentali utilizzati sono:

- South Oaks Gambling Screen (SOGS);
- Montreal Cognitive Assesment (MOCA).

Ai soggetti partecipanti viene prelevato un campione di DNA attraverso prelievo di sangue, al quale segue la procedura:

1. Selezione dei geni e dei polimorfismi candidati:

I seguenti polimorfismi genetici sono stati associati al gioco d'azzardo patologico, in un recente studio di Genome Wide Association (GWAS) (Lind et al., 2013). Nonostante numerosi dati in letteratura riportino associazioni fra il gioco d'azzardo e numerosi polimorfismi genetici, lo studio citato è l'unico che possa essere considerato statisticamente valido. I polimorfismi presi in esame sono:

- MTX1(rs8064100) (v. all. A): Single Nucleotide Polymorphysm (SNP) con cambio A/G presente a valle del gene codificante per la metalotionina 1X.
- ATXN1(rs9383153) (v. all. A): SNP con cambio A/G localizzato nel gene ATXN1 che, in vivo, costituisce il promotore per il gene codificante per il DRD2.
- FZD10 (rs10812227) (v. all. A): SNP con cambio C/T localizzato nel gene codificante per le protein Wnt.
- FLJ35024 (rs12237653) (v. all. A): SNP con cambio T/C localizzato a monte e all'interno del gene codificante per il VLDLR.
- VLDLR (rs12305135) (v. all. A): SNP con cambio T/C localizzato nel gene codificante per il VLDLR.

2. Genotipizzazione dei soggetti, mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) delle sequenze di DNA comprendenti i polimorfismi.

Nel 2014 sono stati reclutati 5 pazienti. Le prime valutazioni sono presentate nella tabella che segue.

Paziente	sex	età	FZD10 rs10812227	FLJ35024 rs12237653	VLDLR rs12305135	PUNTEGG IO TOT	COMT rs4680	MAOA- VNTR	DRD2 rs1799732
1	M	66	CC	CT	TT	4.5	AA	4R	InsC/DeIC
2	F	71	CC	TT	TT	6	GG	4R	InsC/InsC
3	M	70	CC	TT	TT		GA	4R	InsC/InsC
4	M	53	CC	TT	TT	7.5	GA	4R	InsC/InsC
5	F	45	CC	TT	TT	6	GA	3R/4R	InsC/InsC

Paziente	DRD2 rs180 1028	DRD2/ANKK1 rs1800497 o TaqlA	DRD3 rs6280	HTR2A rs6311	HTR2A rs7997012	HTR2A rs6314	HTR2C (rs6318)
1	CC	CC	AG	GG	GG	CC	GG
2	CC	CC	AA	AG	GG	CC	GG
3	CC	CC	AG	AG	AA	CC	GA

## Utilizzo della "Deep TMS" per il trattamento e la riabilitazione motoria di soggetti affetti da malattia di Parkinson e da paralisi soprannucleare progressiva

Mentre la levodopa e gli altri farmaci anti parkinsoniani sono efficaci nel ridurre i sintomi motori tipici della malattia, alcuni disturbi della deambulazione persistono nonostante il trattamento farmacologico sia "ottimale". Il fenomeno del freezing definito come brusca e repentina incapacità di iniziare movimenti volontari, in particolare il cammino.

La stimolazione magnetica transcranica (TMS) è una tecnica non invasiva di stimolazione cerebrale basata su induzioni di un campo elettro-magnetico e utilizzata in neurofisiologia. Nel 1987 è stata introdotta la Ripetitive TMS che riesce a modulare l'eccitabilità corticale con un effetto prolungato nel tempo.

Per tale motivo sono stati eseguiti trial clinici per valutare i potenziali effetti terapeutici in numerose malattie neuropsichiatriche tra cui depressione, sclerosi multipla, stroke e Malattia di Parkinson.

Nella MP alcuni studi clinici hanno dimostrato un miglioramento minimo ma significativo delle funzioni motorie.

La Deep TMS (DTMS) consente l'attivazione diretta e non-invasiva di strutture cerebrali profonde fino a 6 cm. La DTMS utilizza un coil (H-coil) brevettato ed unico nel suo disegno ed architettura. La DTMS, grazie al suo particolare disegno raggiunge le strutture più profonde modulando eccitazione e/o inibizione neuronale, anche nel sistema limbico implicato nei disturbi dell'umore come depressione, sindromi bipolari, tossicodipendenze, disturbo ossessivo-compulsivo, ed altri ancora in fase di studio. In particolare, la DTMS a bassa frequenza sull'area motoria primaria potrebbe avere effetti significativi sulla modulazione delle discinesie indotte da levodopa (LID), ipotizzando che una stimolazione magnetica profonda e con un più largo volume di attivazione, possa determinare una maggiore inibizione delle aree corticali con conseguenti maggiori e duraturi effetti benefici sulle LID. Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare il miglioramento clinico in termini di recupero di funzioni motorie, del freezing e del cammino, dei movimenti involontari, degli aspetti cognitivi e psichiatrici in pazienti affetti da MP e PSP utilizzando DTMS per la riabilitazione motoria.

Lo studio, longitudinale cross-over randomizzato in doppio cieco, ha avuto lo scopo di investi-

gare l'efficacia nel recupero funzionale, nella riduzione dei movimenti involontari e negli aspetti neuropsicologici indotti dalla terapia con Deep TMS® in 40 pazienti affetti da Malattia di Parkinson e PSP.

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 12 sedute (T1-T3), per ogni ciclo di stimolazione DTMS device o SHAM DTMS. Le valutazioni cliniche sono state effettuate da uno sperimentatore in doppio cieco rispetto al trattamento effettuato dal paziente
- videoripresa nella fase pre e post trattamento
- somministrazione di scale specifiche:
  - Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)
  - Hoehn and Yahr
  - PSP Rating Scale and Staging System
  - Timed up and go test
  - UDyRS
  - Diario pazienti
  - Non Motor Symptom Scale
  - Scala dell'Apatia
  - Questionario di Beck sulla depressione
  - The Parkinson's Disease Questionnaire (PDQ-39)
  - Test Cognitivi (MOCA)

Malattia di Parkinson con discinesie:

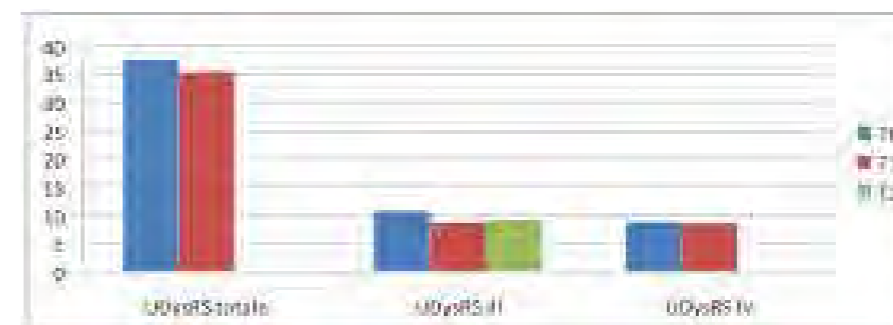
Sono stati arruolati 15 pazienti affetti da Malattia di Parkinson con discinesie di picco levodopa-indotte e senza deterioramento cognitivo (MOCA>24), afferenti al Centro per la Malattia di Parkinson dell'IRCCS San Raffaele Pisana. Tutti i pazienti erano in terapia dopaminergica stabile da almeno 4 settimane. Le valutazioni cliniche motorie sono state effettuate in ON, utilizzando l'UPDRS parte motoria per la valutazione della gravità dei sintomi motori e l'UDysRS, per la valutazione dei movimenti involontari (parte I disabilità causata da discinesie percepita dal paziente, parte II disabilità causata dalla distonia OFF percepita dal paziente; parte III scala dell'intensità - compromissione obiettiva; parte IV scala dell'invalidità obiettiva). Ogni paziente è stato sottoposto a 12 sedute di r-TMS in 4 settimane, con una stimolazione a bassa frequenza (1Hz/110 % RMT per 15 minuti) sull'area motoria (M1) e sulla corteccia prefrontale (PF). Inizialmente lo studio prevedeva una stimolazione a 10 Hz sulla corteccia prefrontale, come protocollo pilota effettuato dalla Brainsway. Durante il corso dello studio si è osservato invece che tale frequenza produceva un aumento delle discinesie.

Le stimolazioni sono state effettuate durante la fase OFF. Le valutazioni cliniche sono state eseguite alla stessa ora e dallo stesso clinico prima del trattamento (T0), il giorno dopo l'ultima sessione di stimolazione (T1). Inoltre, è stata ripetuta una valutazione dell'intensità delle discinesie con l'UDysRS parte III una settimana dalla fine dello studio (T2). Le analisi statistiche per la valutazione dei punteggi dal T0 e a una settimana dalla fine del trattamento sono state effettuate mediante il Wilcoxon Sign-Rank Test for matched pairs (p-value <0.05). Tutte le analisi sono state condotte in STATA/SE V12.

I 13 pazienti (6 F, 7 M), che hanno terminato lo studio, presentavano una media di età pari a 67,5 ± 6,5 anni, una durata di malattia di 12,9±4,7 anni, un dosaggio medio di L-dopa di 500 mg/die. Due pazienti hanno interrotto lo studio per ritiro del consenso, dopo le prime sedute di trattamento. Non si sono verificati eventi avversi. I risultati hanno mostrato una riduzione lieve ma significativa dei punteggi di tutte le scale di valutazione, tranne per la parte IV-invalidità oggettiva dell'UDysRS. In particolare, l'UPDRS parte III ha mostrato una lieve riduzione significativa dopo

le 4 settimane dal trattamento (T0 24±10,9, T1 24,08 ±10,7; p<0,01); il punteggio totale dell'UDysRS ha mostrato un lieve decremento statisticamente significativo (T0 34±14,60 T1 31± 14,68; p<0,005).

L'UDysRS parte III (intensità - compromissione obiettiva delle discinesie) mostrava un punteggio di 10,69±4,35 al T0 e di 8,69±4,71 al T1, mostrando una lieve riduzione statisticamente significativa (p<0,001); al T3 il punteggio era di 9,15±4,83 (cambiamento dal T0 p=0,003; cambiamento dal T1 p=0,15); il punteggio della parte IV- invalidità oggettiva non ha mostrato un decremento (T0 8,85±3 /T1 8,46±3,23).



	MEDIA	DEV.STANDARD	P-value
ETA'	67,5	6,55	
MOCA	26,5	1,20	
DURATA MALATTIA	12,9	4,75	
UPDRS III t0	25,23	10,89	
UPDRS III t1	24,08	10,70	p<0,01
UDysRS TOTALE t0	37,54	14,60	
UDysRS TOTALE t1	35,46	14,68	p<0,001
UDysRS III t0	10,69	4,35	
UDysRS III t1	8,69	4,71	p<0,001
UDysRS III t2	9,15	4,83	p<0,001 da t0 p<0,15 da t1
UDysRS IV t0	8,85	3,0	
UDysRS IV t1	8,46	3,23	p=0,05

## Pazienti con Paralisi Sopranucleare Progressiva (PSP)

In questo studio sono stati arruolati 20 pazienti (10 femmine e 10 maschi) afferenti in maniera consecutiva all'Ambulatorio per i Disordini del Movimento del nostro Istituto. Un paziente ha interrotto prematuramente lo studio a causa di un episodio di polmonite alla fine del primo ciclo di trattamento. I pazienti sono stati sottoposti a 12 sessioni di trattamento (3 volte a settimana) di stimolazione DTMS ripetitiva usando l'H2 Coil (Brainsway LDT). Ogni sessione di stimolazione attiva/sham ha avuto la durata di 30 minuti e consisteva di due stimolazioni consecutive: la prima a bassa frequenza (1 Hz) nella corteccia motoria e la seconda ad alta frequenza (10 Hz) nella corteccia prefrontale.

La DTMS Sham era ottenuta mediante utilizzo di un coil DTMS inattivo ma utilizzando lo stesso protocollo di calibrazione della strumentazione.

Lo studio è stato strutturato in due periodi, separati da un periodo di wash-out di 5 settimane. Il trattamento è stato somministrato nella sequenza attivo/sham nel 58% dei soggetti e sham/attivo nel restante 42%. L'assegnazione casuale al trattamento è stata elaborata da un software informatico realizzato appositamente per questa ricerca.

Le valutazioni motorie e non motorie sono state eseguite alla visita basale e alla fine del trattamento di ciascuna fase dello studio utilizzando le seguenti scale: scala PSP, scala dei sintomi non motori (NMS), Questionario per la qualità della vita nella Malattia di Parkinson (PDQ39), scala di Hamilton per la depressione, scala dell'apatia e la valutazione cognitiva mediante MOCA.

Statistiche riassuntive (frequenze assolute e relative, medie e deviazioni standard) sono state usate per descrivere le caratteristiche del campione. La distribuzione delle variabili è stata ispezionata mediante istogrammi e la deviazione dalla normalità è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk.

I valori statistici sono stati riassunti come medie e deviazioni standard per tutti i 19 pazienti e stratificando per tipologia di trattamento (attiva e sham) e tempo di valutazione (pre-stimolo: T0 per il primo periodo, T2 per il secondo periodo, post-stimolo: T1 per il primo periodo, T3 per secondo periodo).

L'età media alla diagnosi era di 64 anni (SD = 9 anni) per i soggetti trattati con la stimolazione attiva durante il primo ciclo di trattamento, e 72 anni (DS = 7 anni) per gli altri.

Da un'analisi descrittiva iniziale è emerso che non vi erano differenze statisticamente significative tra i pazienti che hanno iniziato con la stimolazione attiva ed i pazienti che hanno iniziato con trattamento sham. Le caratteristiche del campione sono state sintetizzate come segue:

<b>Età</b>	
Alla diagnosi	67.5 ± 9.0
All'arruolamento	71.3 ± 8.4
<b>Sesso</b>	
Maschi	10 (53%)
Femmine	9 (47%)
<b>Farmaci</b>	
Levodopa	12 (63%)
Mantadan	6 (32%)
Azilect	14 (74%)
<b>Stadio PSP</b>	
1	0 (0%)
2	7 (37%)
3	6 (32%)
4	5 (26%)
5	1 (5%)

I pazienti sono stati valutati prima e dopo real DTMS e rDTMS sham. I valori medi rilevati per ciascun parametro di valutazione nel gruppo che aveva stimolazione attiva o sham nel primo e nel secondo periodo sono riportati nella tabella che segue.

Clinical Measures (n=76)	Active Treatment (n=38)			Sham Treatment (n=38)		
	Pre-Stimulation (n=19)	Post-Stimulation (n=19)	Comparison (p-value)	Pre-Stimulation (n=19)	Post-Stimulation (n=19)	Comparison (p-value)
PSP Scale	35.4 ± 15.6	33.2 ± 16.9	0.68	35.4 ± 17.4	35.7 ± 17.3	0.96
MOCA	17.7 ± 5.7	19.2 ± 6.0	0.44	18.6 ± 6.0	18.2 ± 5.9	0.83
PDQ39	36.2 ± 18.0	33.8 ± 17.4	0.68	34.9 ± 17.9	35.1 ± 17.9	0.97
NMS	75.5 ± 56.2	64.8 ± 57.8	0.57 (ln=0.31)	66.1 ± 58.2	67.4 ± 58.1	0.95 (ln=0.87)
Hamilton	8.2 ± 4.7	7.3 ± 3.9	0.53 (ln=0.86)	8.1 ± 4.3	8.6 ± 4.5	0.74 (ln=0.69)
Apatia	17.4 ± 5.0	16.5 ± 5.3	0.60	16.7 ± 5.4	16.0 ± 6.5	0.71

Clinical Measures (n=38)	Active Treatment (n=22)			Sham Treatment (n=16)		
	Pre-Stimulation (n=11)	Post-Stimulation (n=11)	Comparison (p-value)	Pre-Stimulation (n=8)	Post-Stimulation (n=8)	Comparison (p-value)
PSP Scale	35.4 ± 14.5	34.8 ± 15.1	0.92	34.3 ± 21.1	34.4 ± 21.2	0.99
MOCA	18.5 ± 4.8	19.9 ± 4.7	0.51	17.8 ± 7.5	17.0 ± 7.1	0.84
PDQ39	38.6 ± 13.0	37.2 ± 12.8	0.80	29.8 ± 22.8	29.9 ± 22.8	0.99
NMS	77.8 ± 57.4	73.7 ± 60.5	0.87 (ln=0.65)	54.9 ± 55.5	55.8 ± 55.3	0.98 (ln=0.94)
Hamilton	8.5 ± 5.3	7.7 ± 4.4	0.70 (ln=0.96)	7.4 ± 3.8	7.9 ± 3.4	0.79 (ln=0.71)
Apatia	17.7 ± 5.1	17.1 ± 5.3	0.78	15.5 ± 5.9	15.5 ± 5.9	1.00

Clinical Measures (n=38)	Active Treatment (n=16)			Sham Treatment (n=22)		
	Pre-Stimulation (n=8)	Post-Stimulation (n=8)	Comparison (p-value)	Pre-Stimulation (n=11)	Post-Stimulation (n=11)	Comparison (p-value)
PSP Scale	35.3 ± 18.0	30.9 ± 19.9	0.65	36.2 ± 15.3	36.6 ± 14.9	0.94
MOCA	16.6 ± 6.9	18.3 ± 7.7	0.66	19.2 ± 4.9	19.0 ± 5.0	0.93
PDQ39	32.9 ± 23.9	29.1 ± 22.4	0.75	38.6 ± 13.3	38.9 ± 13.1	0.95
NMS	72.4 ± 58.2	52.6 ± 55.4	0.50 (ln=0.31)	74.2 ± 61.4	75.8 ± 61.2	0.95 (ln=0.88)
Hamilton	7.8 ± 4.1	6.8 ± 3.1	0.59 (ln=0.83)	8.6 ± 4.8	9.1 ± 5.2	0.83 (ln=0.85)
Apatia	17.0 ± 5.2	15.8 ± 5.6	0.65	17.6 ± 5.2	16.4 ± 7.2	0.64

Il confronto tra stimolazione attiva e sham, valutata utilizzando il t-test non ha mostrato alcun risultato significativo. Dopo aggiustamento per i punteggi basali, per le scale PSP e PDQ39 è emerso un effetto di interazione tra DTMS e periodo di somministrazione. In particolare, è stato stimato che il trattamento attivo applicato nel primo periodo ha indotto una diminuzione di circa 0,79 punti (p = 0,41) della scala PSP, e una diminuzione di 4 punti (p = 0,01), quando somministrato nel secondo periodo; mentre per quanto riguarda i punteggi PDQ39, un decremento di 1,23



punti ( $p = 0.004$ ) può essere stimato per la stimolazione attiva nel primo periodo, e una diminuzione di 3,05 punti ( $p < 0.01$ ), se la stimolazione attiva veniva applicata nel secondo periodo.

Pertanto, il miglioramento più ampio è stato osservato quando la stimolazione attiva veniva somministrata nel secondo periodo, dopo il periodo con trattamento sham. Il punteggio MoCA non è invece stato influenzato dal periodo di valutazione ed è quindi stato stimato che l'effetto marginale della DTMS abbia aumentato il punteggio della scala cognitiva di 1,92 punti ( $p < 0.01$ ). Inoltre, si è riscontrato che il punteggio MoCA diminuiva di 0,07 punti ( $p < 0,01$ ), all'aumentare di un anno dell'età alla diagnosi di PSP. Allo stesso modo, il periodo di somministrazione del trattamento attivo non ha avuto un effetto statisticamente significativo sui punteggi NMS e Hamilton. In particolare, il punteggio NMS per il trattamento attivo è stato stimato essere di 1/3 inferiore al punteggio per il trattamento sham ( $p = 0,01$ ), mentre il punteggio Hamilton per il trattamento attivo è stato stimato essere di 1/6 inferiore a quella della DTMS sham ( $p < 0.01$ ). Il trattamento attivo non ha avuto alcun effetto significativo sulla apatia, che invece sembra essere influenzata dal tempo che intercorre tra l'età al momento della diagnosi e l'età al momento del reclutamento nello studio. Il suo effetto è stato stimato essere di 0,17 punti di incremento per ogni anno di differenza ( $p = 0,03$ ).

Nei pazienti parkinsoniani con discinesie la DTMS a bassa frequenza ha dimostrato di determinare una lieve ma significativa riduzione dell'intensità delle discinesie, con minimi effetti residui una settimana dopo la fine del trattamento. Tale miglioramento dell'intensità non ha avuto però un significato clinico nel migliorare la disabilità causata dai movimenti involontari.

Nei pazienti con PSP i risultati hanno mostrato un miglioramento dei sintomi motori e non motori in quasi tutti i pazienti in aree quali l'attenzione e la linguaggio, il sonno e la stanchezza, la stipsi, l'andatura e l'instabilità posturale. Si è trattato di un miglioramento a breve termine (stimato in 6/7 giorni dopo l'ultimo trattamento), ma molto apprezzato dai pazienti e dai loro caregivers. I feedback ottenuti da tutti i pazienti sono stati molto positivi, dopo la fine del trattamento, e tutti erano disposti a proseguire il trattamento.

## Studio osservazionale sulle caratteristiche cliniche e terapeutiche in pazienti con malattia di Parkinson da più di 20 anni

La Malattia di Parkinson (PD) è una malattia cronica con progressiva disabilità.

La progressione patologica della malattia e, di conseguenza, l'evoluzione clinica (storia naturale) è inesorabile ma il trattamento può migliorare i sintomi, modificandone la loro manifestazione clinica e la rilevanza che ciascun fattore invalidante ha sui pazienti. Il termine «advanced-PD» è ampiamente accettato per indicare soggetti con complicanze motorie, ma molti pazienti continuano a progredire verso una fase meno ben definita: la sequenza di eventi non è universale per tutti i pazienti e un sottogruppo di essi classificati con il termine di «advanced-PD» non soddisfano la definizione classica di PD avanzato.

Gli studi che hanno descritto le caratteristiche cliniche considerando la classificazione Hoehn & Yahr, fase 4 e 5, hanno dimostrato che il fenotipo del PD cambia notevolmente nelle fasi avanzate e che i sintomi che maggiormente contribuiscono alla disabilità nella fase avanzata di malattia differiscono da quelle presenti negli stadi meno avanzati e in fase iniziale. La disabilità in fase avanzata è principalmente associata a sintomi non motori quali demenza, psicosi e disautonomia e ai sintomi motori che non rispondono alla levodopa, quali le cadute. Relativamente pochi studi hanno descritto le caratteristiche cliniche, la qualità della vita e la progressione della malattia nei pazienti con molti anni di malattia e di trattamento. Il Sydney Multicenter Study è il più lungo studio prospettico sulla MP e si basa sul follow-up a 20 anni di 136 pazienti parkinsoniani de novo, inizialmente arruolati per comparare l'efficacia e la tollerabilità di basse dosi di L-dopa versus bromocriptina. Questo studio ha dimostrato che le complicanze motorie sono presenti

nella maggior parte di pazienti, ma i problemi più invalidanti a lungo termine sono quelli relativi ai sintomi non responsivi alla levodopa. Presenta, però, il limite di essere uno studio prospettico in pazienti parzialmente selezionati, inizialmente arruolati in un trial clinico, quindi con caratteristiche cliniche e susseguente gestione farmacologica ben precisa. Altri studi hanno considerato solo le caratteristiche cliniche dei soggetti «advanced-PD» ma non in funzione degli anni di malattia, e senza considerare gli elementi di comorbidità.

Una conoscenza approfondita delle caratteristiche cliniche dei pazienti in fase avanzata si rende necessaria, dal momento che tali pazienti rappresentano un carico importante per le famiglie e il sistema sanitario, e per individuare nuovi target (farmacologici e sintomatologici) a cui indirizzarsi nelle fasi precoci di malattia.

Gli obiettivi dello studio sono:

- caratterizzazione clinica e terapeutica dei pazienti con MP diagnosticata e trattata da più di 20 anni
- identificazione di diversi fenotipi clinici nella MP avanzata e la loro caratterizzazione farmacologica
- valutazione dell'impatto delle differenti comorbidità
- individuazione dei sintomi che causano maggiore disabilità
- individuazione delle differenti disabilità

Nel primo anno di studio sono stati arruolati 20 pazienti (13 M, 7 F) con diagnosi di malattia di Parkinson idiopatica. La durata media di malattia è di  $21 \pm 1,2$  anni, la media di età è di  $75 \pm 3,5$ , stadio Hoehn & Yahr  $4 \pm 0,7$ . Una analisi preliminare ha evidenziato che il 48% dei pazienti presenta deterioramento cognitivo; le allucinazioni sono presenti in circa il 40% dei pazienti. Disturbi della sfera urinaria sono presenti in circa il 60%. Il 65% presenta discinesie indotte da levodopa e l'80% wearing off disabilitanti. La maggior parte dei pazienti necessita di ausili per la deambulazione.

Durante il secondo anno di studio si provvederà a terminare l'arruolamento dei pazienti e ad effettuare una accurata analisi statistica dei dati. Tale analisi verrà effettuata caricando i dati su supporto informatico ed elaborandoli con adeguati strumenti statistici.

Tale analisi permetterà di definire meglio la popolazione parkinsoniana in fase avanzata con lo scopo di individuare nuovi target per ottimizzare la gestione di questi pazienti.

## LABORATORIO DI NEUROBIOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

### Caratterizzazione della proteina SIRT6 nel sistema nervoso centrale

SIRT6 fa parte di una famiglia di enzimi altamente conservati, le sirtuine, le cui molteplici funzioni biologiche sono dipendenti dalla presenza del cofattore NAD<sup>+</sup>. SIRT6 è una proteina nucleare caratterizzata da due distinte attività enzimatiche, attività deacetilasi ed attività ADP ribosilasi. Se da un lato la generazione di topi knock-out per SIRT6 ha evidenziato come questa proteina sia essenziale per il corretto funzionamento di diversi pathway metabolici così come per la stabilità genomica, dall'altro, topi transgenici sovraesprimenti SIRT6 hanno mostrato la capacità di resistere a danni metabolici indotti da una dieta ad alto contenuto di grassi e di sopprimere le risposte infiammatorie. Inoltre, esperimenti effettuati su colture neuronali hanno dimostrato come la sovraespressione di SIRT6 possa esercitare effetti protettivi o deleteri in relazione al tipo cellulare ed allo stimolo tossico utilizzato.

In questo secondo anno di progetto, è stato valutato l'impatto della sovraespressione di SIRT6 sulla vitalità cellulare di colture neuronali primarie sia in condizioni basali, che esposte a condizioni di stress ossidativo. A tal fine sono stati generati vettori adenovirali ricombinanti di sierotipo 2/1 esprimenti SIRT6 murino sotto il controllo del promotore neurospecifico CAMKII fuso all'N-terminale con un tag HA (rAAV-SIRT6). Colture ippocampali e corticali sono state infettate a DIV 4 ed analizzate a DIV 11. Come controllo sono stati utilizzati gli stessi vettori adenovirali privi della sequenza codificante per SIRT6 (rAAV-HA). L'analisi per immunofluorescenza e per western blot ha mostrato come l'espressione di SIRT6 ha inizio a 7 DIV e raggiunge il livelli massimi di espressione a 11 DIV con un'efficienza di traduzione pari a circa il 60%. Come previsto, la localizzazione di SIRT6 esogeno era prevalentemente nucleare al pari della proteina endogena. L'analisi della morfologia neuronale non ha rivelato significative alterazioni sia a livello neuritico che dendritico. Per analizzare i livelli di vitalità cellulare in condizioni basali è stato effettuato un test colorimetrico di MTT. I valori di assorbanza ottenuti a DIV 11, quando i livelli di SIRT6 erano massimi, hanno dimostrato come la sovraespressione di SIRT6 di per sé non ha effetti significativi sia in colture primarie ippocampali che corticali. Lo stesso risultato è stato confermato mediante l'analisi e la conta dei nuclei apoptotici nelle stesse condizioni sperimentali.

Per valutare gli effetti della sovraespressione di SIRT6 sulla vitalità cellulare in condizioni di stress ossidativo, neuroni corticali di topo sono stati infettati con rAAV-SIRT6 e relativo virus di controllo e successivamente (DIV 10) sono state sottoposte per 30 minuti a trattamenti con 20 e 50  $\mu$ M di perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Dopo 24 ore, le cellule così trattate sono state analizzate mediante test colorimetrico di MTT. I risultati ottenuti hanno mostrato come le cellule infettate con SIRT6 presentavano dei livelli ridotti di vitalità cellulare in seguito a trattamento con 20  $\mu$ M di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rispetto alle cellule infettate con il virus di controllo (69  $\pm$  11,6% per rAAV-SIRT6 e 99  $\pm$  12,5% per rAAV-HA rispetto alle cellule non trattate). Aumentando la concentrazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 50  $\mu$ M, l'effetto citotossico era ancora più consistente, con percentuali pari al 36,7  $\pm$  5% per rAAV-SIRT6 e del 77  $\pm$  12,4% per rAAV-HA rispetto alle cellule non trattate. Questi risultati suggeriscono che la sovraespressione di SIRT6 in colture neuronali corticali costituisce un fattore deleterio per la sopravvivenza cellulare specificatamente in condizioni di stress ossidativo. Esperimenti effettuati su linee ippocampali HT22 trattate con uno stimolo differente di stress ossidativo (homocysteic acid) hanno invece dimostrato come la sovraespressione di SIRT6 costituisca un fattore modera-

tamente protettivo.

L'insieme di questi studi supporta il ruolo di SIRT6 nella regolazione della sopravvivenza neuronale e suggerisce come questa sirtuina possa avere un effetto protettivo o citotossico in relazione alla tipologia cellulare così come allo stimolo utilizzato. Inoltre, la disponibilità di vettori adenovirali ricombinanti codificanti per SIRT6 costituisce uno strumento importante per lo studio della biologia di questa proteina nel sistema nervoso.

### Sviluppo di strategie immunoterapeutiche innovative specifiche per la malattia di Alzheimer utilizzando gli anticorpi intracellulari

Le strategie immunoterapeutiche dirette a neutralizzare la neurotossicità e la sinaptotossicità delle forme oligomeriche del peptide beta amiloide (A $\beta$ O) sono tra le più promettenti nella lotta contro la malattia di Alzheimer (AD). La generazione e l'accumulo cerebrale dell'A $\beta$ O è considerato infatti uno degli eventi precoci e determinanti nella patogenesi dell'AD. La generazione e l'applicazione di anticorpi intracellulari diretti specificatamente contro l'A $\beta$ O rappresenta uno strumento terapeutico importante perché unisce la specificità degli anticorpi ricombinanti diretti contro conformeri specifici neurotossici come l'A $\beta$ O, con la capacità di veicolare tali forme anticorpali verso i siti di localizzazione cellulare coinvolti nella formazione, l'accumulo e l'azione patologica dell'A $\beta$ O. Dopo aver generato, caratterizzato ed applicato in vitro anticorpi intracellulari anti-A $\beta$  1-42 oligomerica diretti verso diversi compartimenti cellulari tra cui quelli pre e post-sinaptico, ci si propone di valutare gli effetti in vivo di questi anticorpi anti-A $\beta$ O diretti verso il compartimento post-sinaptico, un sito di azione dell'A $\beta$ O molto rilevante nella patogenesi dell'AD. In questo anno di progetto, al fine di valutare in vivo gli effetti neuroprotettivi e sinaptoprotettivi degli anticorpi intracellulari anti-A $\beta$ 1-42 oligomerica in un modello murino di AD, sono state inizialmente testate due differenti dosi di rAAV (1x10<sup>9</sup> e 3x10<sup>9</sup> unità di trasduzione virale) in topi wt mediante iniezione intracerebroventricolare (icv). Poiché nel modello murino di AD utilizzato si osservano deficit cognitivi e morte neuronale tra i 4 ed i 9 mesi di età, appropriati gruppi di topi wt sono stati iniettati a 2-3 di età. Una volta raggiunta l'età di 4 mesi, i topi sono stati sacrificati, i cervelli sono stati rimossi, ed è stata effettuata un'analisi della compartimentalizzazione cerebrale, dei livelli proteici, dell'efficienza di trasduzione e di eventuali sintomi citotossici associati all'espressione degli anticorpi intracellulari iniettati. A questo scopo sezioni coronali ed estratti proteici totali di cervello sono stati analizzati mediante immunofluorescenza e western blot con anticorpi anti-myc per il riconoscimento degli scFvs. La colorazione con Cresyl violet è stata effettuata per rilevare eventuali livelli di morte neuronale. Eventuali risposte immunitarie avverse dovute all'infezione con rAAV (sierotipo 1/2) sono state valutate mediante immunocolorazione con anticorpi specifici anti-LN3 ed anti-GFAP. Le analisi effettuate hanno rivelato che, utilizzando dosi di rAAV pari a 1x10<sup>9</sup> e 3x10<sup>9</sup> unità di trasduzione virale, l'efficienza di trasduzione (data come percentuale di neuroni infettati) di tali vettori è sostanzialmente bassa. Inoltre, in queste condizioni sperimentali, i livelli di espressione proteica degli scFv anti-A $\beta$ 1-42 oligomerica si mantengono elevati fino a 1.5 mesi dopo l'iniezione. Probabilmente entrambi i risultati sono legati all'iniezione di dosi di rAAV non ottimali anche se non si può escludere che la vita media (t<sub>1/2</sub>) degli anticorpi intracellulari sia breve una volta iniettati nel parenchima cerebrale rispetto a quanto invece osservato su colture neuronali primarie. Non sono stati osservati fenomeni di citotossicità né risposte immunitarie avverse. Dosi maggiori di rAAV ed eventuali iniezioni multiple dovranno essere quindi valutate su topi wt per trovare le condizioni ottimali di iniezione prima di testare l'efficacia neuroprotettiva e sinaptoprotettiva degli scFv anti-A $\beta$ 1-42 oligomerica sul modello murino di AD.

## Ruolo della DNA-PK nella risposta allo stress ossidativo

Le proteine DNA-PK ed ATM rappresentano due regolatori chiave della risposta alla riparazione delle rotture a doppio filamento del DNA (DSBs). In particolare, risultati recenti suggeriscono che la DNA-PK abbia un ruolo nell'omeostasi redox mediante l'inibizione dell'iperattivazione di ATM e che cellule DNA-PK  $-/-$  risultano maggiormente sensibili a stimoli apoptotici mediati da stress ossidativo, incluso il perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ). Non è ancora chiaro comunque quale sia il meccanismo attraverso il quale la DNA-PK eserciti la sua attività protettiva in questa risposta allo stress ossidativo.

Al fine di determinare il "pathway" di sopravvivenza mediato dalla DNA-PK in condizioni di stress ossidativo, le cellule PC12 sono state pre-incubate per 24 h con un inibitore specifico dell'attività chinasi della DNA-PK (NU7026,  $10\mu M$ ) e successivamente trattate con concentrazioni crescenti di  $H_2O_2$  (0.3-1 mM) per 30 minuti. L'inibitore NU7026 è stato aggiunto anche nei 30 minuti di trattamento con  $H_2O_2$ . Le cellule sono state quindi raccolte, sottoposte ad estrazione proteica totale ed analizzate tramite western blot con anticorpi specifici per AKT (i.e. AKT totale, AKTSer473, AKTThr308). AKT è un regolatore chiave del pathway di sopravvivenza cellulare che si attiva in risposta a molteplici stimoli citotossici, inclusa l' $H_2O_2$  e AKTSer473 è un substrato specifico della DNA-PK in presenza di danno al DNA. I risultati ottenuti hanno mostrato come l' $H_2O_2$  induce un aumento dose-dipendente dei livelli di fosforilazione di AKTSer473 e di AKTThr308 mentre i livelli di AKT totale rimangono sostanzialmente invariati. In presenza di NU7026 si osserva una forte riduzione dei livelli di fosforilazione di AKTSer473 per ogni punto sperimentale mentre i livelli di AKTThr308 non vengono alterati. L'inibizione dei livelli di AKTSer473 ma non di AKTThr308 in presenza di NU7026 suggerisce il coinvolgimento specifico della DNA-PK nella risposta all' $H_2O_2$ . Una ulteriore conferma di questo si è avuta trattando le cellule con insulina (100 nM, 10 minuti), nota per la sua capacità di mediare la fosforilazione e quindi l'attivazione di AKT indipendentemente dall'attività chinasi della DNA-PK. In queste condizioni sperimentali infatti si è osservato come l'NU7026 non sia in grado di inibire la fosforilazione di AKT per entrambi i residui, i cui livelli rimangono elevati in presenza di insulina. Per verificare l'aumento dei livelli apoptotici in seguito all'inibizione della DNA-PK e quindi dell'attivazione del pathway di sopravvivenza mediato dal suo substrato AKT, sono state esposte le cellule PC12 a concentrazioni crescenti di  $H_2O_2$  (0.5-1 mM) per 30 minuti in seguito a pre-trattamento con NU7026. Dopo 24 ore le cellule sono state raccolte, sottoposte ad estrazione proteica ed analizzate tramite western blot con anticorpi specifici per la Caspasi 3 e PARP, due proteine soggette a proteolisi (e quindi accumulo di specifici prodotti di degradazione) in seguito ad apoptosi. I risultati ottenuti hanno rivelato che a queste concentrazioni di  $H_2O_2$  le cellule vanno incontro ad apoptosi e che l'inibizione specifica della funzionalità della DNA-PK induce un aumento dei livelli apoptotici come evidenziato dall'accumulo dei prodotti di degradazione della Caspasi 3 e di PARP. L'analisi dell'attività di un'altra proteina coinvolta nei processi di vitalità cellulare così come di morte, ERK, ha mostrato come nelle stesse condizioni sperimentali, NU7026 induce un aumento della sua attività come rivelato dall'aumento dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 (Thr202/Tyr204), suggerendo un "cross-talk" tra AKT ed ERK come già riportato in letteratura, ed un potenziale ruolo citotossico di ERK in seguito a stress ossidativo. L'insieme di questi risultati dimostra come la DNA-PK svolga un ruolo protettivo nella risposta citotossica mediata dall' $H_2O_2$  attraverso l'attivazione di AKT.

## LABORATORIO DI ELETTROFISIOLOGIA

### I recettori dell'acetilcolina nel muscolo di pazienti affetti da sclerosi laterale amiotrofica (SLA): un nuovo target nella patogenesi della malattia

La SLA è una patologia degenerativa e progressiva del sistema nervoso ad esito fatale che colpisce selettivamente i motoneuroni. Nel 90% dei pazienti, la malattia è causata da una progressiva degenerazione dei motoneuroni; tuttavia molti studi supportano l'ipotesi cosiddetta del dying-back nella quale la degenerazione della placca neuromuscolare gioca un ruolo chiave nella progressione della malattia. È stato inoltre dimostrato che i muscoli dei pazienti SLA non sono "semplicemente" muscoli denervati, poiché i loro nAChRs sono diversi nelle proprietà elettrofisiologiche dai pazienti con denervazione non-ALS e che il riluzolo, il solo farmaco disponibile contro la SLA, può modificare la funzionalità degli AChRs, suggerendo che questi possono essere un nuovo target per testare composti utili nella terapia SLA.

Recentemente, è stato osservato che molti pazienti traggono beneficio in seguito al trattamento con l'N-Palmitoylethanolamide (PEA). Il PEA è un mediatore lipidico appartenente alla famiglia degli endocannabinoidi (ECs) che vengono prodotti per proteggere l'organismo da danni causati da varie situazioni patologiche esercitando un'azione antiossidante, ipotensiva, immunosoppressiva, antiinfiammatoria e, in particolare, antidolorifica (Di Marzo et al, 1998; Cota et al, 2005).

Considerando che i recettori per l'ACh mediano la comunicazione nervo-muscolo, gli obiettivi del progetto sono:

- Capire i meccanismi molecolari che spieghino le differenze tra SLA e muscoli di controllo. In particolare lo scopo è quello di verificare se queste differenze possano dipendere da un'alterazione delle subunità degli AChRs nei muscoli SLA rispetto a muscoli di pazienti denervati;
- Studiare le correnti evocate dall'ACh in tessuti muscolari di pazienti SLA e di controllo e verificare se queste possano essere modulate dal PEA;
- Testare il PEA su pazienti SLA e verificare se possa contribuire positivamente o negativamente alla progressione della malattia secondo l'idea che la denervazione possa precedere o anche contribuire alla degenerazione dei motoneuroni (Musarò et al., 2011). In particolare è stato valutato se il PEA influenzi i valori di Functional Rating Scale-Revised (ALS-FRS), forza muscolare (MRC) e capacità vitale forzata (FVC) dei singoli pazienti.

I pazienti affetti da SLA (forma spinale) e di controllo sono stati reclutati in collaborazione con il centro SLA Policlinico Umberto I di Roma e il prelievo dei tessuti è stato effettuato tramite ago-biopsia da muscoli bicipite e deltoide, come descritto precedentemente (Palma et al., 2011). Le valutazioni neurologiche sono state effettuate dal Policlinico Umberto I ogni 3 mesi dalla somministrazione del PEA. Le stesse valutazioni sono state effettuate in un altro gruppo di pazienti che non ha ricevuto il farmaco.

Campioni di muscolo (0,6-1  $\mu g$ ) sono stati omogeneizzati e l'RNA totale estratto con il metodo Trizol. L'integrità dell'RNA è stata valutata mediante elettroforesi su gel e la sua concentrazione misurata mediante spettrofotometria. Gli RNA messaggeri (mRNA) verranno infine isolati utilizzando una resina Oligotex. La RT-PCR quantitativa è effettuata come descritto precedentemente.

L'uso di rane femmine *Xenopus Laevis* è conforme alle politiche istituzionali e alle linee guida del Ministero della Salute. La preparazione delle membrane umane, la loro iniezione in ovociti di *Xenopus Laevis* e le registrazioni delle correnti ACh sono state effettuate come descritto precedentemente (Miledi et al., 2006; Palma et al., 2011).

Grazie ad un approccio traslazionale che ha coinvolto ricerca di base, biologia molecolare e ricerca clinica, questo progetto ha permesso di raggiungere importanti risultati sullo studio di tessuti muscolari direttamente da pazienti SLA rafforzando l'idea che il muscolo possa essere un nuovo target terapeutico per la cura di questa patologia. In particolare sono stati raggiunti i seguenti risultati:

1. una aumentata espressione della subunità alpha quattro volte superiore nel muscolo di pazienti SLA rispetto al muscolo di paziente denervato - che potrebbe contribuire a spiegare la differente affinità per l'ACh trovata precedentemente;
2. una maggiore stabilità del recettore ACh in presenza di PEA durante ripetute applicazioni di ACh sia nei muscoli SLA che denervati;
3. una minor riduzione del valore di capacità vitale forzata nei pazienti SLA dopo prolungato trattamento con PEA.

### La neuro infiammazione nelle displasie pediatriche: ruolo dell'IL-1? nella modulazione del recettore GABA-A

L'epilessia del lobo temporale è la forma più frequente di epilessia farmaco resistente focale (Blümcke et al., 2013). I meccanismi neuro infiammatori sono ritenuti molto rilevanti nella genesi degli attacchi epilettici; in particolare, il rilascio della citochina IL-1beta e l'espressione del suo recettore IL-1R1 è aumentata sia in modelli sperimentali di epilessia che nei pazienti epilettici (Vezzani et al., 2011). Finora, mentre è stato chiaramente delucidato che la IL-1beta possa agire come agente pro convulsivante aumentando la trasmissione glutammatergica tipo NMDA (Balloso et al., 2005), non è chiaro se possa avere un'azione modulatrice anche sulla trasmissione GABAergica.

In questo studio, con l'uso di tessuti cerebrali umani da pazienti epilettici farmaco-resistenti sono stati studiati gli effetti di concentrazioni fisiologiche di IL-1beta sulla trasmissione GABAergica umana.

Gli obiettivi specifici di questo progetto sono:

- Investigare gli effetti di IL-1beta sulla corrente GABAA mediata su tessuti umani epilettici e tessuti di controllo;
- Valutare l'espressione del recettore IL-1R1 e del signalling attivato dal legame tra IL-1beta ed il suo recettore (IRAK1);
- Descrivere quale meccanismo molecolare viene attivato dall'IL-1 beta nella modulazione della corrente GABAA mediata.

I tessuti di pazienti affetti da epilessia e i tessuti di controllo non epilettici sono stati forniti dal Dipartimento di Neuropatologia dell'Università di Amsterdam.

Il livello di espressione di IRAK1 è stato misurato dal tessuto cerebrale omogenato di pazienti epilettici e di controllo. Una uguale quantità di campione (30 µg) è stata utilizzata la quantificazione della proteina.

L'uso di rane femmine *Xenopus Laevis* è conforme alle politiche istituzionali e alle linee guida del Ministero della Salute. La preparazione delle membrane umane, la loro iniezione in ovociti di *Xenopus Laevis* e la registrazioni delle correnti GABA sono state effettuate come descritto precedentemente (Palma et al., 2002).

In questo lavoro sono stati ottenuti i seguenti risultati:

1. IL-1beta a concentrazioni fisiologiche diminuisce l'ampiezza della corrente GABAA sia in corteccia che ippocampo di pazienti mTLE farmaco-resistenti;

2. IL-1beta non modifica la corrente GABAA in tessuti di controllo da autopsie e da lesioni cerebrali non epilettogene;

3. Aumentata espressione del recettore IL-1R1 e del signaling attivato (IRAK1) in tessuti corticali e ippocampali di pazienti epilettici.

Sulla base di questi risultati, ulteriori esperimenti verranno effettuati su tessuti di pazienti pediatriche con epilessia farmaco resistente al fine di investigare se IL-1beta abbia effetti simili a quelli appena descritti. Poiché parte delle sinapsi eccitatorie nelle epilessie pediatriche sono mediate dal GABA, i farmaci di prima linea che aumentano l'attività GABAergica, potrebbero non essere adeguati.

Con la prosecuzione di questo programma ci si aspetta di raggiungere i seguenti risultati:

1. Una chiara valutazione delle caratteristiche funzionali dei recettori GABA-A nelle epilessie pediatriche;
2. Uno studio approfondito degli effetti di IL-1beta in relazione alla natura eccitatoria o inibitoria del GABA in questi tessuti.
3. Una chiara evidenza degli elevati livelli di espressione recettoriale e del signaling (IL-1R1/IRAK1) in tessuti pediatriche dove è presente un forte stato infiammatorio e confrontarli con tessuti di controllo di pazienti con età simili.

## LABORATORIO DI BIOCHIMICA DELL' INVECCHIAMENTO

### Identificazione di marcatori biologici di malattia o di risposta alle terapie in pazienti affetti da Parkinson

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresentano i sottoprodotti fisiologici del metabolismo ossidativo. Tra le fonti di ROS la catena di trasporto degli elettroni mitocondriale riveste il ruolo di maggior produttore endogeno. Lo sbilancio tra la produzione e l'eliminazione di ROS, mediata dall'attività di enzimi antiossidanti e scavengers, porta allo stress ossidativo, un evento coinvolto nei processi di invecchiamento e di numerose patologie neurodegenerative. Il mitocondrio e lo stress ossidativo derivato da alterazioni della sua funzionalità sono implicati nell'eziopatogenesi del morbo di Parkinson (PD).

Uno dei meccanismi di adattamento allo stress ossidativo che consente la sopravvivenza delle cellule, è l'autofagia, un processo catabolico che comporta la degradazione di componenti cellulari endogene attraverso il macchinario lisosomiale. L'autofagia è importante per il bilanciamento delle risorse di energia in momenti critici quali la carenza di nutrienti. Infatti, aumentati flussi di ROS mitocondriali durante condizioni di diminuita disponibilità di nutrienti porta all'attivazione dell'autofagia.

Tuttavia, il ruolo fondamentale svolto dai ROS nella modulazione redox dell'attività di enzimi e proteine strutturali che, a seguito della modificazione di residui tiolici, possono andare incontro a una reversibile acquisizione o perdita di funzione, ha introdotto il concetto della essenzialità dello stress ossidativo. Tra i fattori molecolari modulati dai ROS sono incluse proteine di segnale come le protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) e molti fattori di trascrizione (Nrf2, Jun/AP-1, NF-kB, p53) che regolano il ciclo cellulare, l'apoptosi e il processo autofagico. Più recentemente anche il co-attivatore trascrizionale PGC-1alpha è stato dimostrato essere 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 esiste 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.

Infine, diversi studi epidemiologici, negli ultimi anni, hanno suggerito che l'obesità e il diabete mellito di tipo 2 sono patologie che aumentano notevolmente il rischio di sviluppare il PD. Infatti, meccanismi pato-fisiologici caratteristici del Diabete di tipo 2 o di alterazioni del metabolismo lipidico sembrano essere comuni anche al PD. In particolare, l'infiammazione gioca un ruolo critico nella distruzione delle cellule beta del pancreas e dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra. Inoltre, pazienti affetti da PD presentano una sostanziale riduzione della massa grassa (cachessia). Pertanto sta sempre più prendendo vigore l'ipotesi che il PD possa essere in realtà una patologia che colpisce non solo il metabolismo mitocondriale ma anche quello lipidico. Un importante regolatore del metabolismo lipidico è la lipasi ATGL (lipasi dei trigliceridi adipocitari) fortemente down-regolata in individui obesi o affetti da diabete mellito. Recentemente è stato dimostrato che ATGL ha un ruolo chiave nell'attivare l'asse di segnalazione lipidica che sfocia nell'espressione di geni mitocondriali e nel mantenimento della sua funzione ossidativa. Infatti, l'acido grasso liberato da ATGL media l'aumento dell'espressione PPAR-alpha dipendente da PGC-1alpha, importante co-attivatore trascrizionale implicato nella biogenesi mitocondriale. In particolare, l'acido grasso liberato da ATGL funge da molecola segnale a livello nucleare per l'at-

tivazione di PPARalpha a cui segue l'induzione dell'espressione di PGC-1alpha e della biogenesi mitocondriale.

Pertanto gli obiettivi specifici della ricerca sono stati:

1. Identificare il ruolo di PGC-1alpha nei processi autofagici, in particolare durante il processo di miogenesi. E' stato dimostrato che PGC-1alpha è responsabile del mantenimento dell'integrità mitocondriale durante il differenziamento, condizione caratterizzata da una alta concentrazione di ROS, attraverso la regolazione dell'espressione di enzimi antiossidanti.
2. Caratterizzare il ruolo di ATGL nei processi infiammatori età correlati. E' stato dimostrato che il mantenimento dei livelli proteici di ATGL è fondamentale per l'inibizione della produzione di citochine infiammatorie.
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.
4. Caratterizzare il ruolo dell'ossido nitrico sintasi neuronale nella biogenesi mitocondriale. E' stato dimostrato che la forma nativa dell'ossido nitrico sintasi neuronale attraverso il dominio PDZ viene reclutata a livello dei nuclei dove l'NO prodotto serve come modulatore positivo (attraverso processo di nitrosilazione) di fattori di trascrizione nucleari (CREB) a monte dei processi di induzione della biogenesi mitocondriale.

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 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 riduttasi) 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 trasfettate 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.

Per quanto riguarda la biogenesi mitocondriale, è stato identificato il ruolo di una proteina appartenente al complesso della distrofina, l'alpha-sintrofina ( $\alpha$ -syn), in tale processo. Innanzitutto è stata identificata una forma di  $\alpha$ -syn che risiede sulla membrana nucleare e che è in grado di legare l'ossido nitrico sintasi (nNOS). La presenza di  $\alpha$ -syn nel nucleo "avvicina" il sito di pro-

duzione di NO a specifici target nucleari. Tra questi è stato identificato il fattore di trascrizione CREB fondamentale per l'espressione della principale proteina regolatoria del processo di biogenesi mitocondriale, PGC-1alpha. In particolare, il reclutamento della nNOS attraverso la  $\alpha$ -syn permette un'efficiente S-nitrosilazione di CREB, un maggiore legame di questo al promotore di PGC-1alpha con conseguente aumento dell'espressione delle proteine mitocondriali. Questo meccanismo è particolarmente attivo durante il differenziamento muscolare, processo che si accompagna ad un aumento della massa mitocondriale.

Inoltre, è stato evidenziato il ruolo fondamentale di PGC-1alpha non solo nella biogenesi mitocondriale ma anche nella rimozione dei mitocondri (mitofagia). E' stato cioè dimostrato che la corretta espressione di PGC-1alpha durante la miogenesi, garantisce un'adeguata espressione dei geni antiossidanti mantenendo a livelli fisiologici la concentrazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Infatti, è stato evidenziato che l'assenza di PGC-1alpha si associa ad un aumento dei ROS, i quali sono i responsabili dell'attivazione del fattore di trascrizione redox-dipendente FoxO1 sui promotori di geni mitofagici a valle (es. BNIP2, PINK, Parkin). Pertanto, il lavoro individua PGC-1alpha come repressore della mitofagia.

Infine, è stato individuato il ruolo della lipasi ATGL nei processi anti-infiammatori del tessuto adiposo associati all'invecchiamento. Infatti, è stato osservato che gli adipociti invecchiati presentano bassi livelli di espressione di ATGL e del fattore di trascrizione a valle PPARalpha, noto fungere da repressore del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NFkB. Durante l'invecchiamento, l'assenza di ATGL si associa ad una elevata attività di NFkB sui promotori di citochine infiammatorie quali TNFa e IL-6. Il trattamento con resveratrolo, si è rilevato efficace nell'ostacolare il calo dei livelli di ATGL e di PPARalpha ritardando la produzione di citochine infiammatorie NFkB-mediata. 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. E' stato 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.

I risultati che ci si prefigge di raggiungere sono a completamento di quello che era stato descritto nel progetto di ricerca. In particolare:

- 1) Validare l'efficienza dei processi osservati nel PD. Si studierà l'asse ROS/ATGL/PGC-1alpha in PBMC derivati da PD e controlli. In particolare, si valuterà se i livelli di mRNA e proteici di ATGL e PGC-1alpha sono alterati nei PBMC in modo da suggerire queste variazioni come marcatori predittivi o utilizzarli come fattori di rischio del PD.
- 2) Determinare il ruolo del glutatione nella modulazione di tale asse di segnalazione e/o nelle eventuali alterazioni osservate nel punto 1. In particolare, si valuterà se il calo di glutatione normalmente associato al PD possa alterare la segnalazione redox che sfocia nell'espressione di PGC-1alpha e ATGL.
- 3) Determinare il ruolo del processo infiammatorio indotto da carenza di ATGL. Si valuterà l'instaurarsi di processi infiammatori mediati dall'attivazione di NF-kB in seguito a modulazione di ATGL e/o al trattamento con neurotossine.
- 4) Suggestire approcci nutrizionali e farmacologici innovativi per la prevenzione ed il trattamento del PD. Si determineranno gli effetti di regimi nutrizionali (starvation, overfeeding) in cellule neuronali, muscolari e adipociti allo scopo di identificare fattori cellulari specifici che possano favorire l'espressione di ATGL e PGC-1alpha.

## 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 deacilasi coinvolte nella risposta a diversi tipi di stress e associate all'allungamento della vita. 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. Nei mammiferi esistono sette sirtuine che 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 meccanoettori. 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 prefigge di:

- 1) Indagare il ruolo dell'interazione tra sirtuine e delle CRP nei meccanismi di morte e di riparo cellulare.
- 2) 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, si intende valutare se l'infarto miocardico regola l'espressione delle CRP e le sirtuine e la loro interazione.
- 3) 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. Cloni di tali cellule overesprimenti e silenziate per CRP3/MLP sono stati ottenuti. 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.

Gli esperimenti fin qui 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 nella zona infartuata ma è aumentata nella zona immediatamente vicina l'infarto. Ultimamente è stata anche overespressa o silenziate 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 attraverso l'attivazione della autofagia che consente il riparo del danno e la riorganizzazione cellulare durante il differenziamento.

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.

L'attività motoria regola l'espressione delle sirtuine. Ci si aspetta che l'attività fisica sia caratterizzata da aumentati livelli delle sirtuine e/o CRP. Inoltre ci si aspetta 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 deacilano diverse proteine mitocondriali controllando numerose funzioni come fosforilazione ossidativa, metabolismo della glutammina, ciclo di Krebs, ecc. 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.

Gli obiettivi del presente progetto sono:

- 1) Indagare il ruolo delle sirtuine mitocondriali nella regolazione del metabolismo cellulare.
- 2) Indagare il ruolo delle sirtuine mitocondriali nel mantenere l'integrità, funzionalità e vitalità cellulare.

Linee cellulari e trattamenti:

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 trattamento con apoptogeni.

Misurazione dei livelli delle sirtuine mitocondriali e della loro attività

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.

Misurazione dei parametri cellulari e metabolici

La vitalità cellulare è stata misurata usando un saggio MTT e la conta al trypan blue. Il metabolismo cellulare è stato misurato attraverso saggi biochimici. In particolare, il metabolismo della glutammina è stato misurato utilizzando la produzione di ammoniaca, glutammato e alfa-ketoglutarato. Sono stati usati anche inibitori dei vari enzimi coinvolti nel metabolismo come glutaminasi e glutammato deidrogenasi. Infine, il metabolismo della glutammina è stato bloccato utilizzando una forma solubile di  $\alpha$ -ketoglutarato.

Gli esperimenti condotti dimostrano che le sirtuine hanno un ruolo fondamentale nel controllare e mantenere la funzionalità dei mitocondri. Infatti, le cellule overesprimenti 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, essere 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 studiato è il controllo da parte delle sirtuine del metabolismo della glutammina. In questo caso è stato dimostrato che SIRT5 desuccinila e inibisce l'enzima chiave e cioè la glutaminasi con conseguente diminuzione del metabolismo.

Ci si propone di studiare:

- 1) 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
- 2) Il ruolo delle sirtuine mitocondriali nella regolazione di altri pathway metabolici.

## Riabilitazione cardiaca: medicina riparativa nello scompenso cardiaco

Recentemente, il laboratorio di Patologia Molecolare e Cellulare ha dimostrato, per la prima volta, la presenza di esosomi nei liquidi pericardici (PF) di pazienti di controllo ovvero operati per sostituzione valvolare (PFC) e pazienti con infarto acuto del miocardio (PFMI). E' interessante sottolineare che queste nanovesicole una volta rilasciate nel fluido pericardico dal cuore danneggiato possono agire come effettori paracrini stimolando l'attivazione di programmi di rigenerazione nelle cellule staminali epicardiche che portano alla formazione di nuovi vasi e a una riparazione del tessuto cardiaco adulto.

Effettuando un'analisi proteomica su PFC e PFMI, è stata dimostrata la presenza negli esosomi isolati dai PFMI di diverse proteine tra cui la clasterina (CLU), importante mediatore del processo di transizione epitelio-mesenchimale (EMT).

Gli obiettivi del presente progetto sono:

- 1) Studiare i pathway coinvolti nell'EMT mediato dal fluido pericardico dopo infarto del miocardio (MI).
- 2) Studiare la funzionalità cardiaca in presenza di infarto e trattamento con CLU.
- 3) Studiare l'effetto della somministrazione della CLU sul EMT delle cellule staminali cardiache ckit dopo infarto.

Per gli esperimenti in vivo sono stati utilizzati topi C57/Bl6 femmine di 8 settimane di età. 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. Avendo già verificato che, dopo infarto del miocardio, solo in presenza di fluido pericardico si ha un'attivazione statisticamente significativa dell'EMT, si è cercato di vedere quali fossero i pathway coinvolti in tale processo. I risultati ottenuti mediante analisi bioinformatica dei dati affymetrix hanno dimostrato l'attivazione mediata dal PF di più pathway noti per essere coinvolti nell'EMT. In particolare, sono stati trovati modulati 93 su 165 geni del pathway del TGF b e 12 su 46 geni del pathway della WNT b catenina. Per quanto riguarda il TGF b, è stata anche dimostrata l'attivazione, sempre da parte del PF, del fattore di trascrizione epicardico WT1, ampiamente dimostrato essere coinvolto nell'EMT mediato dal TGF b. In particolare, l'attivazione è stata dimostrata mediante studio di espressione genica ma anche tramite real time PCR e immunostochimica. Quest'ultima tecnica ha permesso di evidenziare la presenza di WT1 sia nelle cellule epicardiche che nelle cellule dei vasi presenti nel compartimento subepicardico. Per quanto riguarda la WNT b catenina, l'attivazione di questo gene insieme ad uno dei suoi target, ciclina D1, è stata dimostrata anche mediante real time PCR.

Una volta effettuati questi studi, si è valutato l'effetto della terapia con CLU in termini di recupero

funzionale del cuore. I topi sono stati infartuati e la CLU è stata iniettata nel sacco pericardico immediatamente dopo la legatura della coronaria. L'effetto della somministrazione è stato valutato a livello funzionale dopo una settimana dall'infarto e dal trattamento. In particolare, sono stati effettuati studi emodinamici 7 giorni dopo ischemia, poco prima del sacrificio, utilizzando una sonda pressoria nella carotide destra. Tali studi consentono di valutare diversi parametri quali indici della funzione del ventricolo sinistro in sistole e in diastole. L'analisi dei dati ha dimostrato un miglioramento della funzionalità cardiaca sia sistolica che diastolica nei topi infartuati e trattati con CLU rispetto ai topi di controllo.

Avendo già dimostrato che la somministrazione della CLU nel sacco pericardico di cuori murini in assenza di infarto è già in grado di attivare l'EMT nelle cellule epicardiche come dimostrato dall'aumentato numero di cellule epicardiche esprimenti la alfa SMA, noto marcatore dell'EMT, si è andato a vedere cosa accadesse dopo somministrazione della CLU nel sacco pericardico di topi dopo infarto ovvero se si avesse un'ulteriore aumento dell'EMT delle cellule epicardiche e, soprattutto, se questo fenomeno riguardasse anche le cellule staminali ckit+ epicardiche. A tal fine, è stato indotto l'infarto in due gruppi di topi e dopo legatura della coronaria è stata iniettata nella cavità pericardica la CLU o il PBS. Gli animali sono stati sacrificati a 7 giorni dalla procedura chirurgica e i cuori sono stati trattati in modo da poter effettuare studi di immunofluorescenza. Per verificare se le cellule epicardiche fossero coinvolte nel EMT dopo infarto e trattamento con la CLU, sono state contate le cellule epicardiche positive per la alfa SMA. Inoltre è stata effettuata anche una doppia colorazione per la alfa SMA e per il marcatore di staminalità ckit per capire, mediante conta, se le cellule staminali epicardiche fossero coinvolte in questo processo. I risultati delle conte hanno evidenziato un maggior numero di cellule epicardiche esprimenti la alfa SMA dopo trattamento e, soprattutto, un maggior numero di cellule co-esprimenti sia la alfa SMA che il ckit. Le conte hanno dimostrato anche che l'aumentato numero delle cellule ckit+ non dipende dalla proliferazione ma dall'EMT in quanto il numero di cellule epicardiche positive per ckit ma negative per l'alfa SMA si è dimostrato non essere differente tra cuori trattati e cuori di controllo. Dunque, l'EMT mediato dalla CLU determina un aumento del numero dei progenitori cardiaci (cellule epicardiche ckit+) potenzialmente responsabili della migliorata funzionalità cardiaca nei topi dopo trattamento.

I risultati ottenuti dallo studio di espressione genica effettuato sulle cellule epicardiche isolate da cuori infartuati in presenza e in assenza di PF hanno permesso di individuare due potenziali meccanismi coinvolti nell'EMT delle cellule epicardiche ovvero il pathway del TGFb e quello della WNT b catenina.

Gli studi funzionali nei cuori di topi dopo infarto e trattamento con CLU hanno evidenziato l'importanza della proteina come potenziale mediatore del riparo cardiaco dopo infarto mediato da cellule staminali epicardiche. Infine, le analisi di immunofluorescenza hanno permesso di dimostrare che la CLU determina un aumento del pool di progenitori cardiaci come evidenziato dall'aumento nel numero di cellule esprimenti il fattore di staminalità ckit e il marcatore dell'EMT, alfa SMA. Tale aumento potrebbe spiegare, almeno in parte, il recupero funzionale osservato nei topi trattati con CLU rispetto ai controlli dopo danno ischemico.

Sulla base dei risultati ottenuti, ci si propone di effettuare esperimenti per valutare se la CLU 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 di proteggere i cardiomiociti dalla morte cellulare e indurre angiogenesi. E' stato infatti già dimostrato che questa proteina ha un'azione antiapoptotica in vitro mentre nulla si sa circa una sua potenziale azione sui vasi.

Infine, si propone di effettuare esperimenti per studiare il coinvolgimento dei miRNAs nell'EMT mediato dalla CLU. A tal fine, si utilizzeranno colture di cellule epicardiche murine embrionali in cui verrà indotto l'EMT mediante trattamento con CLU e l'analisi dei miRNAs coinvolti in questo processo verrà effettuata sia mediante real time PCR e sia tramite immunofluorescenza.

## LINEA 2

### STUDIO DEI MECCANISMI DI RECUPERO FUNZIONALE NELLE PATOLOGIE CRONICHE, DISABILITANTI DELL'APPARATO CARDIOVASCOLARE E RESPIRATORIO



### Effetti dell'allenamento sulla pedana vibrante sulla performance muscolare e la capacità funzionale in pazienti affetti da insufficienza cardiaca

Il progetto si propone di valutare l'effetto dell'allenamento fisico utilizzando una pedana vibrante (WBV- Whole Body Vibration) associato o meno ad un simultaneo programma di training fisico aerobico standard sulla capacità muscolare e di esercizio in pazienti con CHF (Congestive Heart Failure) in condizioni di stabilità clinica.

Alcuni studi su persone anziane hanno dimostrato che il WBV training migliora la forza muscolare e la performance cardio-respiratoria. Pertanto, il WBV training potrebbe essere uno stimolo allenante addizionale utile nei pazienti con CHF. Un vantaggio del WBV training è che ogni sessione di applicazione è breve e non richiede la partecipazione attiva dell'individuo, tranne l'essere in grado di mantenere la postura accovacciata per 60 secondi. Di conseguenza, se questa metodologia di allenamento si rivelasse efficace, potrebbe essere proposta come un training alternativo all'esercizio fisico, in particolare nei pazienti anziani che non sono in grado di praticare un esercizio fisico classico.

E' stata effettuata un'analisi preliminare per valutare la tollerabilità ed il profilo di sicurezza sull'apparato cardiovascolare del protocollo di WBV selezionato, dal momento che la WBV non è mai stata impiegata in pazienti cardiopatici.

L'analisi preliminare ha dimostrato la sicurezza dell'allenamento con la pedana vibrante dal momento che non si sono verificate complicanze e la frequenza cardiaca (FC), registrata mediante telemetria durante l'allenamento, e la pressione arteriosa misurata prima e dopo l'allenamento, non hanno mostrato significative variazioni.

### Effetti del training fisico sulla funzione ventricolare destra in pazienti affetti da scompenso cardiaco

Lo scompenso cardiaco cronico (SCC) è una patologia ad elevata prevalenza, che colpisce il 2% della popolazione generale nel mondo occidentale ed è caratterizzata da un profilo prognostico negativo malgrado i progressi ottenuti in campo terapeutico. Lo SCC, nel corso della sua evoluzione, coinvolge vari meccanismi fisiopatologici. In particolare, in una porzione rilevante di soggetti con SCC, si osservano profonde alterazioni degli assi ormonali fra cui deficit di testosterone, deficit dell'asse GH/IGF1 resistenza al GH, ed insulino-resistenza. Tali alterazioni sono associate ad uno più sfavorevole profilo emodinamico e ad una peggiore prognosi, con evoluzione verso la cachessia cardiaca.

L'esercizio fisico è efficace nel migliorare i sintomi e la qualità di vita dei pazienti con SCC. Inoltre, in individui sani l'esercizio è in grado di aumentare il livello di testosterone ed IGF-1. Poiché una copiosa recente letteratura dimostra che il trattamento con GH o testosterone migliora vari parametri clinici ed emodinamici nello SCC, e poiché tali effetti sono simili a quelli che si rilevano negli stessi pazienti dopo training fisico, è ipotizzabile che gli effetti clinici prodotti dal training fisico nello SCC siano, almeno in parte, secondari all'incremento dei livelli di tali ormoni.

L'ipotesi dello studio è che i benefici ottenuti dal training fisico nello SCC siano, in parte, mediati dal miglioramento del quadro ormonale indotto dall'esercizio. Se l'ipotesi si rivelerà valida, ci si aspetta di osservare una significativa correlazione fra miglioramento dei parametri funzionali ed incremento dei livelli di GH/IGF1 e testosterone in soggetti con SCC sottoposti a training fisico.

Lo studio prevede l'arruolamento di 30 pazienti con SCC, (diagnosi da almeno 6 mesi), sedentari ed in condizioni cliniche e terapia farmacologica stabili. I pazienti vengono suddivisi in modo random in 2 gruppi: 1) gruppo training: composto da 20 pazienti che effettuano training fisico per un periodo di 3 mesi. 2) gruppo di controllo: 10 pazienti sottoposti alle stesse indagini diagnostiche del gruppo 1 ma non effettuano training fisico.

I pazienti di entrambi i gruppi vengono sottoposti a prelievi ematici al momento dell'arruolamento ed alla fine dello studio. Tale prelievo comprende la determinazione dell'assetto ormonale: GH, IGF.1, testosterone totale e libero; glicemia, insuline mia.

All'arruolamento e alla fine dello studio vengono, inoltre, eseguiti ecocardiogramma c/d, test del cammino di 6 minuti, test cardiopolmonare. Il livello di fatica percepita dal paziente viene registrato mediante scala di Borg.

Protocollo di esercizio: i pazienti del gruppo 1 effettuano 3 sedute/settimana di esercizio fisico allenandosi al 50-70% della frequenza cardiaca cronica (FCT). Ogni seduta ha la durata di 1 ora.

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a visita cardiologica preliminare.

I 20 soggetti del gruppo training sono stati sottoposti a regolari sessioni di esercizio fisico in palestra cardiologica per un totale di 12 settimane consistenti in attività aerobica svolta al 50-70 % della FC di tipo continuo. L'esercizio si è svolto su cyclette. Prima di ogni sessione ai pazienti è stata rilevata la pressione arteriosa e la frequenza cardiaca. Durante ogni sessione la frequenza cardiaca è stata monitorizzata con sistema telemetrico.

Lo studio ha dimostrato che un interval training piuttosto che un training continuo è in grado di modulare i livelli di ormoni anabolizzanti in pazienti con SCC.

### 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 riscontrato 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 recente 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 riparativo-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 riparazione e protezione del danno cellulare da stress ossidativo ed anti-infiammatori, quali sirtuine, TNF $\alpha$ , FOXO3A etc.

Tale studio permette di analizzare se questi markers rivestono un ruolo rilevante nel mediare gli effetti benefici dell'attività fisica nell'ambito della riabilitazione cardiologica.

Ci si propone di identificare i markers biologici circolanti correlati all'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.

Lo studio attualmente è in fase di reclutamento dei pazienti.

### Studio randomizzato riguardante l'associazione dell'uso di statine a basso dosaggio e nutraceutici in pazienti intolleranti alle statine ad alto dosaggio con elevato rischio di malattia coronarica

L'obiettivo primario di questo studio è quello di comparare l'efficacia e la tollerabilità della terapia a basso dosaggio di statine a confronto con l'associazione tra la suddetta terapia a basso dosaggio di statine e un protocollo basato sui nutraceutici in pazienti intolleranti a statine di alto dosaggio e con malattie coronariche considerati ad alto rischio cardiovascolare.

Outcome primari:

- Adesione a lungo termine alla terapie oggetto dello studio. (Time frame: fino a 12 mesi).
- Adesione alla terapia oggetto dello studio durante lo studio stesso.

Outcome secondari:

- Effetti a lungo termine sul profilo lipidico (Time frame: fino a 12 mesi).
- Livello di comparazione tra il colesterolo totale, LDL, e i trigliceridi tra l'inizio e la fine dello studio.

Comparatore attivo: statine a basso dosaggio in associazione a nutraceutici.

Ai pazienti sono state somministrate statine a basso dosaggio (simvastatin da 10 a 20 mg/die oppure atorvastatin da 5 a 10 mg/die) associate ad una capsula di un nutraceutico in commercio (1 capsula/die contenente 200 mg riso rosso fermentato, 10 mg di policosanol e 500 mg di berberine).

Comparatore attivo: statine a basso dosaggio

Ai pazienti è stata somministrata unicamente statina a basso dosaggio (simvastatin da 10 a 20 mg/die oppure atorvastatin da 5 a 10 mg/die).

Sono stati effettuati esami ematochimici e visite a tempo: zero, tre, sei e dodici mesi.

Sono stati arruolati consecutivamente 100 pazienti. Le caratteristiche cliniche di base ed i profili lipidici sono risultati simili tra i gruppi. Al terzo mese, i valori del LDL-C, colesterolo totale e trigliceridi del secondo gruppo differivano significativamente, con valori più bassi nel gruppo NS rispetto al gruppo S; inoltre i due gruppi differivano, anche se in modo poco significativo, nei valori HDL-C, con valori più alti nel gruppo NS rispetto al gruppo S. Infine, in entrambi i gruppi la tolleranza al trattamento è stata alta: in ciascun gruppo, infatti, solo 3 pazienti hanno interrotto la terapia.

In pazienti con CAD e intolleranza HDS (High Dose Statin), un trattamento con LDS (Low Dose Statin) e nutraceutici può essere una valida opzione.

Controllo a lungo termine degli effetti del carico di allenamento attraverso il metodo delle session-RPE in soggetti con scompenso cardiaco

Il progetto si prefigge di valutare l'efficacia di un programma di allenamento a lungo termine (tale da prevedere un controllo sulla relazione dose-risposta attraverso l'analisi post-ospedaliera delle session-RPE - rating of perceived exertion) sia di tipo aerobico continuo sia di tipo interval training basato sul metodo della session-RPE sui parametri di capacità funzionale (e.g., VO<sub>2</sub>, Soglia ventilatoria, test del cammino) nonché sugli adattamenti neurovegetativi (e.g., sensibilità baro riflessa e variabilità della frequenza cardiaca) e metabolici (e.g., assetto lipidico, insulino-resistenza etc) in pazienti cardiopatici. Ci si aspetta che il controllo del carico di allenamento realizzato nella post ospedalizzazione dai pazienti stessi consenta un più efficace mantenimento dei miglioramenti ottenuti nella fase 2 di riabilitazione. Ciò permetterebbe di proporre una nuova metodologia di allenamento tale da non richiedere il monitoraggio e la valutazione della frequenza cardiaca e che pertanto potrebbe essere impiegata in modo efficace, ma estremamente semplice nella programmazione dell'attività fisica, anche autogestita nel tempo, al di fuori dell'ambito strettamente clinico, in pazienti cardiopatici.

Dati preliminari in un gruppo pilota di 12 pazienti indicherebbero che il metodo RPE-session è utilizzabile nella programmazione autogestita extra-ospedaliera dell'allenamento nel paziente con scompenso cardiaco per migliorare e/o mantenere la propria capacità funzionale. Infatti, nei pazienti che hanno utilizzato la RPE-session dopo la dimissione dalla struttura riabilitativa è stato riscontrato un ulteriore significativo incremento della capacità funzionale (test dei 6 minuti) mentre nel gruppo che non ha utilizzato la session-RPE la capacità funzionale si riduceva

### Programma di esercizio fisico strutturato come contromisura verso l'intolleranza ortostatica indotta dalla permanenza nello spazio

Secondo i dati disponibili, non è mai stato svolto dagli astronauti alcun programma di esercizio fisico strutturato rivolto a valutare gli adattamenti neurovegetativi in risposta a uno specifico programma di allenamento, quale definito dalla 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) negli astronauti per poter raggiungere questo scopo non è stata ancora identificata: la domanda "quanto e quale tipo di esercizio fisico sia 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.

È stato riscontrato un rapporto dose-response 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 frequenza cardiaca (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 valutare l'efficacia di un programma 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, vengono utilizzati l'analisi spettrale della variabilità della 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 International Space Station (ISS) come il tapis-roulant, il modulo ARMS, un sistema di ricerca fornito dall'Agenzia Spaziale Europea che dovrebbe essere disponibile a terra e a bordo dello shuttle o dell'European Physiological Module. Tutto ciò consente di prevedere un'alta possibilità di successo di questo progetto.

I dati ottenuti da questo studio potrebbero fornire una base per la progettazione efficace di programmi di addestramento all'esercizio fisico che possono effettuare gli astronauti in future missioni di lunga durata sull'ISS, in cui protocolli di contromisure di attività fisica sono fortemente consigliati dall'Agenzia Spaziale Europea (ESA) e dalla NASA.

Lo sviluppo di 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 alle persone con disabilità sulla terra. Queste contromisure sono benefiche per prevenire disfunzioni autonome legate allo stress gravitazionale come quelle riscontrate nei soggetti allettati e con scompenso cardiaco come l'ipotensione ortostatica, l'atrofia o antigravità dei muscoli, ecc. Questo punto 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. Il progetto è in fase avanzata di realizzazione.

## Area di Ricerca Biotecnologie avanzate

### Fattori genetici come determinanti di outcome nell'invecchiamento vascolare e nelle malattie cardiovascolari

L'aterosclerosi è una patologia complessa ed è la causa principale di infarto del miocardio e di ischemia cerebrale. Nonostante la sua natura di patologia multifattoriale, è stato dimostrato come l'ambiente e i classici fattori di rischio vascolari influiscano solo in parte sulla sua variabilità clinica. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato il ruolo fondamentale dei fattori genetici nello sviluppo dell'aterosclerosi.

Il gruppo di ricerca ha precedentemente identificato dei polimorfismi localizzati in geni codificanti per proteine coinvolte nei processi di infiammazione, coagulazione, metabolismo lipidico e glicidico e associati a diverse forme di predisposizione per l'ispessimento medio intimale carotideo (IMIC). E' stata inoltre dimostrata l'influenza di polimorfismi dei geni codificanti per le sirtuine e per le "uncoupling proteins mitocondriali" (UCP) sullo sviluppo delle placche carotidiche e di ulteriori loci genici che correlano a un maggior rischio per IVS e per la patologia aterosclerotica. In particolare, dato il ruolo esercitato dalle sirtuine nello sviluppo della malattia aterosclerotica e su importanti fattori di rischio cardiovascolari come le malattie metaboliche ed il diabete, ci si è focalizzati proprio sullo studio di questi geni/proteine come possibili fattori predittivi per tali patologie essendo essi in grado di regolare numerosi pathways coinvolti nello stress ossidativo e nell'infiammazione. E' stato inoltre dimostrato come le sirtuine e le UCP siano coinvolte nella regolazione del rilascio dell'insulina e nella predisposizione al diabete mellito.

Di conseguenza, l'obiettivo principale del progetto è quello di identificare nuovi pathways molecolari coinvolti nelle patologie metaboliche (come il diabete) e vascolari, specialmente collegati con i meccanismi di senescenza d'organo. Le molecole coinvolte in questi pathways vengono poi analizzate nelle loro varianti geniche per valutare l'impatto di questi geni sulle patologie studiate, specialmente in popolazioni di studio a rischio come i pazienti diabetici in popolazioni con diversa etnia. Le analisi successive sui fattori di rischio vascolari e sulle interazioni tra i differenti fenotipi subclinici di aterosclerosi permetteranno, inoltre, di determinare l'evoluzione della malattia aterosclerotica e l'impatto della terapia (anticoagulanti, anti-ipertensivi, statine, ipoglicemizzanti) sulla sua progressione in queste popolazioni di studio.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio vascolare e patologie cardiovascolari, sono ottenuti dalla Biobanca presente presso l'IRCCS San Raffaele Pisana e raccolti presso il Dipartimento di Medicina dei Sistemi, Università degli Studi di Roma, Tor Vergata. Su di essi vengono condotte analisi delle varianti genetiche 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 e dei profili di espressione proteica. Tutti i dati e le informazioni cliniche riguardanti i pazienti arruolati vengono inseriti, previa opportuna anonimizzazione, in un apposito database a disposizione di tutti i centri partecipanti allo studio. Un'analisi dei fattori di rischio vascolari, specialmente del DT2, viene effettuata per evidenziare il loro possibile impatto nella patologia aterosclerotica. Un adeguato controllo clinico per valutare la progressione della malattia aterosclerotica sarà pianificato in una coorte di pazienti con età superiore ai 60 anni.

I risultati fin qui ottenuti dimostrano come i classici fattori di rischio vascolari incidano per solo il 20% nello sviluppo di placche carotidiche e come quindi vi sia una forte componente genetica nello sviluppo della malattia aterosclerotica e di conseguenza nelle malattie cardiovascolari. In questo ultimo anno è stato anche dimostrato come, oltre ad essere associati con fenotipi di aterosclerosi quali placche carotidiche e l'ispessimento medio/intimale carotideo, i polimorfismi delle sirtuine e UCPs sono anche associati ad un aumento della rigidità carotidea che è un marcatore

tipico di invecchiamento vascolare. Sono stati identificati nuovi marcatori genetici che predispongono individui fumatori ad un maggiore rischio per malattie cardiovascolari. Inoltre, in questo anno di ricerche sono stati anche dimostrati nuovi pathways associati ad una migliore risposta metabolica e vascolare grazie a studi in vitro condotti su cellule endoteliali e studi in vivo condotti su topi knockout. Nello specifico, è stato dimostrato come l'assenza di una particolare proteina mitocondriale, la perossiredossina 6 (predx6), proteina in grado di regolare lo stress ossidativo nel pancreas, nei topi da laboratorio, si associ ad un alterato rilascio e captazione periferica dell'insulina ed un'alterazione delle beta cellule pancreatiche, suggerendo nuove vie molecolari per la terapia del diabete attraverso la riduzione della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Allo stesso modo, si è visto come un'altra proteina implicata nello stress ossidativo, la serum glucocorticoid inducible kinase (SGK)-1 era in grado di proteggere dal danno vascolare indotto dal iperglicemia attraverso l'aumento di ROS, grazie ad un suo effetto sulla produzione di ossido nitrico e quindi un'azione vasodilatatrice.

Ci si attende che da questi studi sarà possibile individuare nuovi pathways in grado di ridurre lo stato di senescenza cellulare misurata come lunghezza dei telomeri e di aumentare la funzionalità endoteliale e la risposta allo stress ossidativo e infiammatorio. Inoltre, ci si attende di dimostrare sempre di più la stretta relazione tra fattori di rischio cardiovascolari, quali profilo lipidico, HDL e patologia aterosclerotica e la forte interazione tra gene-ambiente e gene-fattore di rischio nello sviluppo della malattia.

### 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, portano a sottovalutare una percentuale significativa di pazienti a rischio. 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 tromboprofilassi potrebbero intervenire favorevolmente non solo in una fase di prevenzione primaria, ma anche e soprattutto durante il percorso riabilitativo.

Si intende pertanto 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 questo progetto di ricerca hanno preso in considerazione soprattutto 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 al trattamento. 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 chemioterapia. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la possibilità di identificare pazienti ad alto rischio grazie all'introduzione diagnostica di alcuni nuovi marcatori associati al rischio di TEV. In particolare, è stato analizzato il valore predittivo di alcuni indici di attivazione piastrinica (volume piastrinico medio), parametri infiammatori (rapporto piastrine/linfociti o neutroli/linfociti) o altri determinanti di rischio trombotico (eGFR – tasso presunto di filtrazione glomerulare, colesterolo HDL). Alcuni di questi marcatori si sono dimostrati di notevole interesse ai fini di un'implementazione dei modelli di rischio clinico esistenti e per la stratificazione di pazienti ad alto rischio in cui un'anticipazione diagnostica e/o l'applicazione di programmi di tromboprofilassi potrebbero intervenire favorevolmente durante tutto il percorso terapeutico/riabilitativo al fine di prevenire l'insorgenza di TEV, condizione potenzialmente letale ed altamente disabilitante.

Le indagini condotte suggeriscono la possibilità di implementare i modelli di rischio esistenti grazie all'introduzione di nuovi marcatori con più elevata sensibilità e specificità e pongono le basi per la 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 estendere lo 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 nuovi anticoagulanti e/o farmaci ad azione pleiotropica.

### Applicazione di nuove tecnologie di Biomarker discovery per l'identificazione di determinanti di outcome clinico delle malattie croniche disabilitanti

L'identificazione di nuovi marcatori biologici ("biomarker discovery") rappresenta un processo essenziale per la definizione dei meccanismi molecolari e cellulari coinvolti nell'insorgenza e nella progressione di numerose malattie disabilitanti. Questo approccio, inoltre, permette di prevedere se un determinato trattamento terapeutico/riabilitativo avrà esito positivo o produrrà effetti indesiderati, rendendo possibile la stratificazione clinica dei pazienti, lo sviluppo di terapie personalizzate ed un utilizzo razionalizzato dei farmaci. La scoperta di nuovi marcatori di diagnosi, progressione e risposta alla terapia si basa principalmente su metodiche di genomica e proteomica, da applicare all'analisi delle varianti di sequenza e dei profili di espressione correlati alle caratteristiche cliniche della patologia. Affinché queste analisi acquistino un sufficiente potere statistico, è necessario processare e conservare un numero elevato di campioni biologici. L'esteso campionamento in atto presso la BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare rappresenta quindi una fonte importante di numerose tipologie di matrici biologiche, in grado di favorire in tempi rapidi lo sviluppo di progetti di ricerca traslazionale, nei quali affiancare alle indagini diagnostiche tradizionali le metodiche più innovative su cui si basa la disciplina della "Biomarker Discovery".

Il principale obiettivo è l'identificazione di nuovi marcatori biomolecolari (polimorfismi genetici, pattern e livelli di espressione proteica), che consentano di prevedere l'outcome in patologie croniche, disabilitanti ed età-correlate. Il valore prognostico/predittivo di queste molecole viene valutato mediante tecniche di diagnostica classiche e metodologie più avanzate, quali ad esempio la farmacogenomica, che consente l'integrazione delle conoscenze genetiche e farmacologiche acquisite in studi condotti su ampie coorti di pazienti e di individui sani correlati in base alle caratteristiche sociodemografiche.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti (patologie neurodegenerative, cardiovascolari, oncologiche, etc.) sono adeguatamente preservati nella BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (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 o attraverso cromatografia liquida multidimensionale. Le informazioni ottenute sono 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 sono 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 cronico-degenerative, quali vari tumori solidi, o patologie cardiovascolari e neurologiche. In ambito oncologico, di particolare rilievo sono le indagini condotte nel corso dell'anno 2014 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 nuovi marcatori prognostici. Inoltre, in collaborazione con il Laboratory of Tumor Immunology and Biology del National Cancer Institute (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) sono stati pubblicati i risultati derivati da uno studio disegnato allo scopo di analizzare l'espressione della proteina Brachyury, un induttore di transizione epitelio-mesenchimale (EMT) in cellule di carcinoma mammario umano, al fine di verificarne l'idoneità quale bersaglio molecolare in protocolli di immunoterapia. Infatti, la capacità di linee di cellule T Brachyury-specifiche di lisare cellule tumorali Brachyury-positive in vitro, sostiene lo sviluppo di approcci immunoterapeutici basati sulla positività per Brachyury, nel trattamento del carcinoma della mammella.

Grazie alla piattaforma di gestione informatica è stata estrapolata ed elaborata in tempi rapidi un'ampia mole di dati associati ai campioni conservati nella biobanca ed esaminati nel corso di indagini diagnostiche tradizionali ed innovative.

In particolare, sono stati analizzati alcuni marcatori predittivi del rischio di tromboembolismo venoso in categorie selezionate di pazienti. Grazie ad una sezione della BioBIM dedicata allo studio di pazienti con emicrania sono stati analizzati alcuni marcatori molecolari predittivi dell'outcome clinico di questa patologia e della risposta farmacologica a specifici trattamenti. Infine, è stato analizzato il significato prognostico di alcuni biomarcatori al fine di identificare, in specifiche patologie, sottogruppi di pazienti con outcome clinico sfavorevole da sottoporre a trattamenti più aggressivi o accertamenti periodici più frequenti per un controllo più efficace della progressione di malattia e per la prevenzione della disabilità che accompagna le numerose condizioni cronico-degenerative in esame.

## 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

Gli studi di associazione caso-controllo permettono di individuare varianti genetiche correlate ad una determinata patologia o un particolare aspetto fenotipico della stessa. La scoperta di tali innovativi biomarcatori è essenziale per una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella patogenesi di numerose malattie croniche disabilitanti e per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici.

L'obiettivo principale è l'identificazione di marcatori genetici o epigenetici da utilizzare come marcatori di diagnosi, progressione, prognosi e risposta alla terapia in pazienti affetti da patologie croniche disabilitanti età correlate, quali cardiovascolari, oncologiche e neurologiche.

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) afferente al Biomarker Discovery and Advanced Technologies (BioDAT).

I campioni biologici di pazienti con patologie croniche disabilitanti (patologie neurodegenerative, cardiovascolari, oncologiche, etc.), vengono adeguatamente criopreservati nella BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM). Ad ogni campione biologico vengono associati i dati antropometrici, sociodemografici e clinici del donatore, la storia familiare, ed altri eventuali dati ritenuti di rilievo per studi specifici). In accordo con la letteratura e le linee guida internazionali tutti i campioni sono codificati in modo da garantire l'anonimato del paziente, inseriti in un programma di database computerizzato protetto da doppio codice di accesso/password e successivamente processati secondo le Standard Operative Procedures (SOPs) adottate dal laboratorio. Le analisi molecolari degli acidi nucleici vengono effettuate mediante metodiche basate sull'amplificazione mediante PCR e sequenziamento elettroforetico automatizzato.

In relazione agli studi di farmacogenomica sono state ottimizzate le metodiche di analisi mutazionale a partire da tessuto tumorale incluso in paraffina. La corretta identificazione delle mutazioni dei geni che routinariamente sono oggetto degli screening di farmacogenetica, quali ad esempio K-Ras, BRAF, EGFR, PDGFRa e c-KIT. Sono stati dettagliatamente analizzati i differenti protocolli di microdissezione degli inclusi in paraffina, estrazione degli acidi nucleici, reazione polimerasica a catena (PCR), sequenziamento diretto e separazione allelica mediante clonaggio.

La collaborazione con l'Area di Cefalea e Dolore Neuropatico dell'IRCCS San Raffaele Pisana ha permesso di ampliare il settore della BioBIM dedicato a raccogliere in maniera specifica dati clinici e campioni biologici da pazienti affetti da emicrania. Al fine di identificare i fattori genetici che contribuiscono ai meccanismi eziopatogenetici di questa patologia, è stata valutata la correlazione tra due varianti comuni dei geni codificanti per le superossido dismutasi 1 (SOD1) e 2 (SOD2) e l'emicrania, in una coorte di 490 pazienti emicranici e 246 controlli sani. I risultati ottenuti indicano un'associazione significativa tra la variante rs4880 del gene SOD2 e la presenza di sintomi autonomici unilaterali (UAs) ed il tipo di trattamento farmacologico in pazienti affetti da emicrania con aura. E' stata inoltre analizzata l'associazione tra il polimorfismo inserzione/delezione (I/D) del gene ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme) e le caratteristiche cliniche e sociodemografiche di 502 pazienti affetti da emicrania e 323 controlli sani. I dati suggeriscono che il genotipo I/I possa influenzarne alcune caratteristiche cliniche, quali ad esempio un ridotto ricorso a trattamenti profilattici nei pazienti affetti da emicrania con aura e da emicrania cronica. Infine è stata valutata l'associazione tra la comune variante rs1042838 del gene codificante per il recettore del progesterone (PGR) e le caratteristiche cliniche e socio-demografiche di 380 pazienti emicranici e 185 individui sani. I dati suggeriscono che questo risulta associato ad un esordio precoce della malattia, rappresentando quindi un potenziale determinante di outcome per questa patologia. In collaborazione con il Cervical Artery Dissection and Ischemic Stroke Patients (CADISP) Interna-

Linee di Ricerca

tional Conaortium è stato effettuato uno studio sulla dissezione dell'arteria cervicale (CEAD), una delle principali cause di ictus ischemico nei soggetti giovani, reclutati dal consorzio multicentrico CADISP-plus. E' stata esaminata la frequenza e la correlazione di questa patologia con la storia familiare e con disordini ereditari del tessuto connettivo.

Sono in fase di completamento studi sulla popolazione affetta da emicrania afferente alla Biobanca istituzionale che prevedono ulteriori studi di associazione tra tale patologia e polimorfismi di nuovi geni quali COMT e BDH.

## Ricerca Traslazionale

### 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 ipossiche trasformate di acquisire tutte quelle proprietà tipiche del fenotipo maligno. I dati fin qui ottenuti dimostrano che l'ambiente ipossico 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:

a) Necrosi delle cellule che sono più distanti dai vasi del tessuto ospite. Il danno necrotico porta alla frammentazione della membrana plasmatica e al rilascio di allarmine o DAMPS (Damage-Associated Molecular Patterns);

b) Attivazione di HIF-1a con nuova espressione genica, che permette alle cellule tumorali di sopravvivere e crescere. I risultati sperimentali dimostrano anche che l'attivazione di HIF-1a upregola i recettori delle allarmine come RAGE (per HMGB1), P2X7 (per ATP/ADP), alcuni toll-like. Tutti questi recettori, quando stimolati dalle allarmine, attivano NFkB che a sua volta upregola i geni dell'IRR, inducendo così cambiamenti nelle proprietà biologiche delle cellule tumorali.

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.

Il presente progetto si prefigge di:

1) Studiare il ruolo di HIF1alfa, NFkBeta e IRR nel Ca papillare di tiroide, nel Ca di vescica e nel Ca di colon. In questi tumori è confermata la presenza dell'ambiente ipossico, saranno descritti alcuni aspetti cruciali della sequenza di adattamento all'ipossia ed è dimostrata la presenza di espressione genica coordinata proinfiammatoria dipendente dall'attivazione di NFkB.

2) Identificare quali allarmine/DAMPs sono più efficaci nell'indurre la IRR. I dati preliminari mostrano che la linea cellulare MCF7, quando pretrattata in ipossia per 48-72 h, presenta una più forte attivazione della IRR se un omogenato cellulare è aggiunto al mezzo.

3) Identificare quale sottopopolazione di cellule tumorali si adatta più facilmente all'ipossia e attiva più facilmente la IRR. E' noto che tessuti umani tumorali sono costituiti da cellule per lo più in avanzato differenziamento e da una piccola popolazione (1-2%) di cellule staminali e progenitori (CS/P). Uno degli obiettivi è quello di studiare il ruolo delle SC/P nell'attivazione di una più forte espressione genica della IRR come adattamento all'ipossia, sia in tumori solidi che in linee cellulari. Gli effetti dell'ipossia e delle allarmine saranno studiati su queste popolazioni cellulari effettuando esperimenti descritti già nel secondo obiettivo.

4) Esplorare in modelli sperimentali in vitro e in vivo il meccanismo di homing specifico delle cellule di cancro attivate dall'ipossia. Per raggiungere tale obiettivo vengono effettuati esperimenti di cocultura tra cellule di cancro di controllo e HUVEC preattivate con LPS (0.3µg/ml) o da una mix di citochine di tipo Th1 or Th2. Alternativamente vengono creati dei siti di infiammazione in topi nudi per studiare il pattern metastatico (numero e specificità del sito).

5) Studiare la possibilità di bloccare o rallentare la progressione tumorale inibendo NFkB e/o HIF1a in vitro e in vivo.

Campioni di biopsie umane di Ca di vescica sono stati sezionati (5µm) e sottoposti a laser capture microdissection (LCMD) per separare le cellule tumorali, da quelle peritumorali e da quelle del tessuto ospite normali. L'espressione di mRNA di 48 geni proinfiammatori (inflammocard) è stata studiata mediante real-time PCR; l'espressione proteica di diversi fattori pro infiammatori quali P2X7, RAGE, COX2, NOS2, SOCS1, TLR2-3-4, e MMP2 è stata studiata mediante western blotting; l'attivazione di HIF1a and NF-kB è stata analizzata mediante western blotting o ELISA su frazioni cellulari citosoliche e nucleari. L'ipossia è stata ottenuta incubando le cellule in 1%O<sub>2</sub> in una camera ipossica. Le CS/P sono state preparate da: Campioni chirurgici di tumori solidi umani. Le popolazioni CS/P sono state purificate e caratterizzate mediante analisi di citofluorimetria usando diversi markers. Per studiare gli effetti dell'ipossia sul guadagno di funzione delle MMPs, le linee cellulari MCF7, PC3 e BCPAP sono state trattate con estratti totali di membrane o con frazioni di essi. L'invasione cellulare è stata misurata mediante uno specifico kit della chemicon in grado di discriminare tra cellule che invadono e cellule che non invadono.

E' stata valutata l'aumentata abilità di migrare associata al trattamento ipossico e la conseguente overespressione di CXCR4 sulle linee cellulari sopradescritte. La migrazione cellulare è stata studiata mediante il "wound healing assay". L'homing delle cellule tumorali è stato studiato mediante: cocultura di cellule di cancro attivate da ipossia o di controllo e cellule HUVEC preattivate da LPS (0.3µg/ml) o una mix di citochine di tipo Th1 e Th2. Real-time PCR mediante inflammocard di RNA estratto da tessuto granuloso ottenuto da microdissezione. Per gli esperimenti in vivo: a) le cellule CS/P o tumorali isolate da biopsie o da linee cellulari attivate mediante ipossia vengono iniettate in topi nudi. Successivamente è valutato il numero e il tipo di metastasi formatesi. b) è creato un sito usando rispettivamente batteri Gram+ o LPS o una ferita. Di nuovo, è valutato il numero e il tipo di metastasi formatesi. Gli studi in vivo vengono condotti in topi nudi (4-6 settimane) (Charles River Laboratories) e le cellule vengono precedentemente trasfettate con GFP. La formazione del tumore è studiata dopo iniezione sottocutanea. La formazione del tumore è seguita in vivo per 3-4 settimane mediante microscopio a fluorescenza. Iniezioni nella vena caudale permettono di osservare il pattern metastatico nei polmoni, nel cervello e negli altri siti mediante immunostochimica, RealTime-PCR e western blotting negli animali sacrificati.

E' stata dimostrata, 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 precedentemente descritti sulle cellule staminali tumorali, è stato evidenziato come questa popolazione sia in grado di attivare la stessa risposta infiammatoria riparativa 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 responsabili, poi della progressione del tumore.

E' stato osservato che le cellule tumorali stimulate da ipossia siano 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. Questo risultato è stato ottenuto tramite colorazione delle cellule endoteliali e tumorali e analisi al microscopio confocale. Inoltre inibendo farmacologicamente HIF-1a con digossina la risposta delle cellule tumorali viene meno così come la loro capacità di adesione che risulta notevolmente ridotta. Infine, anche silenziando l'espressione dei recettori di membrana come RAGE e P2X7, e quindi la risposta NFkB-mediata, è possibile inibire l'invasione delle cellule tumorali.

L'inibizione farmacologica (digossina) o il silenziamento (shRNA) di HIF-1a ha permesso di inibire la migrazione, invasione e adesione delle cellule tumorali messe a contatto con cellule endoteliali.

## 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 miofibrillosi, 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.

Lo studio 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;
- la struttura e la funzione mitocondriale e il grado di stress ossidativo miocardico in tali pazienti;
- 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 coronaria 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 non invasivi (ECG, ecocardiogramma color Doppler con TDI) e, previo consenso informato, ad esami cardiologici invasivi, incluso il cateterismo cardiaco, la coronarografia, la ventricolografia biventriolare e la biopsia endomiocardica biventriolare.

Alcuni frammenti bioptici 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) immunostochimica 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 analiz-

zare 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).

E' previsto anche un prelievo di 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.

L'attività è consistita nel valutare pazienti con miocardite, con cardiomiopatia dilatativa idiopatica e secondaria (i.e tossica, da deficit nutrizionali), e con cardiopatie a fenotipo ipertrofico (i.e. cardiomiopatia ipertrofica, malattia di Fabry, cardiopatia ipertensiva). 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 glutazione perossidasi ed alla superossido-dismutasi rispettivamente selenio e zinco-dipendenti, un danno ossidativo della membrane dei miociti con aumentata autofagia cellulare. E' stata identificata e quantificata in termini di incidenza l'associazione malformativa fra cardiomiopatia ipertrofica e teleangiectasia coronarica ed i risvolti che questa può assumere in termini di ischemia miocardica ed instabilità elettrica, richiedente impianto di defibrillatore al fine di prevenirne la complicità più temibile, la morte cardiaca improvvisa. E' stato riportato attraverso un'ampia casistica bioptica, che in pazienti con fenotipo clinico di cardiomiopatia 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' $\alpha$ -galattosidase A residua. Infine, è stata documentata una cardiomiopatia ipertrofico-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.

## 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 con l'asma; 80 milioni con broncopneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO) di grado moderato o grave; altri 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 glutazione, 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 NADPH ossidasi (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 glutazione (GSH). Questo è apparso essere fondamentale nelle 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 quali, 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 glutazione, 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 intra-molecolare (GSSG) o a disolfuromisto 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 (neuroni) 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 parainfluenzali 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.

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.

Nel corso del progetto si è cercato, 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.

Lo studio ha avuto l'obiettivo di individuare se le alterazioni dello stato redox intracellulare indotte dall'infezione virale possano essere marcatori biochimici, indicatori non solo di maggiore suscettibilità alle infezioni, ma anche di una maggiore severità delle stesse legata all'intensità del processo infiammatorio e alla sua cronicizzazione.

Nel corso di questo 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 vivo, ovvero topi BALB/c invecchiati.

Allestimento dell'infezione da virus influenzale in topi invecchiati

Per il modello sperimentale sono stati utilizzati topi Bal/c femmine invecchiati di 16 mesi del peso medio di 30 grammi e topi BALB/c giovani di 6/8 settimane di peso corporeo di circa 20 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 µl PBS. I topi sono stati suddivisi in due gruppi; durante lo studio gli animali sono stati monitorati giornalmente per 20 giorni e sono

stati valutati la sopravvivenza e i segni clinici, quali peso corporeo, attività motoria e temperatura corporea.

Un gruppo di topi è stato sacrificato dopo l'infezione per il prelievo dei seguenti organi: cervello, polmoni, milza, pancreas e linfonodi per verificare il contenuto tiolico, i livelli di glutatione ossidata e il titolo virale mediante RT-PCR.

Dosaggio del contenuto di glutatione e glutatione ossidata

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.

Titolazione del virus nei polmoni mediante Real Time PCR

L'RNA virale è stato estratto dai polmoni omogeneizzati mediante TRI reagent (SigmaAldrich, S. Louis, MO). Gli esperimenti e le analisi dei dati sono stati effettuati utilizzando il IQ5 Multicolor real-time detection system (Bio-Rad).

Nel corso del 2014 sono state definite le basi molecolari di una possibile correlazione funzionale tra lo stato redox intracellulare (misurato principalmente attraverso i livelli di glutatione - GSH-, principale antiossidante intracellulare), la suscettibilità alle infezioni respiratorie e il loro andamento durante l'invecchiamento, utilizzando come modello sperimentale di infezione in vivo, topi BALB/c invecchiati.

Il monitoraggio dei segni clinici di infezione effettuato nei topi anziani rispetto ai giovani indica che, sorprendentemente, la severità del processo infettivo sembra essere inversamente proporzionale all'età degli animali. Infatti, tutti i parametri presi in esame quali peso corporeo, temperatura e titolo virale nei polmoni indicano che nei topi anziani l'infezione si presenta con caratteristiche diverse rispetto ai giovani. In questi ultimi, infatti, si registrano tutti i segni di un'infezione acuta (perdita di peso in pochi giorni, alto titolo virale nei polmoni, mortalità elevata entro il settimo giorno dall'infezione). Al contrario nei topi anziani l'infezione è apparentemente meno grave con diminuzione di peso meno marcata, titolo virale nei polmoni inferiore rispetto a quello riscontrato nei giovani, mortalità ridotta ed in tempi più lunghi. Questo dato, solo apparentemente in contraddizione con quanto descritto in letteratura circa l'aumentata suscettibilità degli anziani alle infezioni dovuta all'immunosoppressione, dimostra ancora una volta, che la letalità correlata al virus influenzale è dovuta ad una esagerata produzione di citochine infiammatorie caratteristica dei giovani adulti.

L'esame dello stato redox in vari organi e tessuti degli animali anziani rispetto ai giovani, ha messo in evidenza che l'invecchiamento è accompagnato da un decremento progressivo dei livelli intracellulare di glutatione ridotto, confermando i dati di letteratura che indicano lo sbilanciamento redox come uno dei fatti caratteristici dell'invecchiamento. Questa caratteristica comporta però conseguenze importanti nella risposta alle infezioni. Negli animali giovani, infatti, che hanno livelli basali di GSH elevati, l'infezione causa un decremento repentino, ma duraturo dell'antiossidante causando un shift importante nello stato redox cellulare, che può rivestire un ruolo fondamentale nell'attivare la risposta immunitaria ed infiammatoria. Al contrario i bassi livelli basali di GSH riscontrati nei topi anziani rimangono pressoché costanti dopo l'infezione. È possibile che l'assenza dello shift nello stato redox abbia un ruolo nel determinare una diminuita risposta infiammatoria che, da una parte sembra portare ad una diminuita severità dell'infezione, ma dall'altra può portare ad una cronicizzazione della stessa. Dai risultati ottenuti si può concludere che i livelli plasmatici di GSH possano costituire un marker indicativo della cronicizzazione dell'infezione con conseguente possibile evoluzione in bronchite cronica e BPCO.

Ulteriori studi saranno necessari per definire il ruolo di questo parametro nell'attivazione della risposta immunitaria ed infiammatoria.

## Ruolo dello stress ossidativo legato all'ageing nell'aumentata severità delle infezioni respiratorie nell'anziano

Numerose malattie, fra cui infezioni virali, cancro, disordini neurodegenerativi, fibrosi cistica, epatite, diabete, Parkinson, così come il processo naturale di invecchiamento, sono caratterizzate da alterazioni del bilancio redox fisiologico che danno luogo a condizioni di stress ossidativo. Fisiologicamente, lo stato redox intracellulare è mantenuto in condizioni riducenti da diverse molecole, principalmente dal glutatione (GSH) principale antiossidante cellulare. Nel corso di diverse infezioni virali e, in particolare, durante l'infezione da virus influenzale, è stato dimostrato un decremento nei livelli di GSH ed un generale stress ossidativo in modelli sperimentali in vitro ed in vivo. Le alterazioni redox in senso pro-ossidante potrebbero contribuire sia alla replicazione del virus che alla patogenesi dell'infiammazione che si riscontra nel corso dell'infezione. Il ruolo del GSH nel controllare la replicazione virale è stato ampiamente dimostrato. Infatti, la somministrazione esogena di GSH, suoi derivati o precursori (molecole pro-GSH) capaci di incrementare la concentrazione di GSH, inibisce la replicazione di virus differenti, attraverso meccanismi diversi. In particolare, è stato dimostrato che il derivato N-butanoile del GSH (GSH-C4), un composto capace di entrare più facilmente nelle cellule rispetto al GSH, inibisce la replicazione di virus a DNA e RNA. Inoltre, il trattamento con GSH-C4 di topi infettati con il virus influenzale A/PR8/H1N1 è capace di incrementare la sopravvivenza degli animali rispetto ai topi non trattati, inibisce il titolo virale nei polmoni, e riduce l'estensione delle lesioni polmonari. Comunque, il meccanismo attraverso il quale queste molecole proteggono i topi dall'infezione virale rimane ancora da chiarire. È noto che la mancanza di antiossidanti, porta ad una maggiore severità nelle infezioni respiratorie e ad un'alterata funzionalità del sistema immunitario. I topi anziani sono caratterizzati da un più basso contenuto di antiossidanti e un più alto livello di specie reattive dell'ossigeno rispetto ai topi giovani. È stato riportato che la somministrazione di antiossidanti, come la vitamina E, in topi anziani migliora la risposta immunitaria verso una risposta di tipo Th1, con una significativa resistenza all'infezione da virus influenzale.

Sulla base di queste ed altre osservazioni, è ragionevole ipotizzare che lo stress ossidativo, tipico dell'ageing, costituisca un fattore di primo piano nel determinare le differenze nella suscettibilità alle infezioni virali, così come nel loro andamento e severità, osservati nelle persone anziane rispetto agli individui giovani. Recentemente, è stato dimostrato che topi anziani infettati da virus influenzale umano di tipo A PR8/H1N1 hanno un recupero più lento e un periodo prolungato di morbilità. Una presentazione dell'antigene inefficiente e una maggiore infiammazione negli anziani sono da ritenersi le cause di tali fenomeni.

Infatti, l'infiammazione sistemica cronica si osserva di solito in età avanzata, sia nei topi che negli esseri umani, in linea con l'aumento dell'età - dipendente dai livelli plasmatici di citochine infiammatorie, in particolare TNF-alfa e IL-6.

L'obiettivo principale dello studio proposto è stato quello di verificare se lo squilibrio redox legato all'età sia uno degli eventi causali della maggiore severità delle infezioni da virus respiratori riscontrata negli anziani attraverso la dissezione dei meccanismi molecolari dei processi cellulari redox-mediati attivati dai virus.

La ricerca svolta nel primo anno ha perseguito i seguenti obiettivi:

1. identificazione dei fattori determinanti la suscettibilità o la resistenza alle infezioni da virus durante l'invecchiamento correlate a processi cellulari redox-mediati in modelli sperimentali in vivo;
2. analisi e caratterizzazione dell'interazione tra virus e cellula ospite durante l'invecchiamento, con l'obiettivo di identificare il rapporto causale tra i cambiamenti osservati nei processi cellulari redox-mediati e la suscettibilità al virus.

Materiali 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 16 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. 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.

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.

Titolazione del virus nei polmoni mediante 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).

Il primo anno della ricerca è stato dedicato alle seguenti attività:

- 1) verifica della suscettibilità di topi anziani all'infezione da virus influenzale in correlazione allo stato redox fisiologico e allo stato immunologico;
- 2) verifica dell'attività immunomodulante di una molecola pro-glutatione, il GSH-C4.

Nella prima fase della ricerca, 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 controllando la sopravvivenza e i segni clinici dell'infezione quali: il peso corporeo, l'attività motoria e la temperatura corporea. 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.

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 sia 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.

Nella seconda fase della ricerca i topi invecchiati e infettati con 0.5 pfu/topo di virus influenzale di tipo A, PR8/H1N1, sono stati trattati giornalmente con 7.4 mg di GSH-C4 per 7 giorni. Il gruppo di controllo è stato trattato con il placebo. Sette e quindici giorni dopo l'infezione, sono stati prelevati diversi organi per la valutazione di diversi parametri, inclusi il rapporto GSH/GSSG e il contenuto di cisteina, i livelli proteici e genetici delle citochine Th1/Th2 e titolo anticorpale. I topi sono stati monitorati giornalmente seguendo i segni clinici descritti sopra. I risultati indicano che il trattamento con GSH-C4 migliora i segni clinici dell'infezione in termini di temperatura corporea, e peso corporeo. Inoltre, nei topi trattati è stata osservata una diminuzione del titolo virale nei polmoni di 1 log rispetto ai topi infettati non trattati. Dal punto di vista immunologico, dati preliminari indicano che il GSH-C4 esercita un'attività immunomodulatoria nei topi invecchiati. Il trattamento induce un aumento dei livelli delle citochine Th1, inclusi l'interleuchina (IL)-12 e interferone- $\gamma$  e una diminuzione dei livelli di citochine Th2, come IL-4, IL-5 and IL-10. Ulteriori studi sono in corso per la valutazione dello stato redox generale durante l'infezione virale.



## LABORATORIO DI ENDOCRINOLOGIA CARDIOVASCOLARE

### Ruolo dell'esercizio fisico sul potere apoptotico del siero di pazienti con aumentato rischio cardiovascolare su cellule endoteliali della vena ombelicale umana

L'obiettivo principale del Laboratorio è quello di studiare i meccanismi molecolari che si trovano alla base dell'insorgenza e della progressione della malattia cardiovascolare e, più in generale, del danno vascolare e miocardico, con particolare riferimento allo studio dei meccanismi molecolari che regolano l'attivazione dei processi di morte (apoptosi e necrosi) e/o sopravvivenza cellulare.

Negli ultimi anni il numero dei pazienti con Scompenso Cardiaco Cronico (CHF) è progressivamente aumentato in seguito ad un aumento della sopravvivenza ad un evento cardiaco acuto ed una maggiore frequenza di fattori di rischio nella popolazione.

I pazienti con CHF mostrano una ridotta capacità funzionale e diversi studi hanno dimostrato che l'esercizio fisico in combinazione con una adeguata terapia medica è in grado di migliorare la capacità funzionale e la qualità della vita di questi pazienti. In particolare, l'esercizio fisico induce un miglioramento della funzione endoteliale in soggetti con aumentato rischio cardiovascolare e CHF. È stato dimostrato che il rilascio di ossido nitrico (NO) in risposta all'acetilcolina è associato ad una ridotta vasodilatazione endotelio-dipendente. Inoltre i pazienti con CHF mostrano elevati livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie coinvolte nella disfunzione endoteliale. Tale danno al livello dell'endotelio è correlato ad un aumentato rischio di trasformazione della placca aterosclerotica da stabile ad instabile. Nonostante i meccanismi responsabili di questo evento non siano ancora conosciuti, l'importanza dei fattori circolanti emerge da studi in vitro che utilizzano il siero di pazienti con sindrome coronarica acuta. Tali studi dimostrano che i fattori circolanti nel siero di questi pazienti inducono apoptosi di cellule endoteliali derivate dalla vena ombelicale umana (HUVEC). Pertanto alcuni fattori umorali potrebbero indurre l'attivazione della placca durante eventi patologici attraverso l'induzione della morte delle cellule endoteliali e/o muscolari lisce. L'esercizio fisico regolare migliora lo stato infiammatorio modulando i livelli circolanti di citochine proinfiammatorie e metalloproteinasi che svolgono un ruolo cruciale nel rimodellamento che interviene in seguito a disfunzione ventricolare sinistra.

Nel laboratorio è stato condotto uno studio pilota su 39 pazienti con CHF stabile (NYHA II) ove è stato già dimostrato che l'esercizio fisico riduce l'infiammazione vascolare e la capacità del siero di indurre morte cellulare per apoptosi e necrosi di cellule HUVEC.

Il progetto di ricerca si propone di arruolare pazienti con aumentato rischio cardiovascolare per valutare la capacità funzionale e la presenza nel siero di fattori circolanti in grado di indurre morte cellulare. In particolare, si valuta se l'esercizio fisico è in grado di indurre un effetto benefico a livello endoteliale. Tale effetto viene valutato attraverso specifici test di funzione endoteliale (Vasodilatazione flusso-mediata dell'arteria brachiale). Inoltre, si valuta la risposta all'esercizio fisico in termini di profilo di marcatori di rischio cardiovascolare e di infiammazione (VES, PCR, TNF $\alpha$ , IL6, aldosterone e attività reninica plasmatica etc.). Si valuta infine l'effetto sinergico dell'esercizio fisico con eventuali terapie farmacologiche già in corso (ACE inibitori, antagonisti del recettore mineralcorticoide, antagonisti del recettore dell'angiotensina II). Infine, viene trattata una linea di cellule endoteliali derivate dalla vena ombelicale umana (HUVEC) con il siero dei pazienti arruolati, prima e dopo un periodo di esercizio fisico programmato, in assenza o in presenza di aldosterone (10-8M). In queste cellule si analizza l'espressione di alcune proteine (Bax, Caspasi-3, Fas) implicate nei fenomeni apoptotici e alcuni marker di infiammazione e di adesione (TNF $\alpha$ , IL6, ICAM-1, VCAM).

Dopo la visita di screening, che valuta l'esistenza dei criteri di inclusione, il paziente viene inserito nello studio. Il paziente viene studiato al suo inserimento nello studio e dopo un anno di follow up.

I pazienti vengono sottoposti a visita cardiologica completa e prelievo di sangue prima e dopo esercizio fisico programmato. Lo studio della funzione endoteliale viene effettuato mediante test FMD che consiste nella misurazione della risposta dell'arteria brachiale a bruschi aumenti di flusso indotti da un'infusione intrarteriosa di sostanze ad azione vasodilatatrice (acetilcolina, Ach) e vasocostrittrice (L-N-monometilarginina, L-NMMA) a dosi che non determinano effetti sistemici e con l'ausilio di uno strumento di indagine pletismografica denominato Endopat.

Il sistema endopath si avvale della tecnica pletismografica per misurare il flusso sanguigno bilaterale in posizione supina dopo 15 minuti a riposo. Vengono utilizzate due sonde posizionate a livello delle mani e il flusso viene monitorato ogni 5 minuti prima e dopo la somministrazione di nitroglicerina sublinguale.

I trattamenti consistono nell'aggiunta di terreno contenente il 20% di siero proveniente da:

1. donatori sani
2. pazienti con aumentato rischio cardiovascolare

Le cellule sono incubate con il siero per 72 ore.

Il controllo positivo (condizione proapoptotica) è rappresentato da cellule che allo stesso passaggio vengono coltivate in assenza siero per 16-24 ore.

Alla fine del trattamento l'apoptosi viene valutata mediante western blot, saggi ELISA e citofluorimetria.

#### WESTERN BLOT

Estratti cellulari contenenti 50  $\mu$ g di proteine totali vengono corsi in un gel al 12% di acrilamide e trasferiti su una membrana di nitrocellulosa che è incubata con anticorpi anti-Fas (45kDa), anti-Caspasi3 full length (32kDa), anti-Caspasi3 clivata (19kDa) e anti-Bax (21kDa). Dopo 3 lavaggi in PBS/Tween 0.1% le membrane vengono trattate con anticorpi secondari coniugati con perossidasi, lavate nuovamente e sottoposte alla rilevazione con metodo chemiluminescente. Per verificare che eventuali differenze quantitative non siano dovute al caricamento delle proteine sul gel viene utilizzato anche un anticorpo anti-tubulina ed i risultati sono espressi come rapporto tra l'espressione delle proteine proapoptotiche e la tubulina dopo analisi densitometrica.

#### ELISA e CITOFLUORIMETRIA

I livelli di lattato deidrogenasi vengono dosati mediante saggio ELISA (LDH cytotoxicity detection kit, ROCHE Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany).

La quantificazione dell'apoptosi in termini di frammentazione del DNA viene valutata sia mediante saggio ELISA (Cell death Detection kit, ROCHE, Japan), sia mediante analisi citofluorimetrica in seguito a colorazione con annessina-propidio (Annexin V-FITC kit Bender Med Systems, Vienna, Austria). I livelli di metalloproteinasi e dei loro inibitori vengono misurati mediante saggio ELISA (MMP-1, MMP-9 Calbiochem) e TIMP-1 (Chemicon).

Nel corso dell'anno 2014 sono stati reclutati:

- 4 pazienti con aumentato rischio cardiovascolare (presenza di almeno tre fattori di rischio tra diabete mellito/ipertensione arteriosa/obesità viscerale/ipercolesterolemia /ipertrigliceremia/fumo) ma in assenza di malattia cardiovascolare manifesta;
- 5 soggetti senza fattori di rischio cardiovascolare di età paragonabile.

I pazienti sono stati sottoposti a visita cardiologica completa e prelievo di sangue prima e dopo esercizio fisico programmato. Lo studio della funzione endoteliale è stato effettuato mediante test FMD (Flow Mediated Dilatation) e con l'ausilio di uno strumento di indagine pletismografica denominato Endopath.

Sono state prelevate le PBMC (peripheral blood mononuclear cells), che contengono i monociti e i linfociti, attraverso gradiente di Ficoll, da tutti i soggetti reclutati, che ci permetterà di studiare l'espressione del recettore mineralcorticoide a livello delle cellule circolanti.

A causa della limitata numerosità campionaria non sono state al momento riscontrate modificazioni statisticamente significative della funzione endoteliale tra i due gruppi di soggetti, mentre è

stato osservato un trend di miglioramento nei parametri endoteliali dopo esercizio fisico in tutti i soggetti indipendentemente dal loro rischio cardiovascolare.

Per quanto riguarda gli studi in vitro le cellule HUVEC, normalmente coltivate in un terreno di coltura contenente il 5% di siero fetale bovino, sono state utilizzate al 6° passaggio e coltivate con terreno contenente il 20% di siero proveniente da ciascun soggetto prima e dopo esercizio fisico, in assenza o presenza di Aldosterone 10-8M. Dopo 72h di trattamento, tramite saggi ELISA utilizzando kit specifici, sono stati valutati:

- 1) i livelli di frammentazione del DNA delle cellule endoteliali per avere un indice del grado di apoptosi indotta dal siero.
- 2) i livelli di lattato deidrogenasi rilasciati nel terreno di coltura per avere un indicazione della presenza di necrosi cellulare.

E' necessario un incremento dei soggetti per poter evidenziare eventuali differenze.

Dati promettenti sono emersi dall'analisi dell'effetto del siero dei soggetti sull'espressione di molecole di adesione (ICAM 1, VCAM, P-selectin, V-selectin e E-selectin) da parte delle cellule HUVEC, in assenza o presenza di aldosterone 10-8M. L'aldosterone, come è noto, ha indotto in modo consistente l'aumento dell'espressione di ICAM-1, VCAM e E-selectin. E' noto infatti che l'attivazione del recettore mineralcorticoide vascolare promuove gli eventi precoci dell'aterosclerosi proprio attraverso l'induzione di molecole di adesione da parte dell'endotelio. Tale effetto è stato amplificato dall'aggiunta del siero di pazienti con aumentato rischio cardiovascolare, mentre non è stato significativamente modificato dal siero dei controlli sani. È interessante notare che l'esercizio fisico ha in parte revertito tale effetto di amplificazione di espressione di molecole di adesione da parte del siero dei pazienti con aumentato rischio cardiovascolare.

E'in corso di valutazione il rapporto aldosterone/attività reninica plasmatica di tutti i soggetti prima e dopo l'attività fisica, oltre all'estrazione delle cellule PBMC. Tale rapporto, che è rappresentativo del grado di attivazione dell'asse renina/angiotensina/aldosterone, viene correlato con tutti i parametri ottenuti dal siero dei pazienti.

Nel corso dell'anno 2015 si prevede di ottenere una numerosità campionaria di almeno 20 soggetti per gruppo.

Al termine dello studio ci si aspetta di poter dimostrare che l'esercizio fisico regolare è in grado di migliorare la funzionalità endoteliale di pazienti con aumentato rischio cardiovascolare, attraverso una correlazione tra il miglioramento delle condizioni cliniche del paziente, la riduzione di fattori circolanti pro-infiammatori nel siero e la conseguente riduzione di fenomeni di morte cellulare (apoptosi/necrosi) indotta dal siero in un modello sperimentale in vitro. Infine si ritiene che un programma di esercizio fisico sia in grado di ridurre l'attivazione del sistema mineralocorticoide nei pazienti ad elevato rischio cardiovascolare e di limitare le risposte pro-infiammatorie e pro-apoptotiche a livello vascolare mediate dall'aldosterone.

## LINEA 3

### SVILUPPO DI SISTEMI INNOVATIVI PER IL MONITORAGGIO ED IL CONTROLLO DELLA RISPOSTA AL TRATTAMENTO RIABILITATIVO

**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 sia di effettuare una diagnosi sempre più precoce sia di individuare nuovi bersagli terapeutici. Lo studio prevede, dopo il reclutamento ed il consenso informato di pazienti affetti da schizofrenia, la raccolta di campioni ematici, e di informazioni clinico-demografiche, estrazione ed analisi del DNA, sequenziamento genomico ed analisi di eventuali relazioni con le caratteristiche cliniche.

Si è concluso il reclutamento dei pazienti schizofrenici (totale 144). 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.

Sono state attivate 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. 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 entreranno in un pool internazionale di campioni che verranno analizzati tramite PsychChip, una nuova 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. 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.

- Laboratorio di Biogerontologia - CEMI, Dipartimento di Geriatria, Neuroscienze ed Ortopedia, Università Cattolica del Sacro Cuore. Studio caso-controllo sui telomeri in pazienti schizofrenici. I telomeri sono dei complessi DNA-proteine cruciali per il mantenimento dell'integrità cromosomica; situati all'estremità cromosomica proteggono dalla perdita di DNA cromosomico e nel mantenimento della stabilità genomica. La lunghezza dei telomeri declina con la divisione cellulare e con l'età. Il DNA dei pazienti schizofrenici viene confrontato con DNA di controlli non psichiatrici appaiati per età e genere al fine di evidenziare differenze nella lunghezza dei telomeri. Per i controlli sono stati ottenuti 144 campioni di sangue intero dalla Biobanca Interistituzionale Multidisciplinare dell'IRCCS San Raffaele Pisana per l'estrazione del DNA.

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 moleco-

lare sulla schizofrenia in prospettiva di disturbo del neuro-sviluppo, in particolare sui micro-RNA e sui telomeri.

Nel corso del 2015 si provvederà ad elaborare i dati delle analisi genetiche ed alla diffusione dei risultati tramite pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali.

**Caratterizzazione genotipica e fenotipizzazione molecolare della Bronco-Pneumopatia-Cronico-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. Si stima che nel 2020, 11.9 milioni di decessi su 68 milioni a livello mondiale saranno causati da malattie polmonari (4.7 da Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva - BPCO -, 2.5 da polmonite, 2.4 da tubercolosi -TB- e 2.3 da carcinoma polmonare). In termini di mortalità, incidenza, prevalenza e costi, le patologie polmonari si trovano al secondo posto a livello globale dopo le malattie cardiovascolari. In alcuni paesi (ad esempio il Regno Unito), esse costituiscono già la principale causa di decesso (fonte: European Lung Foundation, <http://www.it.european-lung-foundation.org/425-patologie-polmonari.htm>). Per quanto riguarda in particolare la situazione italiana, nel mese di gennaio 2008 il Ministero della Salute ha pubblicato la "Relazione sullo stato Sanitario del Paese 2005-2006", nella quale ha dichiarato che le malattie respiratorie "rappresentano per numerosità la 3° causa di morte in Italia, dopo le malattie dell'apparato circolatorio e delle neoplasie. La bronchite cronica e l'asma colpiscono più del 20% della popolazione di età superiore ai 65 anni e rappresentano per questa fascia di popolazione la terza causa di patologia cronica, dopo l'artrosi/artrite e l'ipertensione (ISTAT, 2003)". Il 50% dei decessi per cause respiratorie è attribuibile alla BPCO (ISTAT, Cause di Morte, 2002, 2005), ma l'effetto più drammatico di questa patologia si evince quando si considera che nei prossimi decenni essa è destinata a divenire la quinta causa di disabilità a livello mondiale, valutata in termini di DALYs -disability-adjusted life years (OMS, Ginevra). "In età geriatrica, infatti, la BPCO grave si associa a comorbidità e contribuisce in maniera significativa alla perdita di autosufficienza ed alla fragilità dell'anziano, specialmente a causa di importanti limitazioni dello stato funzionale, deterioramento cognitivo, problemi comportamentali e alterazioni del tono dell'umore. E' evidente, quindi, che la patologia respiratoria cronica ostruttiva ha un grande impatto socio-economico sull'individuo ma anche sull'intera società soprattutto a causa dei ricoveri ospedalieri e di terapie complesse e costose (compresa l'ossigenoterapia domiciliare a lungo termine e la ventiloterapia domiciliare). Anche utilizzando una stima conservativa, alla BPCO viene attribuito almeno il 6% dell'intera spesa sanitaria italiana, la quota maggiore è rappresentata dalle ospedalizzazioni" (Ministero della Salute, "Relazione sullo stato Sanitario del Paese 2005-2006").

Inoltre, in base ad una pubblicazione del Ministero della Salute del 2011 (Pubblicazione a cura di Dir. Gen. della Programmazione sanitaria, Ufficio VI - Federalismo) in Italia ci sono stati 111.700 DRG attribuiti ad Insufficienza Respiratoria (quinto posto fra le cause di ricovero). 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 pro-

grammi 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 BPCO. Gli obiettivi principali della riabilitazione in questi pazienti risiedono nella prevenzione delle complicanze infettive e 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 disostruzione bronchiale, l'allenamento dei muscoli respiratori, il ricondizionamento allo sforzo, lo svezzamento dalla ventilazione meccanica.

La complessità delle patologie trattate nei reparti 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, si rivela maggiormente adatta una prospettiva sistemica che permette di prendere in esame una notevole quantità di dati, provenienti da diverse fonti, al fine di formulare modelli computazionali che tengono conto di informazioni di diversa natura.

Il progetto prevede la costruzione di una piattaforma per la raccolta di dati complessi relativi ai pazienti ricoverati dal 2005 con diagnosi di insufficienza respiratoria presso i reparti di Pneumologia Riabilitativa del Presidio Ospedaliero IRCCS San Raffaele Pisana, della Casa di Cura San Raffaele Cassino e del San Raffaele Monte Compatri. Lo scopo della piattaforma riabilitativa consiste nell'implementare un database 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 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 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 anagrafici 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.

La piattaforma multi-level San Raffaele per le malattie non trasmissibili (SR- NCD), lanciata nel gennaio 2013, raccoglie e archivia informazioni cliniche e campioni biologici ottenuti da tutti i pazienti con malattie croniche, ammessi alla riabilitazione fisica sia nelle strutture di Roma del San Raffaele che in altre strutture cliniche regionali e università. Nel corso del 2013 è stato avviato uno studio pilota di campionamento allo scopo di ottimizzare il tipo di campione biologico ed i parametri di acquisizione dati.

QUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO	
Dati Sensibili	8
Dati del paziente	18
Storia Professionale	19
Abitudine al fumo	58
Dieta/Spare time/Altro	31
Storia familiare	105
Reliability	5
<b>TOTALE VAR. QUEST.EPID</b>	<b>244</b>

Questo ha permesso l'avvio di un nuovo progetto denominato "Piattaforma San Raffaele per le Malattie non Trasmissibili", che estende la casistica anche a pazienti affetti da altre malattie non trasmissibili e amplia il numero di parametri raccolti.

## LABORATORIO DI PATOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

### 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 di partenza 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.

Questo progetto si prefigge di:

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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 (3-6 ml). Dall'anello linfomonocitario ottenuto da ciascun prelievo sono 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. Viene inoltre valutata 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 sono transfettate per overesprimere o silenziare le diverse Sirtuine. I cloni ottenuti vengono 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 è stato osservato un aumento dell'espressione della proteina pro-apoptotica protein 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 non 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 metastatizzazione e, in conclusione, aumenti la sopravvivenza. 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 outcomes positivi.

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.

## LABORATORIO DI EPIDEMIOLOGIA CLINICA E MOLECOLARE

### Creazione e validazione di una Piattaforma per sviluppare e studiare modelli innovativi di patologia umana non trasmissibili [BPCO, cancro (NSCLC), leucemie e malattie neurologiche geriatriche (Alzheimer)]

Negli ultimi decenni si è assistito a un incremento delle possibilità offerte dalle tecnologie "high throughput" in termini di qualità e quantità (oltre che ottimizzazione) della "misura" molecolare e cellulare a livello, soprattutto, genomico e proteomico. Lo sviluppo, in specifico, di tecnologie di analisi sempre più sensibili e sofisticate (genetica, profili, funzionalità, ecc.) richiede la disponibilità di materiale biologico raccolto e trattato secondo tecniche standardizzate sempre più definite ed

affidabili in accordo alle attuali procedure europee. Alla luce di queste indicazioni viene realizzata una raccolta di campioni biologici (siero, plasma, linfociti) umani provenienti da pazienti affetti da malattie non trasmissibili, quali ad esempio Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva (BPCO) allo scopo di facilitare la traslazione delle informazioni di biologia, in particolare di omica, alla pratica clinica, di permettere una rapida risposta a quesiti sperimentali di potenziale valenza (terapia e/o diagnosi) garantendo la qualità e la quantità di campioni utilizzabili per queste pratiche.

La piattaforma permette di ottimizzare e personalizzare le strategie terapeutiche riabilitative dei pazienti. Vengono studiati metodi per l'individuazione di nuovi farmaci o terapie, marcatori prognostici e di risposta, e test tossicologici e funzionali.

E' stata organizzata presso il laboratorio di Epidemiologia molecolare dell'IRCCS San Raffaele Pisana la criopreservazione di campioni biologici umani provenienti da pazienti affetti da BPCO e disordini neurologici (quali, ad esempio, Parkinson e/o Alzheimer). I campioni sono prelevati in accordo alle normative europee e come descritto in Curr Pharm Des. 2014;20(38):5945-56.

Viene effettuata:

- Somministrazione del questionario;
- Raccolta dati relativi ai pazienti: età, sesso, diagnosi clinica inclusa presenza di BPCO, diagnosi istologica, tipo intervento, follow-up (in accordo ai centri di provenienza), terapia, eventuale riabilitazione respiratoria pre o post intervento, risultati del questionario in accordo a Curr Pharm Des. 2014;20(38):5945-56;
- La bio-repository è allestita presso l'IRCCS San Raffaele. I dati relativi all'identità del paziente vengono anonimizzati. Ad ogni aliquota vengono associati i dati clinici di riferimento in un archivio computerizzato;
- Valutazione critica della letteratura.

Nel corso del 2014 si è proceduto con :

- Definizione della piattaforma;
- Costruzione iniziale della rete degli altri istituti coinvolti (Università Cattolica del Sacro Cuore e AFAR);
- Descrizione delle procedure operative;
- Raccolta e criopreservazione di 96 campioni provenienti da pazienti affetti da BPCO, prelievi in entrata ed in uscita (plasma, siero linfociti). Raccolta e criopreservazione di 10 campioni di BAL;
- Valutazione critica del ruolo delle varianti geniche del recettore nicotinico nell'aumento di rischio per dipendenza, insorgenza di tumore e ruolo nella terapia per la cessazione dal fumo di sigaretta. Varianti nei geni codificanti le sub-unità alfa 3-5 (rs1051730 e rs16969968) sono specificamente associate alla dipendenza da nicotina, al maggiore rischio di insorgenza di tumore e influiscono la risposta ai farmaci utilizzati per la terapia per la cessazione dal fumo quali Bupropione e Vareniclina;
- Valutazione critica della letteratura selezionata dell'attività dei farmaci antitumorali di origine marina. I metaboliti secondari prodotti dai Cyanobacteria products sono il prototipo dal quale possono essere sviluppati nuovi farmaci;
- Valutazione critica della letteratura selezionata dell'attività dei farmaci di origine naturale per terapia Alzheimer di galantamina e rivastigmina è attualmente in corso. Terapia con nicotina ha dato risultati promettenti e studi sono in corso per valutare il suo potenziale terapeutico;
- Valutazione della letteratura selezionata dei farmaci per terapia Alzheimer aventi come bersaglio il recettore alpha7 nicotinico. Diversi farmaci entrati in Fase II non sono passati alla fase III umana. I risultati sperimentali condotti dal gruppo dimostrano che il Donepezil aumenta l'espressione proteica di alpha7 in linfociti umani e in cellule staminali neuronali umane;
- Valutazione critica della letteratura selezionata dei farmaci aventi come bersaglio i recettori nicotinici di tipo alpha 9 e 10 come antidolorifici RgIA and Vc1.1 due peptidi originati dal Conus (cono peptidi) inducono analgesia sia a breve che a lungo termine. attraverso i meccanismi della risposta immune ed infiammatoria;
- Definizione critica del ruolo della nicotina in angiogenesi, proliferazione e apoptosi. La nicotina stimola gli eventi di angiogenesi e proliferazione ed inibisce i processi di apoptosi interagendo

con i recettori nicotinici di tipo alpha-7 presenti anche sulle cellule non neuronali (epiteliali, endoteliali);

- Valutazione critica di una letteratura selezionata su meccanismi genetici quali varianti geniche coinvolte nell'insorgenza di BPCO, NSCLC e malattie geriatriche, e ruolo nella risposta alla terapia;

- Utilizzo di embrioni precoci di animali semplici, che fisiologicamente si sviluppano al di fuori del corpo materno (invertebrati marini, quali il riccio di mare Paracentrotus lividus), allo scopo di studiare i recettori colinergici. Esiste un'altissima percentuale di omologia fra le proteine strutturali di riccio e quelle umane;

- Valutazione critica della letteratura sul processo di "ageing".

Ci si attende di poter effettuare:

- Raccolta e criopreservazione dei campioni;
- Raccolta dati relativi ai pazienti: età, sesso, diagnosi clinica inclusa presenza di BPCO, diagnosi istologica, tipo intervento, follow-up (in accordo ai centri di provenienza), terapia, eventuale riabilitazione respiratoria pre o post intervento, risultati del questionario;
- Valutazione critica del ruolo svolto dai recettori colinergici neuronali e non neuronali (nicotinici e/o muscarinici) nell'insorgenza di malattie quali BPCO, NSCLC e patologie neuro-degenerative;
- Valutazione critica di una letteratura selezionata su nuovi farmaci antitumorali;
- Sviluppo di nuovi farmaci targeted-oriented verso il sistema colinergico per la terapia antitumorale e/o neurodegenerativa.

Come risultati significativi per un centro di ricerca avanzato centrato sulla riabilitazione e il recupero funzionale di pazienti si hanno: creazione della piattaforma per NSCLC; utilizzo di campioni umani per esperimenti di omica; traslationalità immediata; strategie terapeutiche; avanzamento delle conoscenze in campo medico e clinico relativo a malattie umane; pubblicazioni.



## 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 sviluppati ad hoc 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 e della 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 quali siano i deficit principali nella DS. (3) indagare con 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 alla valutazione motoria per la determinazione di strategie legate al controllo motorio.

A seguito di ciò 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 di feedback, mentre i soggetti di controllo fanno più affidamento a meccanismi di tipo feedforward, (3) i soggetti con DS sono in grado di completare i task sebbene con minor efficienza del movimento.

Questi risultati evidenziano alcuni importanti quesiti clinici:

- il maggior affidamento su meccanismi di 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 sog-

getti con DS?

Rispondere a queste domande è di notevole importanza per lo sviluppo di strategie riabilitative mirate. Una parziale risposta a queste domande viene 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 soggetti con 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 stato chiesto 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: una acquisizione statica ed una 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) e le caratteristiche cinematiche (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'ipotonìa, che sono tipicamente presenti in questi soggetti.

In conclusione, 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 fornire un valido aiuto nella caratterizzazione dei movimenti fini di altre patologie che comportano disturbi cognitivi e motori.

## LINEA 5

### IDENTIFICAZIONE DI NUOVI MODELLI ORGANIZZATIVI E GESTIONALI PER OTTIMIZZARE LA RISPOSTA RIABILITATIVA NEL PAZIENTE DISABILE

## Area di Ricerca Neuromotoria

### Protocollo comune di valutazione in Riabilitazione Robotica

Nell'ambito della riabilitazione robotica esiste nella letteratura nazionale e internazionale un approccio valutativo disomogeneo con outcome diversi tra uno studio e l'altro. Ciò conferisce una carente rilevanza alle conclusioni scientifiche di eventuali revisioni della letteratura. Questo progetto ha l'obiettivo di omogeneizzare i sistemi valutativi e lo schema terapeutico utilizzando la riabilitazione robotica. Il protocollo messo a punto fa fronte alla necessità di costruire un sistema di valutazione minimo comune a più strutture in Italia al fine di passare da una improvvisazione giornaliera ad un approccio globale comune alla problematica. La selezione delle scale da adottare nell'ambito del protocollo condiviso da più centri che afferiscono all'Italian Robotic Neuro-Rehabilitation Group (IRNRG), ha utilizzato la procedura scientifica metodologica Delphi. È stato individuato un Comitato Scientifico Ristretto (quattro specialisti) che hanno avuto il compito di preparare gli Statement, decidere la struttura dei round sia in termini qualitativi che quantitativi, definire il numero totale dei round, definire i criteri di inclusione e gli "Esperti". I questionari, inviati in modalità anonima e per via elettronica, sono stati sottoposti per un massimo di 3 round. Alla chiusura della fase di raccolta dati sono state analizzate le risposte a ciascuna domanda e formulato il protocollo di valutazione. Questo garantisce la valutazione di tre domini dell'ICF: Body Function, Activities e Participation, mentre gli esperti hanno escluso la valutazione di Personal Factors ed Environmental Factors, in quanto complicati da attivare nella pratica clinica quotidiana. Gli esperti hanno anche deciso di focalizzare la valutazione solo sulle persone con esiti di Ictus Cerebrale avviate alla terapia robotica, in quanto è la patologia maggiormente frequente nelle strutture italiane coinvolte nella ricerca.

Il progetto è terminato ed è stato sottoposto un articolo alla Rivista Eur. J PM&R per la pubblicazione.

**Ricerca e validazione di indicatori in grado di migliorare la prescrizione farmacologica e la qualità della presa in carico delle persone in età geriatrica**

La letteratura del settore è concorde nel definire estremamente inappropriata la qualità della prescrizione farmacologica nella popolazione anziana. Dati recenti prodotti da AsMed e riportati nel report annuale dell'AIFA sul consumo di farmaci ne confermano l'impatto nel nostro paese. Obiettivo primario di questo progetto è quello di identificare e quantificare la presenza di prescrizioni inappropriate di farmaci ad anziani in Italia. Ottenuti questi dati l'obiettivo successivo è quello di associare la presenza di prescrizione inappropriata ad eventi avversi quali mortalità, riacutizzazioni, ospedalizzazione, etc. A corollario del primo obiettivo si è pianificata anche la realizzazione di indicatori specifici di inappropriatezza (estrinseci) per la popolazione geriatrica. Lo studio condotto in collaborazione con AIFA, OsMed e Clicon è basato sull'interazione e rianalisi di dati prodotti da Clicon su 14 ASL nazionali. Sono stati prodotti 13 indicatori di inappropriatezza prescrittiva specifici per la popolazione ultra 65enne e per il nostro paese (Onder et al., 2014).

Descrizione degli indicatori di inappropriatezza	
<b>Polypharmacy</b>	
1.	Polypharmacy
<b>Treatment adherence</b>	
2.	Low adherence to antidepressant drugs
3.	Low adherence to antihypertensive drugs
4.	Low adherence to hypoglycemic drugs
5.	Low adherence to antiosteoporotic drugs
<b>Prescribing cascade</b>	
6.	Use of anti-Parkinson and antipsychotic drugs
<b>Undertreatment</b>	
7.	Underutilization of statins in diabetic patients
<b>Drug-drug interaction</b>	
8.	Concomitant use of drugs increasing the risk of bleeding
9.	Concomitant use of drugs increasing the risk of renal failure and/or hyperkalemia
10.	Concomitant use of >=2 QT prolonging drugs
<b>Drugs to be avoided</b>	
11.	Use of anti hypertensive drugs with unfavorable risk-benefit profile
12.	Use of high dosage of digoxin
13.	Use of oral hypoglycemic agents associated with high risk of hypoglycemia

E' stata avviata una seconda fase di analisi in cui il gruppo di ricerca partecipa alla valutazione della polifarmacoterapia in pazienti anziani ed alla appropriatezza delle prescrizioni e del consumo in pazienti a rischio demenza, oltre a coordinare un gruppo di lavoro sulla prescrizione farmacologica in pazienti affetti da BPCO.

**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 nello stesso individuo, particolarmente se anziano, vengano diagnosticate, con sempre maggior frequenza, più patologie croniche, 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 quindi un incremento della spesa sanitaria. L'approccio clinico al paziente complesso prospettato è necessariamente focalizzato sulla multimorbilità ed è patient centered, per cui ciascun paziente è valutato nella sua globalità, compresi gli aspetti psico-sociali e genetici. 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. Per raggiungere questi obiettivi è stata prevista una fase di studio pilota, per indirizzare le problematiche più immediate e valutare l'impiego di risorse e l'ottenibilità degli obiettivi.

Il progetto utilizza il framework organizzativo della piattaforma San Raffaele di Systems Medicine. Per ottenere una stima realistica delle risorse necessarie ad un approccio System medicine i pazienti sono tutti reclutati nel reparto di riabilitazione respiratoria dell'IRCCS San Raffaele Pisana. I dati raccolti sono correntemente in corso di inserimento in un database relazionale che permetterà l'estrazione di informazioni in modo organico, mentre i campioni biologici dopo essere stati aliquotati verranno depositati nei frigoriferi dell'area. Nell'ambito del progetto CCM dedicato all'Integrated care e coordinato dall'Università di Firenze è stata avviata un' collaborazione con la Fondazione Bruno Kessler di Trento che assisterà il gruppo di ricerca nella preparazione di software per un input dati web-based e nell'identificazioni delle strutture di dati rilevanti ai fini del progetto interne al database. L'input di un singolo paziente richiede 3-4 ore di lavoro in quanto prevede l'inserimento di dati, numerici e non, relativi a 1000 variabili (vedi tabella seguente) ed il necessario controllo statistico della qualità del dato.

NOME VARIABILE	NUMERO DI INSERIMENTI
ADL	7
IADL	10
SAINT GEORGE	53
BARTEL	12
MRF 26	37
MINIMENTAL	14
TEST DI REY	4
CIRS	17
BRIEF COPE	28
CESD	20
MOCA	11
ZUNG	21
PARAMETRI VARI	15
TERAPIA FARMACOLOGICA	1
SIX MINUTES WALKING TEST	9
MRC	1
BORG	1
<b>TOTALE VARIABILI</b>	<b>261</b>
<b>QUESTIONARIO EPIDEMIOLOGICO</b>	
Dati Sensibili	8
Dati del paziente	18
Storia Professionale	19
Abitudine al fumo	58
Dieta/Spese time/Altro	31
Storia medica I	249
Storia Medica II	246
Storia familiare	105
Reliability	5
<b>TOTALE VARIABILI QUEST. EPID</b>	<b>739</b>
<b>TOTALE GENERALE VARIABILI PIATTAFORMA</b>	<b>1000</b>

Alla fine del 2014 sono stati raccolti dati e campioni relativi a 96 pazienti affetti da BPCO in trattamento presso il reparto di riabilitazione respiratoria. E' stato inoltre avviato l'input dei dati che ha interessato circa un terzo della casistica disponibile.

La disponibilità di un sistema di raccolta e organizzazione dei dati e dei campioni permetterà l'avvio dello studio pilota e quindi ottenere i primi dati sulla necessità di risorse per generare il dataset necessario per un approccio di systems medicine. La disponibilità di campioni annotati permetterà di consolidare collaborazioni con laboratori esperti nei vari settori delle tecnologie ad high-throughput e con laboratori attivi nel campo della modellistica e della network analysis, i quali permetteranno la gestione di informazioni ad alta complessità quali quella raccolta dalla piattaforma.



## MINISTERO DELLA SALUTE – RICERCA FINALIZZATA

### Anno 2009. Right ventricular adaptation in pulmonary arterial hypertension: the interplay between shape and myocardial injury

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. I meccanismi che conducono il Ventricolo Destro (VD) allo scompenso sono scarsamente studiati e non completamente compresi.

1. Gli obiettivi di questo studio sono indirizzati verso le seguenti lacune di conoscenza: Studiare l'adattamento del VD all'incremento di sovraccarico attraverso le modifiche morfofunzionali del VD. In particolare, valutare il ruolo del rapporto massa/volume del VD (M/VVD) alla RM e il suo impatto sulla sopravvivenza o il peggioramento clinico durante terapia specifica. I dati preliminari suggeriscono che questo parametro più di altri (volume, massa, spessore di parete) possa esprimere l'adattamento (M/V alto) o il maladattamento (M/V basso) del VD.

2. Chiarire il significato e l'impatto delle aree di delayed enhancement (DE) sull'outcome di tali pazienti. La localizzazione del DE sarà correlata all'area di ridotta perfusione alla scintigrafia perfunzionale con stress farmacologico (immagini esaminate a riposo e dopo infusione di diripidamolo) ed al rilascio di troponina cardiaca T.

3. Accertare se l'infiammazione possa avere un ruolo nell'IAP (differente attivazione di citochine infiammatorie in particolari sottogruppi di IAP - HIV, connettivopatie vs IAP idiopatica).

4. Studiare le caratteristiche istopatologiche dell'ipertrofia del VD (presenza di apoptosi, miocardite focale, fibrosi interstiziale).

5. Studiare l'espressione genica nei miociti, e la presenza di genoma o proteine virali.

6. Valutare l'impatto degli aspetti precedenti sulla risposta alla terapia e sulla sopravvivenza.

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 M, 5 F 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  $52,0 \pm 16,58$  ml e la frazione di eiezione di  $55,3 \pm 5,6\%$ . 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. La miocardite del ventricolo destro potrebbe influenzare negativamente il rimodellamento e la funzionalità del ventricolo destro e avere un ruolo nella compromissione della circolazione polmonare.

3 pazienti nuovi sono stati arruolati.

12 pazienti sono in corso di arruolamento.

E' stato inoltre finalizzato il data base di raccolta dati contenente i parametri che sono stati comunicati in sede di approvazione del comitato etico.

È stato presentato al Comitato etico, ed approvato, l'emendamento sostanziale n° 1, che ottimizza l'arruolamento dei pazienti.

L'emendamento modifica il criterio di esclusione n°2: pazienti già in trattamento con farmaci per ipertensione arteriosa polmonare (antagonisti dei recettori per l'endotelina, prostanoidei, IPDE-5). Il rationale per tale modifica è da ricercare nel fatto che in questi ultimi anni si è osservata una riduzione di pazienti naive (senza trattamenti specifici) presso le Unità Operative partecipanti allo studio.

La modifica di tale criterio di esclusione 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).

A inizio anno 2014 i risultati dell'arruolamento sono i seguenti:

1) Sono stati arruolati complessivamente 45 pazienti rispondenti ai criteri di inclusione ed esclusione.

2) Di questi 45 pazienti, 33 hanno già eseguito tutti gli esami di base previsti dal protocollo; e di questi 33 pazienti, 18 hanno anche eseguito i controlli a 6 mesi come previsto. Gli altri 15 completeranno il tutto nei prossimi 60 giorni.

3) Nella stessa finestra di tempo, anche i 12 pazienti da poco arruolati eseguiranno gli esami previsti dal progetto.

4) Sono già stati individuati altri 10-15 pazienti che rispettano i criteri di inclusione. Al controllo successivo previsto verrà proposto di partecipare allo studio. Si prevede pertanto la possibilità di arruolare effettivamente la popolazione stabilita da ora alla fine della finestra prevista dal protocollo.

5) 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 freezer  $-80^{\circ}$  C in attesa di essere analizzati.

### Anno 2010. Modulation of metabolic mechanisms in muscle loss disorders: involvement of autophagy and apoptosis

L'obiettivo principale di questo progetto è determinare il ruolo dell'apoptosi e dell'autofagia nel mantenimento della massa muscolare in seguito al trattamento con modulatori metabolici.

In particolare il progetto intende:

- valutare la capacità di alcuni modulatori del metabolismo di ottimizzare il metabolismo del muscolo scheletrico e di contrastare l'atrofia muscolare e quindi aumentare la forza muscolare. Se così fosse, questi farmaci potrebbero essere usati nel trattamento di pazienti con disordini caratterizzati da perdita della massa muscolare, come miopatie, atrofia da disuso e cachessia.

- analizzare, inoltre, l'induzione di autofagia e di apoptosi nel muscolo scheletrico in seguito a

trattamento con modulatori del metabolismo. E' stato ipotizzato che l'effetto dei modulatori metabolici sul muscolo scheletrico possa essere mediato dalla loro capacità di modulare l'autofagia e l'apoptosi; questa capacità potrebbe contrastare l'atrofia muscolare tipica di alcune condizioni patologiche.

- individuare i sensori metabolici attivati dai modulatori metabolici usati e le conseguenze della loro attivazione a livello trascrizionale e di attivazione genica. In particolare, verranno studiati PGC-1alfa e AMPK e il loro ruolo e la loro correlazione con l'autofagia e l'apoptosi.

Studi in vitro

1) Analisi dell'autofagia e dell'apoptosi.

L'autofagia è un processo di degradazione cellulare nel quale porzioni di citoplasma e organelli danneggiati sono sequestrati in vescicole a doppia membrana (o autofagosomi) che vengono trasportate ai lisosomi per la degradazione e l'eventuale riciclaggio del loro contenuto. A livello basale, l'autofagia, insieme al sistema ubiquitin-proteasoma, degrada e ricicla la maggior parte dei componenti cellulari svolgendo un ruolo chiave nel bilancio energetico cellulare. L'autofagia è anche un meccanismo citoprotettivo che porta alla sopravvivenza cellulare in condizioni sfavorevoli e di stress. Nel muscolo scheletrico il ruolo dell'autofagia è controverso in quanto potrebbe essere sia benefico che dannoso.

Nel muscolo in condizioni basali, l'attivazione dell'autofagia è fondamentale per evitare l'accumulo di organelli e proteine disfunzionali nelle miofibre. L'autofagia è anche indotta per la degradazione delle proteine muscolari e la successiva mobilizzazione degli aminoacidi al fegato per sostenere la gluconeogenesi, utile per fornire energia per il mantenimento di organi critici come il cuore ed il cervello. In quest'ultimo caso, un'eccessiva attivazione dell'autofagia potrebbe contribuire ad un'aumentata degradazione delle proteine ed alla perdita di massa muscolare (per es. atrofia). Evidenze sperimentali inoltre dimostrano che sia la modulazione del processo autofagico come il mantenimento della massa muscolare sono strettamente dipendenti dal metabolismo energetico cellulare. Questo fa supporre che la modulazione del metabolismo muscolare potrebbe modificare la plasticità muscolare. La modulazione dei meccanismi metabolici potrebbe essere raggiunta attraverso farmaci definiti modulatori metabolici. Questi farmaci hanno dimostrato di migliorare l'efficienza del miocardio in condizioni ischemiche bloccando l'ossidazione degli acidi grassi e aumentando l'ossidazione del glucosio e conseguentemente migliorando il metabolismo energetico nei cardiomiociti.

E' stata analizzata l'autofagia in miotubi C2C12 differenziati in seguito al trattamento con il modulatore metabolico trimetazidina (TMZ). La TMZ è un farmaco già impiegato con successo in pazienti con scompenso cardiaco ischemico. Infatti, nel muscolo cardiaco, la TMZ è capace di determinare dei cambiamenti metabolici e funzionali in grado di migliorare la contrattilità e la frazione di eiezione ventricolare (funzionalità diastolica). Si è concluso che la TMZ induce autofagia in quanto, in seguito ad analisi di WB, la forma lipidata di LC3 (LC3-II) e il rapporto tra LC3-II e LC3-I sono più abbondanti in seguito al trattamento con TMZ. Anche l'induzione di geni autofagici (LC3 e Beclin1) risulta aumentata in seguito al trattamento con TMZ. Inoltre, la localizzazione cellulare di LC3 è stata analizzata attraverso fluorescenza usando uno specifico anticorpo per LC3 ed è stata messa in evidenza l'associazione tra LC3 e lisosomi individuati tramite la sonda selettiva LysoTracker. Infine, anche l'analisi al microscopio elettronico ha fatto rilevare un maggior numero di autofagosomi in miotubi trattati con TMZ rispetto a miotubi di controllo.

Questi dati relativi all'autofagia e altri dati che verranno riportati in seguito, sono già stati pubblicati dal gruppo (Ferraro et al., 2013). L'analisi dell'autofagia nei mioblasti è in corso di analisi, contemporaneamente all'analisi del flusso autofagico e all'interferenza tramite siRNA di Beclin1 per valutare l'importanza dell'autofagia nel processo di differenziamento miogenico e nell'atrofia.

L'apoptosi è la principale forma di morte cellulare e la mancanza o la disregolazione di questo processo, vengono considerati tra i meccanismi patogenetici alla base di numerose patologie (per es. nella patologia tumorale). E' infatti chiaro che l'omeostasi tissutale, cioè il bilanciamento tra proliferazione e morte cellulare, è essenziale nel "mantenimento" di un organismo. Di contro

il ruolo svolto dall'apoptosi nei tessuti post-mitotici ed in particolar modo dei muscoli, è ancora oggetto di discussione. Le miofibre muscolari sono caratterizzate dalla presenza di segmenti citoplasmatici regolati ognuno da singoli mionuclei. In presenza di stimoli apoptotici, i nuclei della fibra muscolare vanno incontro ad apoptosi non tutti simultaneamente, ma secondo una eliminazione progressiva che determina una successiva degenerazione del segmento citoplasmatico. Il protrarsi di questo fenomeno, può indurre processi di atrofia e degenerazione muscolare presenti in diverse condizioni patologiche (per es. le miopatie infiammatorie, la denervazione, il disuso e l'atrofia muscolare spinale).

Per quanto riguarda l'analisi dell'apoptosi nell'ambito di questo progetto, sono stati trattati mioblasti e miotubi C2C12 in corso di differenziamento con TMZ ed è stata analizzata l'eventuale induzione di apoptosi di questo modulatore metabolico. In particolare è stato valutato, tramite WB, il taglio proteolitico e l'attivazione della caspasi-3 e del substrato di caspasi PARP. E' stata anche valutata l'induzione di apoptosi tramite analisi della morfologia dei nuclei marcati con Hoechst. Questi esperimenti dovranno essere ripetuti una terza volta per valutare la riproducibilità dei risultati e implementati con saggi in vitro di attivazione della Caspasi-3, il metodo TUNEL e valutazione del taglio proteolitico della caspasi-3 in fluorescenza. Si può dire che, tendenzialmente, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa di induzione apoptotica tra cellule trattate con TMZ e cellule non trattate. Quindi, il modulatore metabolico TMZ, alle dosi e ai tempi utilizzati, non sembra indurre apoptosi né in mioblasti, né in miotubi maturi. Questo è in accordo con il noto ruolo di TMZ di citoprotettore cardiaco.

TMZ è in grado di esercitare un importante effetto citoprotettivo anche riducendo le alterazioni del citoscheletro causate da TNFalfa in miotubi differenziati in cultura. Dopo il trattamento con TNFalfa è evidente uno sconvolgimento completo dei microfilamenti actinici con i nuclei disorganizzati all'interno della miofibra. Queste modifiche vengono contrastate dalla contemporanea somministrazione di TMZ.

2) Per analizzare il ruolo protettivo della TMZ contro l'atrofia sui miotubi maturi, è stata indotta atrofia mediante rimozione di siero, oppure tramite TNFalfa ed è stato valutato l'effetto della contemporanea somministrazione di TMZ. E' stato così osservato che i livelli degli mRNA dei marcatori di atrofia atrogin-1 e MuRF1 si riducono in seguito a trattamento con TMZ. Anche la riduzione del diametro dei miotubi indotta dalla rimozione del siero e dal TNFalfa si attenua con la TMZ e i miotubi risultano parzialmente protetti da questi danni atrofici. In accordo con questo dato, è stato osservato che anche la quantità di miosina aumenta in seguito a trattamento con TMZ. Per esplorare il meccanismo tramite cui la TMZ protegge i miotubi dall'atrofia, sono state studiate alcune vie di trasduzione del segnale che regolano la sintesi e la degradazione proteica. A questo scopo è stata valutata la fosforilazione di AKT in serina-473 che, agendo su FoxO, impedisce la trascrizione di atrogin-1 e MuRF1. Si è osservato che la fosforilazione di AKT in serina-473 aumenta con la TMZ e questo contribuisce a ridurre la degradazione proteica. Inoltre anche le fosforilazioni di FOXO3a e di NDGR1 aumentano con la TMZ e questo indica l'attivazione di mTORC2 e quindi la riduzione della degradazione proteica.

L'induzione dell'autofagia e la riduzione della degradazione proteica indotte dal TMZ potrebbero essere parte del meccanismo attraverso cui TMZ protegge dall'atrofia. Questo verrà valutato tramite esperimenti in vivo.

3) Per stabilire il ruolo dei modulatori metabolici sulla riduzione della massa muscolare è stato anche valutato l'effetto della TMZ sulla rigenerazione del muscolo scheletrico che, se inficiata, può portare ad una ridotta massa muscolare. A questo scopo sono stati effettuati degli studi in vitro e in vivo. In vitro, sono stati trattati mioblasti C2C12 e cellule satelliti in corso di differenziamento con TMZ. Tramite questi esperimenti, si è osservato che la trimetazidina potenzia l'espressione di geni miogenici quali MyoD, Myogenin, MyHC e Desmin (vedi per es. Fig. 1A). Ciò è stato evidenziato tramite Q-RT-PCR e anche tramite valutazione, in microscopia a fluorescenza, dell'espressione di MyoD, Myogenin e MyHC (vedi per es. Fig. 1B,C). E' stato anche valutato l'indice di fusione dei mioblasti e si è osservato che esso aumenta in presenza di TMZ (Fig 1D).

4) L'effetto dei modulatori metabolici sul metabolismo del muscolo scheletrico è stato in parte

analizzato. E' stato ad esempio determinato che la TMZ aumenta il consumo di glucosio e di glicogeno analizzato con la reazione PAS (Acido Periodico-Schiff) da parte dei miotubi C2C12. Questo è in accordo con la capacità della TMZ di inibire la beta-ossidazione degli acidi grassi, cosa che forza la cellula ad aumentare il consumo di glucosio come fonte di energia. Coerentemente con questi dati, la TMZ determina una riduzione dell'espressione della piruvato deidrogenasi chinasi (PDK) valutata tramite Q-RT-PCR (Ferraro et al. 2013). Il resto dell'analisi del metabolismo riportato al punto 4 del progetto è attualmente in corso.

5) Delle analisi indicate è stata valutata l'espressione di PGC-1alfa su mioblasti in via di differenziamento ed è stato determinato che essa aumenta in presenza di TMZ. Il resto dello studio previsto al punto 5 è rimandato alla seconda fase del progetto.

## Studi in vivo

1) E' stata analizzata la dimensione delle fibre muscolari (CSA) del muscolo tibiale anteriore nei topi C26 trattati con TMZ. Il tipo di colorazione che si è deciso di effettuare (laminina e MyHC slow) consentirà di valutare anche la percentuale delle fibre slow rispetto al numero totale delle fibre. Il numero di topi analizzati non consente ancora di avere un valore definitivo e significativo. L'analisi è in corso e terminerà nel 2015. In seguito, verranno analizzati i topi modello di invecchiamento trattati con modulatori metabolici.

2) L'analisi dell'autofagia in vivo verrà effettuata nella seconda parte del progetto come da cronoprogramma.

3) La capacità rigenerativa del muscolo è stata valutata in vivo in seguito a danno mediante cardiotossina, in topi di controllo e topi trattati con TMZ. E' stato osservato che il numero di fibre rigeneranti è superiore negli animali trattati con TMZ e che, alla fine della rigenerazione, le fibre sono più grandi in seguito al trattamento con TMZ. I livelli di mRNA muscolo-specifici (MyoD, myogenin, Desmin, MyHC) sono superiori nei lisati muscolari degli animali trattati con TMZ. Questi dati confermano gli esperimenti in vitro e suggeriscono fortemente che la capacità di fusione

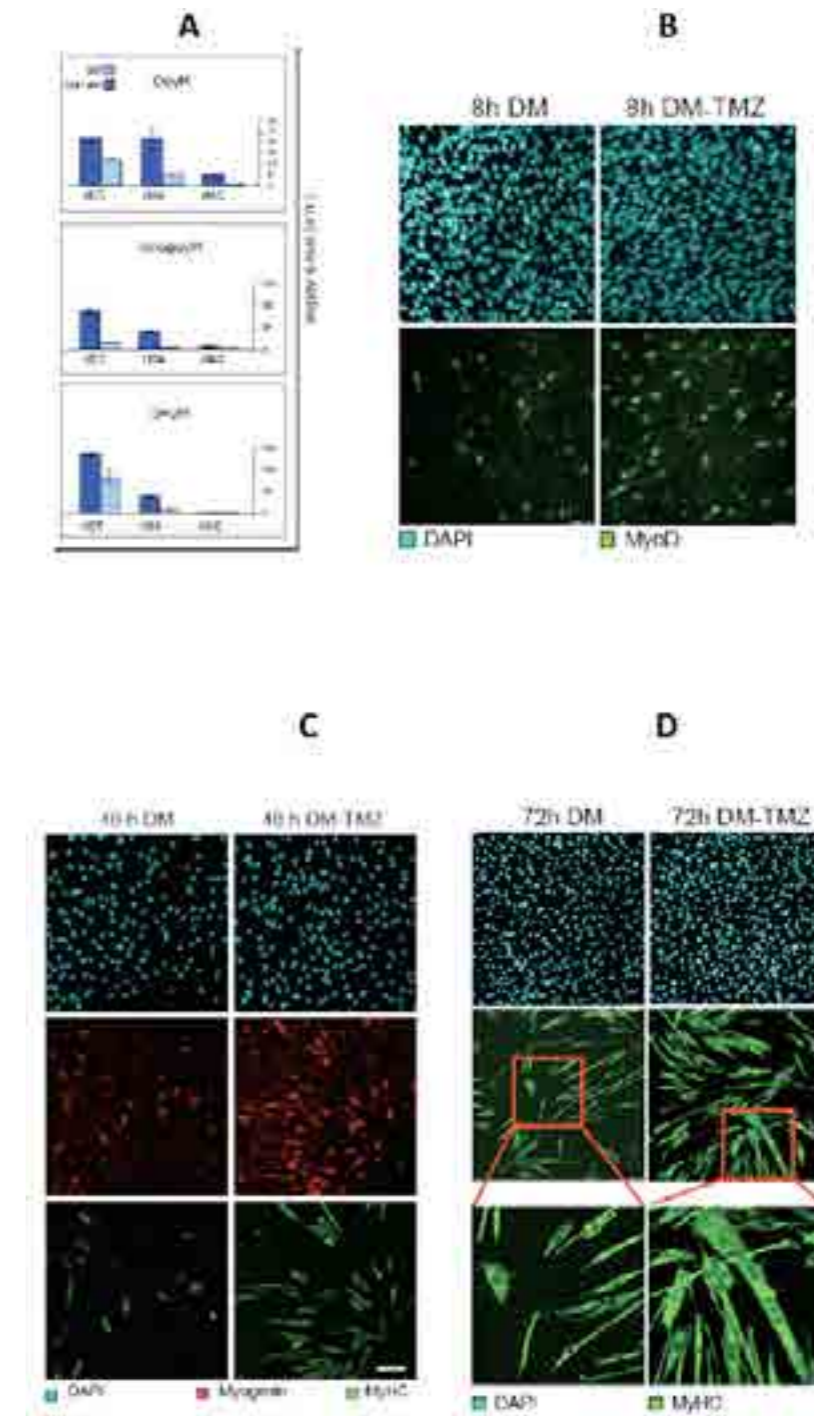


Fig. 1

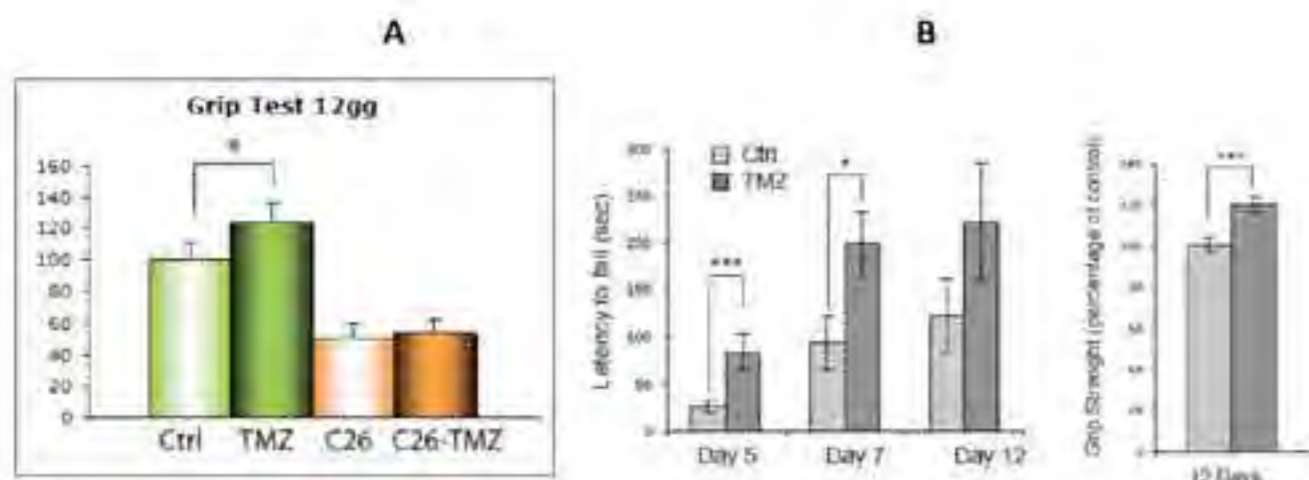


dei mioblasti è potenziata dal modulatore metabolico trimetazidina.

4) Le conseguenze funzionali del trattamento con modulatori metabolici in vivo sono state valutate attraverso l'analisi della funzionalità del muscolo scheletrico mediante grip test e il test dello schermo invertito di Kondziela. Sia gli animali di controllo (Fig. 2, TMZ) che gli animali anziani (Fig 2B) hanno una forza maggiore in seguito al trattamento con TMZ (Dati presentati in Ferraro et al. 2014- Submitted JMCS). Gli animali C26 portatori di tumore (Fig 2A, C26-TMZ) mostrano una tendenza all'aumento della forza che, tuttavia, non raggiunge la significatività. Il resto delle analisi riportate al punto iv) verrà effettuato nella seconda parte del progetto.

Figura 2

Anno 2010. New nanotechnology and biomedical approaches to improve postoperative pain treatment reducing risks related to opioids – Unità Operativa



## MINISTERO DELLA SALUTE BANDO GIOVANI RICERCATORI

Laboratorio di Endocrinologia cardiovascolare

Anno 2008. The role of vascular smooth muscle cell mineralocorticoid receptors in vascular function and disease

L'ipertensione costituisce un fattore di rischio cardiovascolare estremamente frequente e, purtroppo, molti pazienti non riescono ad essere trattati efficacemente con le attuali terapie anti-ipertensive. Per questo motivo, una migliore comprensione dei meccanismi alla base dell'ipertensione è fondamentale.

Il recettore mineralocorticoide (MR) regola la pressione arteriosa mediando le azioni dell'aldosterone a livello renale nella ritenzione del sodio.

Questo progetto ha dimostrato un ruolo diretto del recettore mineralocorticoide espresso a livello vascolare nella regolazione della reattività vascolare e della pressione arteriosa. L'attivazione di MR a livello dell'endotelio e delle cellule muscolari lisce determina inoltre l'aumento dei ROS e la ridotta disponibilità di ossido nitrico, fattori cruciali nella reattività vascolare.

E' stato dimostrato che il modello murino KO per MR a livello delle cellule muscolari lisce mostra

una riduzione della pressione arteriosa che si rende manifesta con il progredire dell'età, in assenza di alterazioni del ricambio del sodio o della struttura vasale. Ciò è causato dalla riduzione del tono miogeno dei vasi.

Questo progetto dimostra il ruolo inequivocabile di MR a livello della muscolatura liscia vasale nel controllo della pressione arteriosa e nell'invecchiamento vascolare, e apre la strada per identificare nuove terapie per la prevenzione e cura dell'ipertensione e dell'aterosclerosi.

Anno 2009. The role of endothelial mineralocorticoid receptors in vascular inflammation and atherosclerosis

In collaborazione con l'Unità di Ricerca Clinica del Gruppo GVM Care & Research and Molecular Cardiovascular Research Institute, Tufts Medical Center.

Dati recenti suggeriscono che i farmaci antagonisti dell'aldosterone determinano una diminuzione degli eventi cardiovascolari acuti mediante meccanismi non ben noti. L'aldosterone agisce attraverso il legame con il recettore mineralocorticoide (MR) che, attivato dal suo ligando, può modulare svariati processi cellulari attraverso meccanismi genomici e non-genomici. Studi effettuati dal gruppo di ricerca hanno mostrato che MR è espresso al livello vascolare e in particolare nelle cellule endoteliali dove la sua attivazione aumenta la trascrizione della molecola di adesione intercellulare 1(ICAM-1) con conseguente aumento dell'adesione leucocitaria. ICAM-1 possiede un ruolo chiave nell'adesione all'endotelio di monociti circolanti che possono trasmigrare nell'intima del vaso sanguigno e promuovere la formazione della placca aterosclerotica. Emerge quindi l'idea che l'attivazione di MR possa favorire lo sviluppo dell'aterosclerosi attivando la trascrizione di ICAM-1 e aumentandone la sua espressione con conseguente reclutamento dei monociti ai siti di lesione aterosclerotica.

Gli obiettivi principali del progetto sono i seguenti:

1. Spiegare i meccanismi molecolari attraverso cui l'attivazione dell'MR nelle cellule endoteliali regola l'espressione di ICAM1. Mediante un'analisi bioinformatica effettuata, è emerso che nel promotore di ICAM1 sono presenti elementi di risposta per i seguenti fattori di trascrizione: MR, AP-1 e NF-kB. L'utilizzo di dominanti negativi per i fattori di trascrizione AP-1 e NF-kB ha permesso di comprendere che anch'essi sono coinvolti nella modulazione dell'attività promotoriale di ICAM1 in seguito ad attivazione dell'MR. Da questi risultati si evince che la regolazione dell'attività promotoriale di ICAM1 è molto complessa coinvolgendo diverse vie di segnale, che convergono sullo stesso bersaglio molecolare.

2. Studiare in vivo il ruolo di ICAM1 sull'infiammazione vascolare indotta dall'aldosterone e sull'aterosclerosi. Recentemente il gruppo di ricerca ha confermato che nel modello murino knock-out per ApoE, l'aldosterone aumenta i processi aterosclerotici e promuove l'infiltrato infiammatorio nella parete vasale. L'obiettivo è di quantificare le placche aterosclerotiche e la complessità delle lesioni nei topi doppi knock-out per Apo-E e ICAM1 rispetto ai topi ApoE-/- con il gene di ICAM1 intatto. Inoltre si analizza l'infiltrato macrofagico e la produzione di superossidi a livello aortico.

3. Studiare il ruolo di MR endoteliale nel promuovere l'espressione di ICAM-1, l'adesione leucocitaria alle cellule endoteliali e l'aterosclerosi. Grazie alla collaborazione con l'unità operativa straniera, è stato recentemente generato un topo KO per MR limitatamente all'endotelio.

Obiettivo 1: Il laboratorio ha già identificato l'elemento di risposta minimo necessario per la risposta all'aldosterone nel promotore di ICAM1 umano. Mediante un'analisi bioinformatica effettuata dal gruppo di ricerca, è emerso che nel promotore di ICAM1 sono presenti elementi di risposta per i seguenti fattori di trascrizione: MR, AP-1 e NF-kB. L'utilizzo di dominanti negativi per i fattori di trascrizione AP-1 e NF-kB ha permesso di comprendere che anch'essi sono coinvolti nella modulazione dell'attività promotoriale di ICAM1 in seguito ad attivazione dell'MR. Al fine di individuare le regioni regolatorie del promotore di ICAM1 responsive all'attivazione dell'MR, sono state generate diverse delezioni del promotore valutandone l'attività regolatoria nelle cel-

lule endoteliali umane dopo trasfezione e stimolo con aldosterone.

Obiettivo 2: lo studio in vivo del ruolo di ICAM1 nell'infiammazione vascolare e nell'aterosclerosi sarà condotto sul topo knock-out (KO) per ApoE, un modello animale di aterosclerosi associata a iperlipidemia. Si è iniziato a quantificare le placche aterosclerotiche e la complessità delle lesioni nei topi doppi KO per Apo-E (ApoE<sup>-/-</sup>) e ICAM1 rispetto ai topi ApoE<sup>-/-</sup> con il gene di ICAM1 intatto.

Obiettivo 3: L'unità di ricerca ha già caratterizzato l'effetto dell'inibizione dell'espressione di MR in cellule endoteliali umane, attraverso tecnica di RNA interferenti, sull'adesione leucocitaria dopo trattamento con aldosterone. A questo scopo è stato già messo a punto un protocollo ottimale per l'uso degli RNA interferenti nelle cellule endoteliali umane, e conseguentemente dimostrato che in assenza di espressione di MR l'adesione leucocitaria è inibita. Per confermare lo stesso effetto "in vivo" si è deciso di generare un topo knock-out per MR limitatamente all'endotelio, attraverso l'incrocio di un topo con MR "floxato" con un topo che esprime nelle cellule endoteliali CRE/caderina. Successivamente si incrocia questo modello murino con il topo KO per ApoE, e si studia quindi l'effetto dell'aldosterone, che è somministrato attraverso delle mini-pompe a rilascio prolungato, nel topo doppio KO/ApoE/MR e nel topo KO/ApoE con MR intatto. Si studia inoltre l'infiltrato macrofagico, l'espressione di marker infiammatori e l'estensione della placca aterosclerotica in questi modelli in vivo. Gli animali sono generati e stabulati nell'unità operativa americana, ed il tessuto aortico è raccolto dopo 4 settimane di trattamento e spedito presso il laboratorio dell'IRCCS San Raffaele per la successiva analisi tissutale. Le placche aterosclerotiche a livello della valvola aortica, dell'arco aortico e dell'aorta discendente sono quantificate attraverso colorazione oilred-O. Nelle sezioni ottenute viene studiato l'infiltrato macrofagico, oltre all'espressione di potenziali geni bersaglio dell'attivazione di MR, che includono MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 and ICAM1, attraverso immunocistochimica e QRT-PCR.

### Anno 2010. Molecular mechanisms involved in skeletal muscle repair and muscular dystrophy

Il progetto si prefigge di chiarire i meccanismi molecolari coinvolti nella riparazione del muscolo scheletrico attraverso la delineazione del ruolo di HDAC4 e MEF2 nella rigenerazione e distrofia muscolare.

Nello specifico, si intende:

- definire il ruolo di HDAC4 nella riparazione del muscolo scheletrico utilizzando un approccio genetico;
- caratterizzare il ruolo di HDAC4 nelle cellule satelliti;
- determinare il ruolo di HDAC4 nella distrofia muscolare scheletrica utilizzando un approccio genetico.

Per studiare il ruolo di HDAC4 nella rigenerazione muscolare in vivo, in primo luogo sono stati valutati i livelli della sua espressione nel muscolo scheletrico mediante real time PCR a seguito di danno muscolare indotto.

E' stata inoltre generata una linea di topi knockout (HDAC4mKO) in cui l'inattivazione di HDAC4 è guidata dal promotore muscolo specifico di miogenina, incrociando topi HDAC4<sup>fl/fl</sup> con topi Myogenin-Cre. E' stata confermata la delezione di HDAC4 in muscolo scheletrico di topi adulti HDAC4mKO mediante real time PCR.

Nel primo obiettivo ci si propone di rispondere alle seguenti domande:

1. Quale fase della rigenerazione muscolare HDAC4 influenza?
2. Quali sono i geni target e le vie molecolari modulate da HDAC4 o MEF2 nella rigenerazione del muscolo?

Per valutare in quale fase della rigenerazione HDAC4 abbia un ruolo, è stato analizzato il muscolo scheletrico a tempi differenti dopo l'infortunio indotto.

Nel secondo obiettivo, per chiarire il ruolo di HDAC4 nelle cellule satelliti, le cellule staminali muscolari, è stata generata una linea di topi in cui le cellule satelliti sono prive di HDAC4 (HDAC4<sup>fl/fl</sup>; Pax7<sup>CE Cre</sup>), incrociando i topi HDAC4<sup>fl/fl</sup> con i topi transgenici che esprimono una Cre-ricombinasi inducibile sotto il controllo del promotore di Pax7 (Pax7<sup>CE /+</sup> Cre), un marcatore delle cellule satellite. In questi topi, il gene Cre è fuso al dominio di legame del ligando del recettore degli estrogeni e la proteina risultante, CRE-ER, è limitata al citoplasma. Solo in seguito a somministrazione di tamoxifen (TMX), CRE-ER viene traslocata nel nucleo, catalizza la ricombinazione dei siti loxP nel gene di HDAC4, causando una mutazione frame shift (topi HDAC4 TMX KO). La Cre-ricombinasi è inserita all'interno dell'allele di Pax7, quindi nei topi Cre<sup>+</sup> solo 1 allele di Pax7 è espresso. A causa dell'espressione monoallelica di Pax7, negli esperimenti sono stati usati solo topi Cre<sup>+</sup>, trattati con TMX o con veicolo (come controlli). E' stata confermata la delezione di HDAC4 nelle cellule satelliti di topi HDAC4 TMX KO mediante real time PCR.

Con il secondo obiettivo ci si propone di rispondere alle seguenti domande:

1. L'assenza di HDAC4 ha un effetto sulla proliferazione e/o differenziamento delle cellule satelliti?
2. HDAC4 regola la rigenerazione muscolare in modo autocrino o paracrino?

Il terzo obiettivo si propone di determinare il ruolo di HDAC4 nella distrofia muscolare scheletrica utilizzando un approccio genetico.

A questo scopo, sono stati incrociati i topi HDAC4mKO con topi mdx, un modello murino di distrofia muscolare. Per studiare il ruolo di HDAC4 nella distrofia muscolare, in primo luogo, sono stati valutati i livelli di espressione di HDAC4 nel muscolo scheletrico mediante real time PCR.

Il terzo obiettivo si propone di rispondere alle seguenti domande:

1. L'assenza di HDAC4 influenza la progressione della distrofia muscolare nei topi mdx?
2. L'assenza di HDAC4 influenza la funzionalità muscolare dei topi mdx?
3. Quali sono i geni target e le vie molecolari modulate da HDAC4 o MEF2 nella distrofia muscolare?

E' stato riscontrato che l'espressione HDAC4 è up-regolata in vivo nel muscolo scheletrico in seguito a lesione, suggerendo un ruolo di questa proteina nella rigenerazione muscolare. E' stata confermata una riduzione significativa di espressione di HDAC4 nel muscolo scheletrico di topi HDAC4mKO rispetto ai controlli (topi HDAC4<sup>fl/fl</sup>) mediante real time PCR.

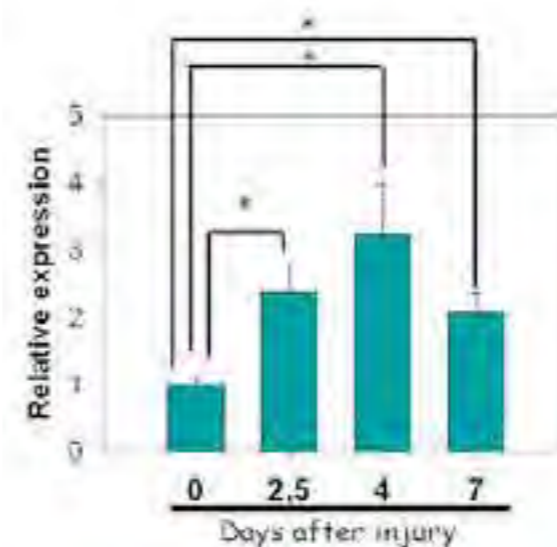


Figura 1

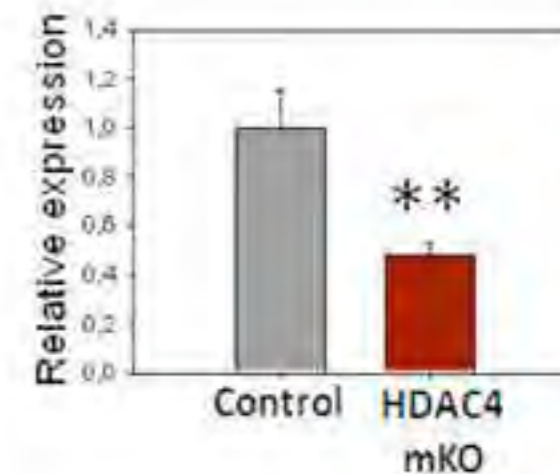
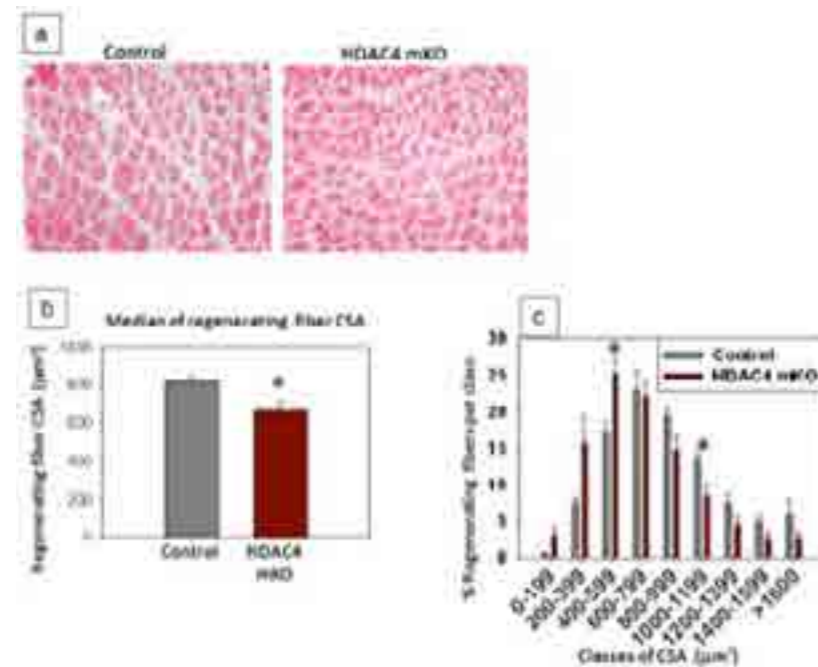


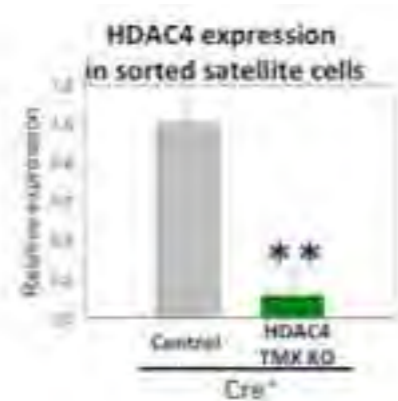
Figura 2

Per studiare il ruolo di HDAC4 nella rigenerazione muscolare, è stato indotto nel muscolo Tibialis Anterior un danno da freddo, mediante uno strumento chirurgico preraffreddato in ghiaccio secco. Contrariamente alle ipotesi, i topi HDAC4mKO hanno mostrato fibre rigeneranti, centro nucleate, più piccole rispetto ai controlli, sette giorni dopo la lesione al muscolo (Figura a). L'analisi morfometrica, effettuata misurando l'area della sezione trasversale (CSA) delle fibre rigeneranti, ha confermato che i topi HDAC4mKO hanno una riduzione significativa della mediana della CSA delle fibre rigeneranti rispetto ai controlli (Figura b) e che hanno un numero maggiore di fibre rigeneranti di dimensioni più piccole rispetto ai controlli (Figura c).

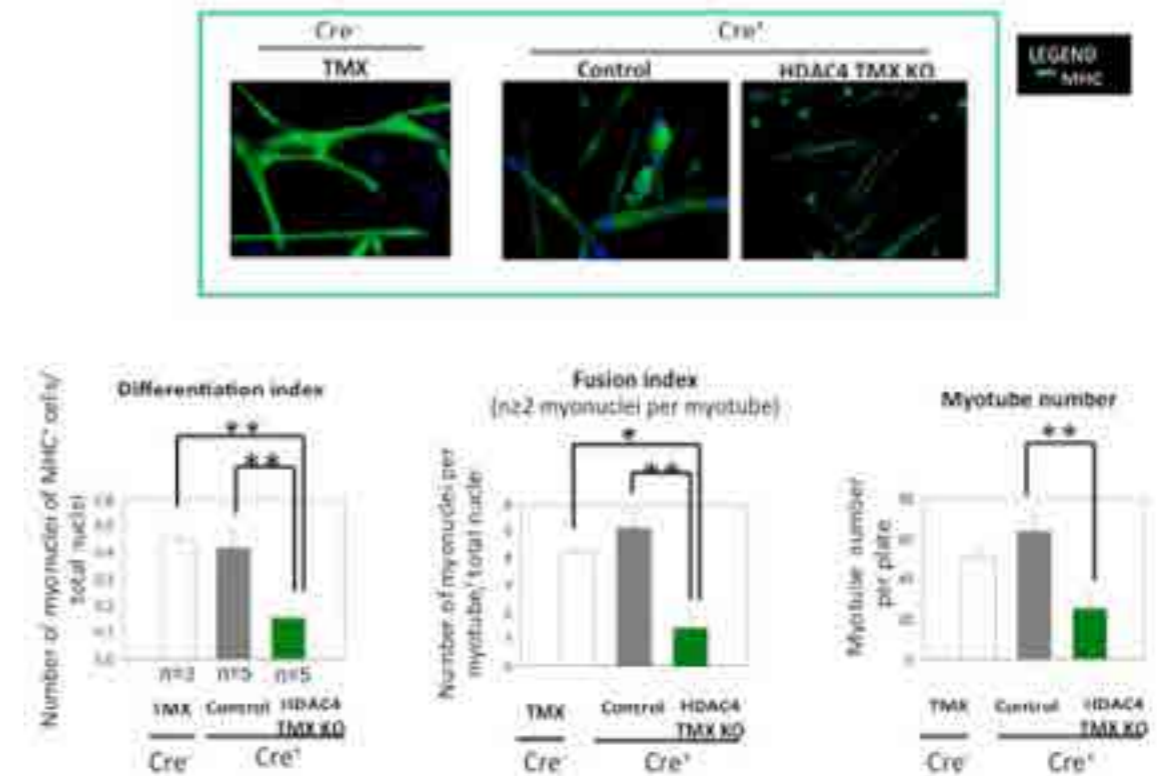


Per indagare quale fase della rigenerazione HDAC4 modula, si intende analizzare l'espressione di marcatori miogenici a tempi più precoci di rigenerazione non appena sarà disponibile un numero sufficiente di topi per gli esperimenti (almeno n = 4 controlli e n = 4 HDAC4mKO per punto). Inoltre, per capire se il deficit di rigenerazione è mantenuto a fasi successive o se i topi HDAC4mKO siano in grado di recuperare il difetto iniziale, si intende analizzare i topi a 14 giorni e ad un mese dalla lesione muscolare.

Per studiare il ruolo HDAC4 nelle cellule staminali muscolari, sono stati generati topi mancanti HDAC4 nelle cellule satelliti (topi HDAC4 TMX KO) ed è stata verificata mediante real time PCR la riduzione significativa di espressione di HDAC4 nelle cellule satelliti isolate mediante citofluorimetria a flusso (negative per Sca1, positive per alfa-7-integrin).

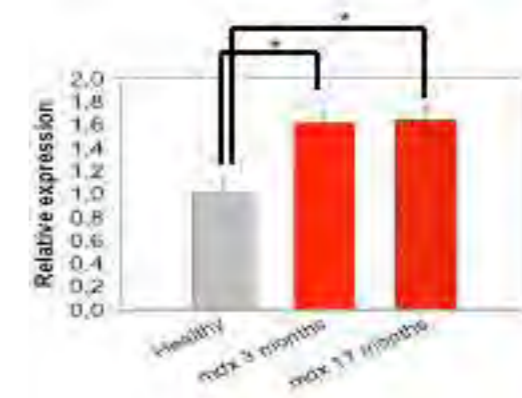


Per vedere se l'assenza di HDAC4 avesse un effetto sul differenziamento delle satelliti, sono state lasciate differenziare per 3 giorni ed è stato valutato il differenziamento mediante immunofluorescenza per un marcatore terminale miogenico, la catena pesante della miosina (MHC). Le satelliti da topi HDAC4 TMX KO mostrano una capacità di differenziamento ridotta rispetto ai controlli, valutata anche quantitativamente da conte di indice di differenziamento (numero di cellule positive per MHC rispetto al totale), indice di fusione (numero di mio nuclei per mio tubo rispetto al totale), e numero di mio tubi. Come controllo, nei primi esperimenti sono state isolate le cellule satelliti anche da topi senza gene Cre trattati con le iniezioni di TMX (Cre-TMX), per valutare eventuali effetti della TMX sul differenziamento delle cellule satelliti. Nessun significativo effetto è stato riscontrato sulle satelliti in seguito al trattamento con TMX.

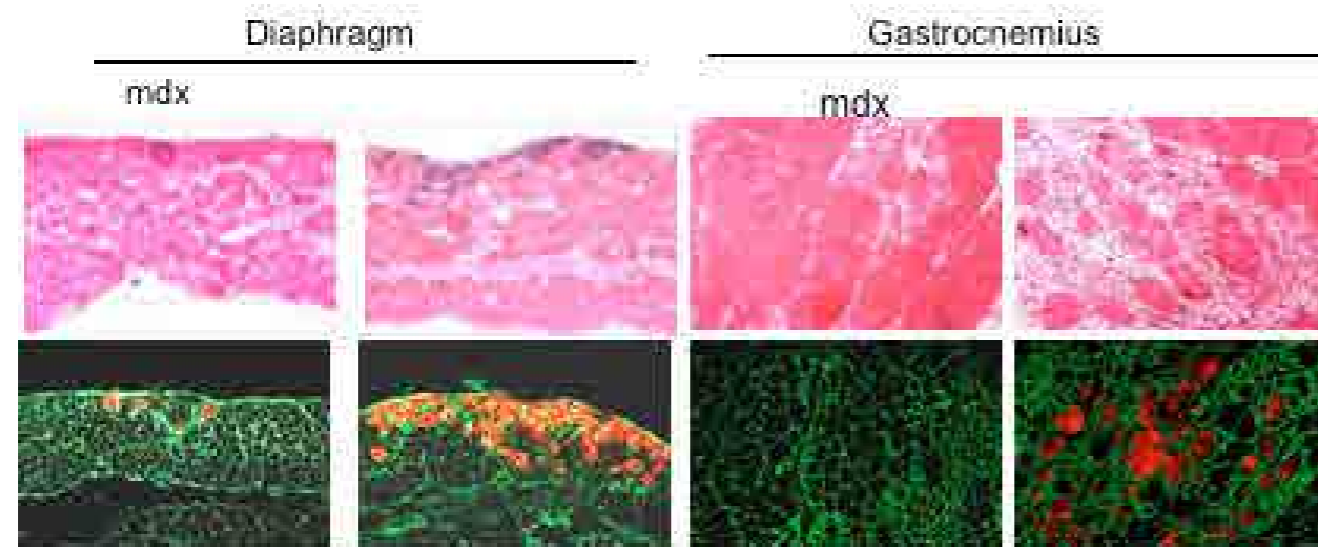


Per definire quale fase del differenziamento delle cellule satelliti HDAC4 influenzi, anche in questo caso si intende valutare l'espressione di marcatori miogenici precoci, come Pax7 e MyoD, mediante analisi di immunofluorescenza, dopo 1 giorno in terreno di differenziamento. MyoD è un marcatore di cellula satellite determinata in senso miogenico.

Prima di studiare un possibile ruolo di HDAC4 nella distrofia muscolare, è stata effettuata una analisi dell'espressione di HDAC4 nel muscolo scheletrico di topi mdx a diversi stadi della patologia mediante real time PCR ed è stato rivelato che HDAC4 è espresso a livelli maggiori rispetto a topi di controllo, suggerendo un ruolo di questa proteina in questa malattia.

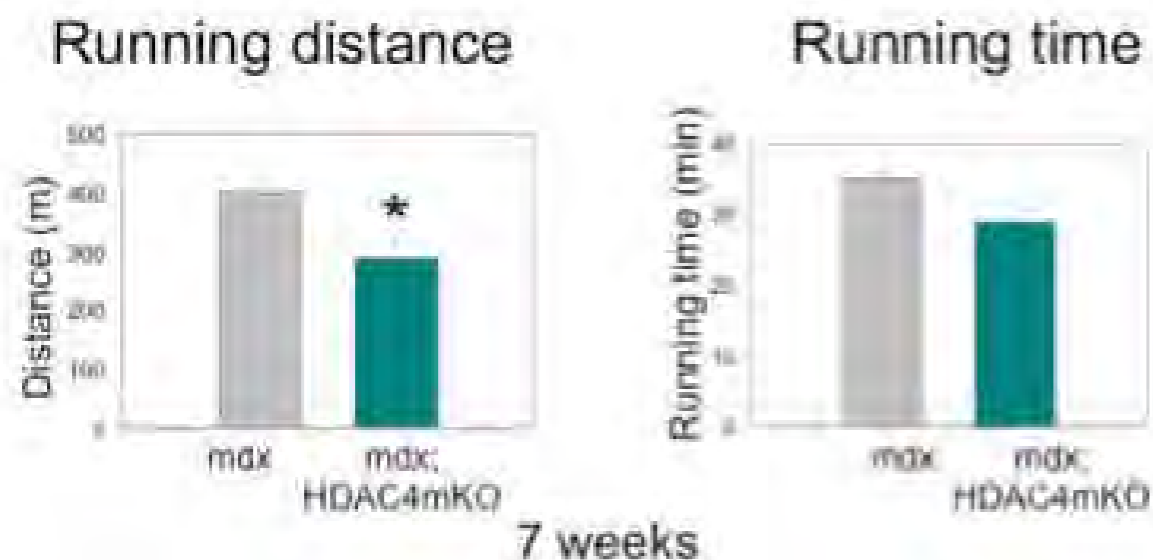


Per determinare se la mancanza di HDAC4 colpisce l'insorgenza o la progressione della distrofia muscolare, è stata analizzata l'istologia nei topi mdx e mdx HDAC4mKO di due dei muscoli scheletrici più colpiti da questa malattia, il diaframma e il gastrocnemio, in età diverse. È stata eseguita una colorazione ematossilina ed eosina per analizzare la morfologia muscolare e una colorazione delle fibre muscolari danneggiate, iniettando i topi con l'Evans Blu Dye (10 ml / g di peso corporeo di una soluzione all'1% in PBS, Sigma-Aldrich) 7 ore prima del sacrificio. A 4 settimane di età, solo il diaframma ha mostrato segni evidenti di distrofia muscolare, come la degenerazione e la rigenerazione muscolare, nei topi mdx; i topi mdx; HDAC4mKO mostrano più fibre danneggiate e muscoli con segni più evidenti di degenerazione rispetto ai topi mdx di pari età. A 7 settimane di età, la distrofia muscolare inizia ad essere evidente anche nel gastrocnemio; nuovamente, i topi mdx; HDAC4mKO mostrano un fenotipo peggiore rispetto ai topi mdx.



Il peggioramento nelle condizioni di distrofia presente a 3 e 7 settimane nei topi mdx HDAC4mKO potrebbe derivare dalla loro minore capacità di rigenerazione che invece nei topi mdx compensa il continuo danno presente.

Consistente con il fenotipo osservato, analisi funzionali di topi mdx e mdx HDAC4mKO mediante corsa su tapis roulant hanno rivelato che a 7 settimane l'assenza di HDAC4 è deleteria per la funzionalità del muscolo scheletrico dei topi mdx.



Con un numero maggiore di topi per gli esperimenti sarà possibile valutare se i topi mdx HDAC4mKO presentino muscoli degenerati e mal funzionanti a stadi più tardivi della patologia (i.e. 6 e 14 mesi di età).

Sintetizzando, HDAC4 è necessario per una corretta rigenerazione muscolare e per il differenziamento delle cellule satelliti. L'assenza di HDAC4 nel muscolo scheletrico peggiora la morfologia e la funzionalità muscolare di topi distrofici. Considerando che i farmaci che inibiscono gli HDAC sono in trial clinico per curare le distrofie muscolari, è importante divulgare e continuare gli studi per determinare quali vie molecolari siano modulate da HDAC4 nella rigenerazione muscolare. Inoltre, bisognerebbe considerare l'uso di inibitori specifici di altri membri HDAC per la cura di patologie muscolari che coinvolgono la rigenerazione.

## Area di Ricerca Neuromotoria

### Anno 2009. Capofila del progetto: Determination of variability in cardiac r-r interval on ecg is an early feature of Parkinson's disease and predicts the development of the parkinsonism classic motor

La Malattia di Parkinson (MP) 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 gestisca 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.

È possibile così verificare:

- 1) Se i familiari di primo grado dei pazienti con MP (che hanno un più alto rischio di sviluppare la malattia) abbiano una ridotta variabilità dell'intervallo R-R rispetto al gruppo di controllo.
- 2) Se la variabilità della frequenza cardiaca sia ridotta nei familiari di un sottogruppo di pazienti con MP affetti anche da anosmia e REM Behaviour 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 e 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 MP in coloro che presentano una variabilità nulla o ridotta nell'intervallo R-R.

Questo tipo di ricerca può rivoluzionare il modo di diagnosticare e trattare i pazienti con MP 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 MP e su un gruppo di controllo correlato per età e sesso.

Tutti i partecipanti, oltre all'esecuzione dell'Elettrocardiogramma di routine in collaborazione con l'Area di Ricerca Cardiovascolare, 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 MP.

Nel corso dei primi 18 mesi di studio sono state finalizzate le modalità di esecuzione dello studio, 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.

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 MP (iposmia, disturbi del sonno, stipsi, ecc). L'analisi dei dati è effettuata soltanto a fine studio.

Inoltre, sono stati screenati 168 soggetti presso il San Raffaele Cassino, che saranno studiati e trattati secondo il programma dello studio.

Finora sono stati eseguiti gli ECG dei soggetti arruolati presso il Centro Parkinson dell'IRCCS San Raffaele Pisana.

### **Anno 2011. Action observation therapy: a chance for Parkinson Disease patients of improving mobility through a home-based training** **Progetto in collaborazione con il Dipartimento di Neuroscienze dell'Università di Genova e il Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, sezione Neuroscienze Cliniche dell'Università Politecnica delle Marche.**

Nel mese di Novembre 2014 è stato avviato il progetto ed è stata predisposta la documentazione per la presentazione del progetto ai comitati etici; la stesura del protocollo valutativo e quello riabilitativo. Sono state inoltre effettuate le prime riunioni per la discussione e la scelta dei filmati più idonei per la riabilitazione dell'arto superiore e quello inferiore. Dalla discussione e dall'analisi bibliografica è stato inoltre deciso il setting sperimentale, le dosi/tempi di somministrazione, la modalità e sono stati commissionati i primi video sperimentali.

### **Anno 2009. Ricerca Finalizzata. Transcranial stimulation for inducing sleep: effectiveness of tdcS and TMS stimulation**

L'obiettivo generale di questo progetto è quello di verificare l'efficacia di tecniche non-invasive di stimolazione cerebrale finalizzate all'induzione di sincronizzazione elettroencefalografica (EEG) nell'uomo. In tal modo, l'intero progetto ha come obiettivo ultimo quello di aprire prospettive affascinanti per indurre il sonno negli esseri umani con un approccio non farmacologico. Se gli studi empirici del gruppo di ricerca condotti su volontari sani confermeranno le ipotesi, i risultati avranno un impatto diretto su molti pazienti che soffrono di disturbi del sonno e, soprattutto, sui pazienti con insonnia primaria, dal momento che una breve latenza di addormentamento costituisce un miglioramento clinicamente significativo per la maggior parte di loro.

All'interno di questa generale prospettiva, il programma prevede una serie di studi che applicano Stimolazione transcranica in Corrente Continua (tDCS) o Alternata (tACS), e Stimolazione Magnetica Transcranica (TMS) in soggetti sani per indagare gli effetti sul sonno e la vigilanza.

Nello specifico, il progetto prevede una serie di esperimenti indipendenti con l'obiettivo più specifico di dimostrare:

1. l'efficacia delle procedure di stimolazione transcranica nell'incrementare la fisiologica pressione

verso il sonno e l'attività EEG spontanea a bassa frequenza (che ne è la sua diretta espressione);

2. definire l'ampiezza delle modificazioni soggettive ed oggettive (EEG) indotte;

3. valutare il ruolo dei fattori permissivi/modulatori di questa efficacia.

Sono coinvolte nel progetto le seguenti strutture:

- Dipartimento di Psicologia, Università Sapienza Roma;

- Neuroscienze Cliniche e Neuroimmagini Funzionale, IRCCS San Raffaele Pisana;

- Dipartimento di Scienze della Salute, Università de L'Aquila.

### **Anno 2009. Neurocontrolled mechatronic prosthesis (NEMESIS). S. Micera**

Il progetto di ricerca prevede a livello nazionale la collaborazione tra: Università Cattolica di Roma, Campus Biomedico di Roma, Scuola Superiore Sant'Anna e Università degli Studi di Cagliari.

A livello internazionale il progetto è inserito nel progetto europeo TIME.

### **Anno 2010. Modulation of calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI-1) and Stromal interaction molecule 1 (STIM1) activity as a new therapeutical 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 C. Del Percio**

Il progetto di ricerca coinvolge le seguenti tre unità operative: IRCCS San Raffaele Pisana, Università di Foggia e Associazione Fatebenefratelli per la Ricerca di Roma.

Il progetto è stato sviluppato mediante un disegno sperimentale che ha compreso tre studi scientifici, i quali hanno concorso alla valutazione finale della ipotesi di lavoro.

Il primo studio ha avuto due obiettivi. Il primo obiettivo era quello di identificare le sorgenti corticali dei ritmi EEG (nella condizione di riposo a occhi chiusi) che fossero correlate con biomarcatori della progressione dell'AD, quali l'ipometabolismo dei neuroni corticali, rivelato da indici FDG-PET, e la neurodegenerazione corticale, rivelata da indici di MRI. Il secondo obiettivo era quello di

identificare le sorgenti corticali dei ritmi EEG nella condizione di riposo a occhi chiusi che fossero in grado di classificare singoli soggetti AD rispetto a singoli soggetti sani. La valutazione è stata effettuata in gruppi di soggetti Nold, MCI e AD. I risultati hanno mostrato che: (1) le sorgenti corticali dei ritmi alfa 1 nella regione occipitale correlavano con la neurodegenerazione del lobo occipitale nei soggetti Nold, MCI ed AD; (2) le sorgenti corticali dei ritmi delta globali correlavano con l'ipometabolismo corticale globale nei soggetti AD; (3) il rapporto tra le sorgenti corticali delta e alfa 1 nelle regioni parieto-occipitali permetteva una moderata classificazione (sensibilità: 77.2%, specificità: 65%, una accuratezza: 71.2%; area sotto la curva ROC: 0.75) dei soggetti AD rispetto ai soggetti Nold. Questi biomarcatori EEG sono stati usati come "end point" per la valutazione dell'effetto della stimolazione audio-visiva a 10 Hz nei soggetti MCI e AD.

Il secondo studio ha valutato le sorgenti corticali dei ritmi EEG nella condizione di riposo a occhi chiusi che fossero anormali nei soggetti Stroke nella fase sub-acuta (30-60 giorni dall'evento). La valutazione è stata effettuata in gruppi di soggetti Nold, MCI e Stroke. I risultati hanno mostrato che rispetto ai soggetti Nold, i soggetti Stroke mostravano un'ampiezza anormale delle sorgenti corticali dei ritmi EEG nella banda delta, alfa 1 e alfa 2. Inoltre i soggetti Stroke erano caratterizzati da un'ampiezza anormale delle sorgenti corticali dei ritmi alfa 2 rispetto a soggetti MCI con pari stato cognitivo globale valutato tramite la scala MMSE. Questi risultati suggeriscono l'utilizzo delle sorgenti corticali dei ritmi delta ed alfa come "end point" per la valutazione dell'effetto della stimolazione audio-visiva a 10 Hz nei soggetti Stroke.

Il terzo studio ha, finalmente, valutato la "prova del concetto" che un programma di stimolazione audio-visiva a 10 Hz di 20 minuti al giorno, per 20 giorni, fosse in grado (i) di modulare "end point" quali le sorgenti corticali delta ed alfa dei ritmi EEG a riposo a occhi chiusi e (ii) di migliorare le prestazioni cognitive e motorie in gruppi di soggetti AD, MCI e/o Stroke. I risultati hanno mostrato che il programma di stimolazione audio-visiva a 10 Hz aumentava l'attività delle sorgenti corticali alfa dei ritmi EEG in soggetti MCI e Stroke, tendendo a mitigare la riduzione di ampiezza di tali sorgenti corticali che si osserva in quelle condizioni patologiche. Questo effetto benefico sulle sorgenti corticali alfa era maggiore di quello osservato dopo procedure di controllo quali un analogo programma di stimolazione audio-visiva a 15 Hz e programmi di esercizi fisici e psicofisici della stessa durata. Va notato che alla fine del programma di stimolazione audio-visiva a 10 Hz si osservava anche un lieve miglioramento delle prestazioni cognitive e motorie sia nei soggetti MCI sia in quelli Stroke.

In conclusione, i risultati del presente progetto forniscono una prima importante evidenza dell'effetto positivo di un programma di stimolazione audio-visiva a 10 Hz nei pazienti MCI e Stroke, incoraggiando lo sviluppo di uno studio finale di cross-validazione prima dell'uso clinico di questa procedura, del tutto gratuita e innocua, per mitigare il deterioramento dei meccanismi neurofisiologici oscillatori alla base delle fluttuazioni dell'arousal corticale e della vigilanza dovute alle suddette condizioni patologiche.

Prodotti della ricerca:

- Definizione e verifica sperimentale di una nuova riabilitazione cognitiva denominata stimolazione audio-visiva a 10 Hz. Tale riabilitazione consiste in un programma di stimolazione con semplici stimoli audio-visivi. Si tratta di stimoli luminosi e sonori, non sgradevoli, presentati alla frequenza di 10 Hz. Questi stimoli sono stati presentati mediante un comune computer, dotato di cuffie o auricolari. È possibile scegliere il livello di luminosità dello schermo e di volume dei suoni.
- Generazione di un database esteso di dati clinici, psicofisici, FDG-PET e MRI come anche di dati EEG registrati in condizioni veglia rilassata a occhi chiusi in soggetti Nold, MCI, AD, Stroke. Parte del database EEG si riferisce ad una condizione precedente e successiva a programmi di intervento volti a mitigare il deficit cognitivo in pazienti MCI, AD e Stroke. Il database rappresenta la prima evidenza e prova del concetto degli effetti positivi della stimolazione audio-visiva a 10 Hz su marker EEG e prestazioni cognitive in pazienti MCI e Stroke.

## Ricerca Traslazionale

### 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. F. Limana**

### LABORATORIO DI BIOCHIMICA DELL'INVECCHIAMENTO

#### BANDO GIOVANI RICERCATORI 2008

**Study of the role of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in neuronal homeostasis and its implication in Parkinson's disease etiopathogenesis. G. Filomeni**

L'S-nitrosilazione è una modificazione post-traduzionale che si basa sull'attacco dell'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 nitrico (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-nitrosogluthione reductasi (GSNOR).

Gli obiettivi di questo progetto di ricerca sono:

1. Caratterizzare il ruolo dell'enzima GSNOR 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 particola-

re è stato 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 e 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) 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 (es. 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 dominio catalitico e 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 voluta in ultimo verificare l'esistenza di un'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.