

## Linea di ricerca 1: Strategie Diagnostiche Innovative

### Titolo

**Studi clinici, molecolari e funzionali per lo sviluppo o l'ottimizzazione di nuovi approcci di diagnosi e cura**

### Coordinatori

Professor Roberto Ravazzolo, Dottor Luigi Varesio

### Descrizione del progetto (Generalità e obiettivi)

Il principio ispiratore di questa linea di ricerca è lo studio dei meccanismi patogenetici di malattia come base per il trasferimento alla clinica in termini di sviluppo di nuove metodologie diagnostiche e nuove strategie terapeutiche. Queste ricerche seguono diversi approcci nell'ambito delle Unità incluse nella Linea di Ricerca e trovano applicazione nelle seguenti tematiche:

- utilizzazione delle nuove tecnologie di sequenziamento per lo sviluppo di test genetici per geni responsabili di patologie ereditarie;
- nuove tecnologie di sequenziamento per lo sviluppo di metodi molecolari per la diagnostica di patologie virali e batteriche nell'ambito del controllo delle infezioni nosocomiali;
- nuove tecnologie per la messa a punto di screening diagnostici di anomalie cromosomiche in gravidanza - strategie terapeutiche per malattie genetiche e patologie tumorali.

Quest'ultima tematica è in fase particolarmente attiva per quanto riguarda gli screening molecolari e i test in vitro per identificare molecole biologiche (siRNA) e piccole molecole chimiche che intervengano a diversi livelli di meccanismi fisiopatologici. Nel caso della Fibrosi Cistica la ricerca di bersagli molecolari che possono essere implicati nel processamento e nel trasporto alla membrana della proteina CFTR indirizza verso l'impiego di siRNA mirati verso bersagli specifici. Nel caso della Fibrodisplasia Ossificante Progressiva, della Malattia di Alexander e del Neuroblastoma si eseguono screening di composti chimici rivolti a modificare l'espressione di geni di interesse per il meccanismo patogenetico e, per il Neuroblastoma in particolare, l'impiego di inibitori di chinasi ciclina-dipendenti.

### Responsabili Scientifici del Progetto

Dottoressa Angela Rita Sementa – U.O.C. Anatomia Patologica

Dottor Luigi Varesio – U.O.C. Laboratorio di Biologia Molecolare

Dottor Gino Tripodi – U.O.C. Laboratorio Analisi

Professor Roberto Ravazzolo – U.O.C. Genetica Medica

Dottoressa Mirella Filocamo – U.O.S.D. Centro di diagnostica genetica e biochimica delle Malattie Metaboliche

Professor Ezio Fulcheri - U.O.S.D. Centro di Diagnostica e Patologia feto-perinatale

Dottor Angelo Claudio Molinari – U.O.S.D. Centro di Emostasi e Trombosi

Dottor Gino Tripodi – Core Facilities

### Attività 2016

**U.O.C. Anatomia Patologica** – *Direttore: Dottoressa Angela Rita Sementa*

Le attività di ricerca comprese nel programma presentato per l'anno 2016 sono state completate o sono tuttora in corso.

In particolare, la caratterizzazione istologica e biomolecolare dei casi di tumore neuroblastico periferico afferenti alla U.O.C. nell'ambito della centralizzazione nazionale ha portato, nel corso del 2016, alla raccolta di dati su oltre 134 nuovi pazienti, ed è prevedibile che entro la fine dell'anno i casi centralizzati e indagati raggiungano circa il 95% dei casi diagnosticati sul territorio nazionale. Queste attività hanno consentito di ampliare il pannello di indagini immunoistochimiche allestite a scopo diagnostico e prognostico; sono state inoltre validate le indagini immunoistochimiche correlate, quali nuovi markers di possibile aggressività biologica o risposta ai nuovi protocolli di trattamento su pazienti selezionati (segnatamente lo studio della amplificazione del gene ALK e le indagini di espressione delle proteine MYCN e c-MYC, correlate alla possibile individuazione di pazienti a rischio prognostico particolarmente grave, nell'ambito della definizione di un protocollo cosiddetto "ultra-high risk"). Lo Studio della malattia residua minima in pazienti affetti da neuroblastoma (all'esordio e in varie fasi di malattia), mediante indagine immunocitochimica con anticorpo anti-GD2 su campioni di aspirato midollare, sangue periferico e raccolte aferetiche ha ulteriormente arricchito lo studio cooperativo internazionale sulla malattia residua minima nel NB, di cui la casistica italiana costituisce l'apporto più numeroso e qualitativo. L'indagine ha fornito dati importanti per la definizione di linee guida internazionali sulla valutazione della malattia residua minima in pazienti affetti da NB su aspirati midollari e su biopsie osteo-midollari, in corso di validazione. Lo studio di correlazione istologica fra biopsie all'esordio e aspetti istologici della chirurgia differita di tumori neuroblastici periferici afferenti al Protocollo Unresectable (2001 - 2006) è tuttora in corso.

***U.O.C. Laboratorio di Biologia Molecolare – Direttore: Dottor Luigi Varesio***

Abbiamo caratterizzato il ruolo del microambiente ipossico nella polarizzazione funzionale dei macrofagi umani, con l'obiettivo di definire nuovi meccanismi patogenetici e potenziali bersagli terapeutici. Abbiamo identificato il recettore immunoregolatorio TREM-1 come importante regolatore della polarizzazione pro-infiammatoria dei macrofagi nel microambiente ipossico e potenziale bersaglio terapeutico per il trattamento dell'Artrite Idiopatica Giovanile (AIG).

Abbiamo utilizzato un modello animale, da noi generato, della Glicogenosi 1a epatica per studiare le alterazioni del fegato, tra cui lo sviluppo e la caratterizzazione di adenomi e carcinomi epatici con tecniche di risonanza magnetica, immunoistochimica e proteomica. Stiamo caratterizzando un nuovo modello animale inducibile per la Glicogenosi 1b da noi generato. Stiamo studiando le caratteristiche e la funzionalità dei neutrofili che nei pazienti con questa malattia hanno un'attività molto compromessa.

Abbiamo studiato l'utilizzo di biopsie liquide nella prognosi del neuroblastoma in uno studio Europeo multicentrico. Abbiamo identificato dei microRNA presenti negli esosomi circolanti nel plasma dei pazienti la cui espressione si associa con la resistenza/suscettibilità al trattamento farmacologico. Una pipeline dedicata allo studio dei microRNA circolanti è stata specificamente disegnata per sviluppare questo progetto ed analizzare i risultati.

Lo studio dei micro RNA esosomali è stato esteso alla caratterizzazione di plasma e liquido sinoviale isolati da pazienti affetti da AIG, di plasma di pazienti affetti da glicogenosi 1a e di modelli murini in cui si può seguire la progressione delle complicazioni epatiche in seguito all'insorgenza della glicogenosi. In collaborazione con unità pediatriche italiane, abbiamo raccolto 83 campioni di plasma da pazienti con Glicogenosi 1a per l'analisi di espressione dei microRNA, presenti negli esosomi. I dati ottenuti dal plasma dei topi e i dati ottenuti dall'analisi proteomica e immunoistochimica dei fegati murini ci permetterà di valutare la presenza di marcatori associati alla degenerazione epatica e alle complicanze a lungo termine causate da questa malattia.

***U.O.C. Laboratorio Analisi – Direttore: Dottor Gino Tripodi***

***"Identificazione di nuovi marker molecolari con impatto diagnostico e clinico"***

Nel corso del 2016, il personale del Laboratorio Centrale di Analisi dell'Istituto G. Gaslini ha svolto l'attività di ricerca iniziata negli anni passati.

I campi su cui la ricerca si è focalizzata sono stati principalmente la diagnostica microbiologica, lo studio di nuovi biomarcatori e i dosaggi dei range terapeutici di farmaci rilevanti in pediatria, con particolare attenzione alla identificazione eziologica e al trattamento delle malattie infettive.

Per quanto riguarda il dosaggio di farmaci nei liquidi biologici è stata sviluppata e validata una nuova metodica per la quantificazione su campione di sangue raccolto su dried spot (da una singola goccia di sangue intero) mediante cromatografia/spettrometria tandem massa applicata a numerosi antibiotici in uso in istituto (piperacillin, tazobactam, meropenem, ceftazidime, linezolid) e in particolare ne è stata dimostrata l'efficacia nel monitoraggio dei dosaggi terapeutici nei pazienti in trattamento. È stato validato il dosaggio della caffeina utilizzando il medesimo setting. Sono state elaborate e pubblicate le curve di riferimento (stratificate per età nel setting pediatrico) relativo a nuovi analiti inseriti in diagnostica (es. C telopeptide del collagene di tipo I).

È stato completato lo studio delle resistenze dei batteri gram- nelle infezioni delle vie urinarie che ha descritto l'epidemiologia del fenomeno all'interno del nostro Istituto.

Per quanto riguarda la medicina molecolare, le metodiche di Next Generation Sequencing per sviluppare e validare una procedura per la rapida identificazione di cluster responsabili di infezioni nosocomiali ad altissima risoluzione già validate per MRSA e Klebsiella pneumonia sono state estese ai ceppi di Klebsiella oxytoca e Acinetobacter baumannii. L'analisi dell'intero genoma batterico ha permesso di identificare geni e/o mutazioni che conferiscono resistenza agli antibiotici e determinano la virulenza dei ceppi studiati.

Le stesse metodiche sono state messe a punto per lo studio del microbiota intestinale per il quale abbiamo iniziato la valutazione dei pattern normali e patologici.

L'analisi di markers genetici protettivi in pazienti infettati da HIV ma in grado di controllare long-term lo sviluppo della malattia ha permesso di identificare il ruolo cruciale delle molecole attivatorie KIRs e di HLA-C2 nei pazienti Elite Controller (ma non nei long-term nonprogressor) dimostrando per la prima volta un ruolo delle cellule Natural Killer nel controllo della viremia HIV-1 (dati preliminari).

***U.O.C. Genetica Medica – Direttore: Professor Roberto Ravazzolo***

L'attività scientifica dell'U.O.C. Genetica Medica è stata principalmente diretta allo studio di malattie genetiche rare, allo scopo di approfondire il ruolo dei geni mutati e i relativi meccanismi fisiopatologici, e di individuare strategie terapeutiche. Una parte della ricerca sul tema delle malattie genetiche rare è volta a mettere a punto nuove metodologie diagnostiche e, in particolare, quelle che utilizzano il sequenziamento di nuova generazione (NGS). Questi nuovi approcci di diagnostica sono stati studiati e in parte realizzati grazie alla collaborazione con gruppi interni al Gaslini.

I risultati ottenuti nel 2016, pubblicati su riviste internazionali, hanno riguardato: Fibrosi Cistica e altre malattie associate a difetti del trasporto ionico, Malattia di Hirschsprung e patologie del transito intestinale, Sindrome da ipoventilazione centrale congenita, Fibrodisplasia Ossificante Progressiva, Sindromi Autoinfiammatorie, Malattia di Alexander, Malattie neurodegenerative, Casistica di pazienti con disabilità intellettiva e sindromi associate a riarrangiamenti cromosomici. Sono proseguite le ricerche intraprese da tempo su meccanismi di base di fisiopatologia del trasporto ionico e della produzione di muco soprattutto in cellule dell'epitelio respiratorio.

L'approccio di individuare composti chimici con potenziali applicazioni terapeutiche mediante screening ad alta capacità (High Throughput), ampiamente seguito per la Fibrosi Cistica, ha trovato anche nuove applicazioni per la Fibrodisplasia Ossificante Progressiva e per il Neuroblastoma. Inoltre sono iniziate collaborazioni con alcuni gruppi all'interno del Gaslini e anche all'esterno per sviluppare nuovi saggi cellulari che permettano di applicare gli screening ad alta capacità ad altre malattie genetiche. In questo senso nel 2016 il gruppo ha acquisito una nuova apparecchiatura di analisi di immagini che si aggiungerà alle apparecchiature già operanti per potenziare le analisi High Throughput.

Le relazioni con fondazioni e associazioni di pazienti affetti da malattie rare come la Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica, FOP Italia, Associazione AISICC-Sindrome di Ondine, Associazione Italiana Sindrome di Alexander, AISP-Sindrome di Poland, sono state rafforzate e hanno portato a ottenere contributi importanti per il raggiungimento dei risultati scientifici.

***U.O.S.D. Centro di diagnostica genetica e biochimica delle Malattie Metaboliche – Direttore: Dottoressa Mirella Filocamo***

Uno dei filoni di ricerca della U.O.S.D. riguarda lo studio dei meccanismi molecolari alla base delle malattie lisosomiali e di alcuni disordini della mielina. Tale attività è interconnessa con quella della biobanca genetica, situata presso la UOSD, dove sono conservati attualmente 13.800 campioni di pazienti affetti da malattie genetiche rare.

Nel corso dell'anno sono stati valutati i dati ottenuti dall'analisi degli esomi, effettuati con tecnologia Next Generation Sequencing (NGS), di 14 campioni provenienti da pazienti con difetti della mielina, ancora in attesa di una definizione diagnostica. Tale analisi ha permesso di raggiungere la diagnosi in 6 pazienti, identificando, in 3 di essi, nuovi difetti genetici, attualmente in corso di validazione con studi funzionali.

La disponibilità nella biobanca dei campioni provenienti da un'ampia casistica, caratterizzata a livello molecolare, di pazienti affetti da malattia di Gaucher, ha consentito uno studio collaborativo che ha dimostrato l'esistenza di uno stress cronico a livello delle cellule Gaucher dovuto all'accumulo nel reticolo endoplasmatico della proteina mutata con conseguente "upregulation" dell'espressione del gene GBA1.

E' stato inoltre messa a punto la metodica MLPA per la simultanea individuazione di possibili Copy Number Variations (CNVs) e riarrangiamenti complessi, sempre nella malattia di Gaucher. Tale approccio diagnostico ha portato alla definizione molecolare di una grossa delezione e di 2 nuovi alleli ricombinanti.

Grazie all'esperienza acquisita nell'ambito degli studi di correlazione genotipo-fenotipo in ampie casistiche di pazienti con patologia lisosomiale, abbiamo partecipato alla creazione di registri pubblici di mutazioni (Leiden Open Variation *Database*, "LOVD") per i geni ARSA e PSAP (associati a leucodistrofia metacromatica) e SMPD1 (associato a Niemann Pick A e B).

Infine, nell'ambito del progetto "Telethon Network of Genetic Biobanks" (TNGB) è stata condotta un'interessante esperienza che ha coinvolto le Associazioni di pazienti nelle attività di biobanking. In particolare la stesura dell'informativa per l'espressione del consenso è nata dall'interazione tra associazioni e operatori del settore con reciproco arricchimento, poiché gli operatori hanno appreso e tenuto in considerazione necessità e punti di vista dei pazienti, e al contempo, i pazienti hanno acquisito maggiore fiducia nei servizi delle biobanche. A riprova di questo, attualmente le biobanche del TNGB hanno stipulato accordi scritti con 13 associazioni per l'utilizzo dei loro servizi.

**Le ricerche sul ruolo e la morfologia del trofoblasto intermedio villare ed extra villare** hanno necessariamente portato ad una serie di considerazioni sulla patologia dell'impianto della camera ovulare e conseguentemente sul tema dell'abortività spontanea del I trimestre.

Queste ed altre ricerche condotte negli anni passati hanno consentito di sviluppare un tema articolato che rispondesse ad una necessità di chiarimenti a livello diagnostico.

#### **Introduzione al tema di ricerca sviluppato.**

Si definisce aborto una gravidanza che termina spontaneamente prima che il feto abbia raggiunto una età gestazionale che consenta la vitalità.

Spesso si utilizza il termine aborto sia per una interruzione clinica che biochimica; le gravidanze cliniche sono quelle che hanno riscontro ultrasonografico o evidenze istologiche, mentre le gravidanze biochimiche sono più precoci e si identificano per il solo aumento del BHCG. Nella realtà la maggior parte delle interruzioni di gravidanza biochimica possono passare inosservate. Infatti le ricerche evidenziano che il reale tasso di interruzioni di gravidanze biochimiche nella popolazione generale può anche raggiungere il valore del 60%.

A seconda della ricorrenza, l'aborto spontaneo può essere definito *sporadico, ripetuto o ricorrente*.

Si parla di **aborto spontaneo sporadico** qualora si verifichi un solo episodio abortivo nel corso di tutta la vita riproduttiva della donna; si parla invece di **aborto spontaneo ripetuto** se gli episodi abortivi sono due; si parla di **aborto ricorrente** (anche *aborto spontaneo abituale*) se gli episodi sono tre o più.

Pur essendo un evento piuttosto comune, non è facile determinare l'incidenza degli aborti spontanei poiché non tutte le donne che abortiscono si rivolgono al medico e a volte neppure si rendono conto di aver abortito, visto che può facilmente essere confuso con una normale mestruazione. Viceversa può essere erroneamente considerato aborto uno stato di emorragia uterina conseguente a un periodo relativamente lungo senza mestruazioni.

Secondo alcune statistiche, comunque, il 10-30% delle gravidanze termina con un aborto spontaneo, prevalentemente nelle prime 10 settimane di gestazione.

Gli aborti spontanei, secondo quanto affermato dall'*American College of Obstetricians and Gynecologists* è la tipologia di interruzione di gravidanza più frequente. La stessa associazione riporta che gli aborti spontanei che si verificano dopo la fecondazione artificiale rappresentano circa il 50% del totale. Le percentuali di rischio per l'aborto spontaneo nelle donne in età fertile variano dal 10 al 25. Con l'aumentare dell'età aumenta anche il rischio di incorrere in un aborto spontaneo. Le donne che hanno superato i 35 anni di età hanno il 15% circa di probabilità di abortire spontaneamente; nel periodo compreso tra i 35 e i 45 anni di età il rischio aumenta considerevolmente (si va dal 20 al 35%).

Passati i 45 anni di età la percentuale di rischio arriva circa al 50%. Nel caso in cui la donna abbia già avuto un episodio di aborto spontaneo, il rischio di incorrere in un secondo episodio abortivo è di circa il 25%, una probabilità non particolarmente difforme rispetto a quella che hanno le donne che non hanno mai avuto episodi di aborto spontaneo. Se si dovessero considerare aborti propriamente detti le succitate interruzioni di gravidanza biochimiche, l'incidenza dell'aborto ripetuto arriverebbe ad un 20%. L'aborto spontaneo può essere distinto in due grandi categorie; l'aborto spontaneo precoce (ESA) e l'aborto spontaneo tardivo (LSA). Queste due categorie differiscono non solo per l'arco temporale in cui si svolgono ma anche per le cause che le determinano. Viene definito come aborto spontaneo precoce quell'aborto che si determina tra la fase di impianto e la 10° settimana concezionale, vale a dire entro la 12° settimana gestazionale (calcolata dalla data dell'ultima mestruazione); viene definito come aborto spontaneo tardivo

quello che si determina dalla 13° settimana gestazionale e la 22°, vale a dire nella quasi totalità del secondo trimestre di gestazione. Nell'aborto spontaneo tardivo infatti prevalgono nettamente le cause infettive mentre nell'aborto spontaneo precoce prevalgono le alterazioni strutturali dei villi conseguenti ad anomalie del cariotipo.

La diagnostica istopatologia dell' ESA nell'ambito della patologia della riproduzione umana è diventata oggi sempre più rilevante per una serie importante di condizioni e cause che sono radicalmente mutate nel corso degli ultimi 30 anni; sinteticamente possono essere sintetizzate in intrinseche (intendendo quelle condizioni patologiche proprie della madre e dell'embrione/feto con la sua placenta) ed estrinseche (intendendo quelle cause ambientali proprie dell'ambiente artificiale costruito dall'uomo); tra le cause intrinseche va annoverata in primis l'età materna sempre più avanzata, le dislipidemie e le malattie autoimmuni;

tra le cause estrinseche l'aumento delle radiazioni, l'inquinamento, le sostanze chimiche disperse nel suolo o impiegate dall'uomo nelle industrie di ogni tipo e natura ed in fine i farmaci assunti anche involontariamente nei cibi contaminati o sofisticati.

Sotto un profilo più strettamente antropologico e psicologico deve essere tenuta in grande considerazione il fatto che oggi si ricerca una gravidanza con le caratteristiche di una programmazione sempre più serrata, che non sembra possibile né accettabile l'insuccesso specie se reiterato, che l'impatto emotivo è oggi sempre più forte nella misura in cui l'uomo non accetta più la sconfitta della morte e della malattia.

Ogni aborto spontaneo deve dunque essere considerato come evento luttuoso capace di minare non solo l'equilibrio psicologico e comportamentale della madre ma l'armonia e l'equilibrio di tutta la copia.

Conseguentemente dalla diagnostica si attendono risposte sempre più precisi svolte a stabilire il rischio di ricorrenza dell'evento in gravidanze future ed ancora il rischio di una patologia materna latente.

### **L'approccio diagnostico**

La diagnostica dell'ESA non deve essere impostata con i criteri della Surgical Pathology bensì con un approccio ampio e globale come avviene per l'autopsia di un soggetto adulto. Si tratta dell'autopsia di un embrione con tutte le caratteristiche dell'approccio diagnostico complesso e multi specialistico che oggi richiede un moderno riscontro diagnostico. Da tale approccio diagnostico scaturirà una visione globale della patologia della gravidanza comprendendo le condizioni materne, le condizioni fetali e le caratteristiche normali o patologiche degli annessi fetali ed in primis della camera ovulare e della placenta ed ancora nel delicato rapporto di interazione con il sito di impianto deciduale.

Tale approccio "a tutto tondo" consente di effettuare diagnosi non solo speculativamente utili nella definizione della causa di aborto (post hoc) ma soprattutto utili per evidenziare eventuali patologie materne latenti, patologie ed anomalie genetiche dei genitori e condizioni ambientali estrinseche naturali o artificiali (rapporto uomo-ambiente) capaci di interferire col la formazione de sviluppo dell'embrione. Tra queste un particolare riguardo deve essere posto agli effetti teratogeni dei farmaci (farmaco sorveglianza) e degli alimenti o delle sostanze chimiche di normale impiego nella vita quotidiana.

### **Considerazioni**

Il patologo si inserisce sempre più incisivamente nella diagnostica dell'abortività e della infertilità che spesso è a questa collegata. Un differente assetto socio-antropologico ha di fatto mutato le caratteristiche della popolazione femminile degli ultimi decenni ed ancora sta determinando significativi cambiamenti nella composizione dei gruppi etnici che caratterizzano le aree urbane e rurali.

Gli aspetti più appariscenti di questo fenomeno possono essere sintetizzati nelle gravidanze cercate in età sempre più avanzate, il desiderio di una sola gravidanza molto pianificata e programmata in tempi determinati, le caratteristiche delle nuove etnie di immigrazioni con richieste e bisogni di maternità e di fecondità differenti da quelle della popolazione locale di oggi ed anche di un tempo passato.

Risulta evidente che una generica formulazione diagnostica effettuata sul prodotto abortivo non possa essere oggi considerata soddisfacente. E' peraltro altrettanto chiaro come la diagnosi corretta e puntuale ed aderente possa essere effettuata solo in condizioni ottimali e supportati da una ricchezza di notizie clinico-anamnestiche e di esami citogenetici.

Tuttavia, proprio le condizioni sopra citate e la considerazione che nel caso di aborto occasionale non c'è di fatto la possibilità di raccogliere esaustivamente le informazioni necessarie portano a considerare il problema sotto diverse angolazioni.

### **Concetti emergenti**

- La diagnostica integrata anatomo clinica con l'esame istologico del prodotto abortivo rappresenta un momento determinante nella gestione dell'abortività spontanea del primo trimestre di gestazione sia essa occasionale, ripetuta o abituale.
- La perdita del momento diagnostico determina l'impossibilità di operare in termini di cura nei confronti non solo della donna ma anche, in senso più ampio, della coppia.
- Nell'abortività spontanea, come in tutta l'attività diagnostica dell'infertilità di coppia, le indagini attuali o retrospettive sul materiale biologico raccolto si proiettano significativamente sullo stato di salute della coppia e della madre in particolare divenendo vero strumento di medicina preventiva per quelle malattie ad esordio in gravidanza (diabete ed ipertensione) che sono comunque presenti, seppure latenti o misconosciute, nella donna.
- La riduzione minimalistica o l'abolizione dell'attività diagnostica anatomo patologica si traduce in un aumento esorbitante dei costi per esami non mirati che al contrario potrebbero essere evitati a fronte di indagini specifiche ed indirizzate.

### **Risultati ottenuti:**

Pubblicazione di un capitolo relativo all'abortività spontanea del I trimestre.

**Fulcheri E., Brisigotti M.P., Resta L.. Pathological Diagnosis of Abortions**

In: Malvasi A., Tinelli A., Di Renzo G. C. (Eds.). Management and Therapy of Early Pregnancy Complications. Springer Verlag, Berlin, 2016.

### **U.O.S.D. Centro di Emostasi e Trombosi – Direttore: Dottor Angelo Claudio Molinari**

L'U.O.S.D. Centro di Emostasi e Trombosi collabora con altri centri in Italia per la ricerca sulle patologie emorragiche e trombotiche congenite ed acquisite. In particolare l'interesse è focalizzato sulle complicanze trombotiche delle cure aggressive in pediatria, sulla sperimentazioni cliniche dei nuovi anticoagulanti e dei nuovi farmaci per l'emofilia a emivita prolungata. Svolge ruolo di riferimento nazionale per le problematiche trombotiche e lo stroke pediatrico. L'attività ha consentito di approfondire le conoscenze di PK e PD di Rivaroxaban in pediatria.

### **Core Facilities – Responsabile: Dottor Gino Tripodi**

Nel laboratorio è continuato lo sviluppo di tecniche per ottimizzare Proteomica e Metabolomica, in modo da consentire in Istituto una rappresentazione integrata in più modelli biologici.

In particolare sono state sviluppate nuove tecniche di preparazione del campione, rendendo possibile la caratterizzazione di popolazioni cellulari rare, biopsie o campioni clinici poco abbondanti, si sono applicati nuovi metodi analitici, per massimizzare l'informazione e diminuire i

tempi macchina e infine sono stati implementati nuovi sistemi di analisi computazionale, per meglio caratterizzare quantitativamente le differenti espressioni proteiche e proporre nuovi modelli d'interazione in reti molecolari complesse. La piattaforma strumentale integrata per Proteomica e trasduzione del segnale è costituita da: i) **LIT-OT, Orbitrap Velos Pro** per la quantificazione ed identificazione di migliaia di proteine associate alla diagnosi/prognosi di malattie. La piattaforma consente di definire il proteotipo, quale prodotto dell'espressione di geni e della loro modulazione in seguito ad esposizione a fattori ambientali (epigenetica) e/o farmacologici. ii) **qOT-LIT, Orbitrap Fusion Tribrid** per la quantificazione di decine di migliaia di siti di fosforilazione di proteine al fine di identificare segnali di trasduzione attivi in una cellula. Tali segnali si accendono in risposta a stimoli ambientali e/o farmacologici e possono essere alterati nelle malattie, rappresentando nuovi bersagli terapeutici.

La piattaforma di Metabolomica, è costituita da iii) **qOT, Spettrometria di Massa ad Altissima Risoluzione** per la quantificazione di migliaia di metaboliti, quali prodotti finali dell'espressione genica e proteica. Tale approccio integra informazioni sui processi biologici di malattia, consentendo la valutazione di come stimoli, farmaci, stress e malattie alterino le impronte chimiche dei processi cellulari.

Nell'ambito delle collaborazioni attivate i risultati ottenuti hanno principalmente riguardato:

**Oncologia:** sono stati pubblicati dati relativi a K colon, K mammella e K prostatico analizzando le modificazioni a carico del proteosoma e dei pattern di fosforilazione.

**Immunologia:** sono stati prodotti dati significativi relativi agli effetti indotti da citochine principalmente nei meccanismi di presentazione dell'antigene via HLA di classe I nelle cellule tumorali.

**Nefrologia:** sono stati pubblicati dati relativi alle caratteristiche del proteoma urinario in condizioni fisiologiche e le sue modificazioni in corso di patologie nefrologiche infiammatorie/autoimmuni.

**Oncoematologia:** sono stati prodotti molti dati preliminari relativi allo studio del proteoma in corso di trapianto di CSE nel modello aploidentico.

**Reumatologia:** sono stati prodotti molti dati preliminari relativi allo studio del proteoma nei pazienti affetti da sindromi auto-infiammatorie sistemiche (SAID).

## Elenco pubblicazioni scientifiche (anno 2016)

Autori	Titolo	Rivista	IF Grezzo	IF Min.
Amaro A, Parodi F, Diedrich K, Angelini G, Gotz C, Viaggi S, Maric I, Coviello D, Pistillo MP, Morabito A, Mandalà M, Ghiorzo P, Visconti P, Gualco M, Anselmi L, Puzone R, Lanza F, Mosci C, Raggi F, Bosco M.C., Varesio L., Zeschnigk M, et al.	Analysis of the Expression and Single-Nucleotide Variant Frequencies of the Butyrophilin-like 2 Gene in Patients With Uveal Melanoma	Jama Ophthalmol 2016; 134: 1125-1133	4.34	3
Amico G, Grossi SM, Vijzelaar R, Lanza F, Mazzotti R, Corsolini F, Ketema M, Filocamo M.	MLPA-based approach for initial and simultaneous detection of GBA deletions and recombinant alleles in patients affected by Gaucher Disease	Mol Genet Metab 2016; 119: 329-337	3.093	2
Assereto S, Piccirillo R, Baratto S, Scudieri P, Fiorillo C, Massacesi M, Traverso M, Galletta LJV, Bruno C, Minetti C, Zara F, Gazzero E.	The ubiquitin ligase tripartite-motif-protein 32 is induced in Duchenne muscular dystrophy	Lab Invest 2016; 96: 862-871	4.202	6
Baldo C, Casareto L, Renieri A, Merla G, Garavaglia B, Goldwurm S, Pegoraro E, Moggio M, Mora M, Politano L, Sangiorgi L, Mazzotti R, Viotti V, Meloni I, Pellico MT, Barzaghi C, Wang CM, Monaco L, Filocamo M.	The alliance between genetic biobanks and patient organisations: the experience of the telethon network of genetic biobanks	Orphanet J Rare Dis 2016; 11: 142	3.29	6
Barco S, Castagnola E, Gennai I, Barbagallo L, Loy A, Tripodi G, Cangemi G.	Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry vs. commercial immunoassay for determination of vancomycin plasma concentration in children. Possible implications for everyday clinical practice	J Chemotherapy 2016; 28: 395-402	1.333	2
Borghini S, Ferrera D, Prigione I, Fiore M, Ferraris C, Mirisola V, Amaro AA, Gueli I, Zammataro L, Gattorno M, Pfeffer U, Ceccherini I.	Gene expression profile in TNF receptor-associated periodic syndrome reveals constitutively enhanced pathways and new players in the underlying inflammation	Clin Exp Rheumatol 2016; 34: S121-S128	2.495	4
Bosco MC, Raggi F, Varesio L.	Therapeutic Potential of Targeting TREM-1 in Inflammatory Diseases and Cancer	Curr Pharm Design 2016; 22: 6209-6233	3.052	6
Brennan SC, Wilkinson WJ, Tseng HE, Finney B, Monk B, Dibble H, Quilliam S, Warburton D, Galletta LJV, Kemp PJ, Riccardi D.	The extracellular calcium-sensing receptor regulates human fetal lung development via CFTR	Sci Rep-UK 2016; 6: 21975	5.228	3
Brosens E, Burns AJ, Brooks AS, Matera I, Borrego S, Ceccherini I, Tam PK, Garcia-Barcelo' MM, Thapar N, et al	Genetics of enteric neuropathies	Dev Biol 2016; 417: 198-208	3.155	3
Bruschettini M, Barco S, Romantsik O, Risso Francesco M, Gennai I, Chinae B, Ramenghi LA, Tripodi G, Cangemi G.	DBS-LC-MS/MS assay for caffeine: validation and neonatal application	Bioanalysis 2016; 8: 1893-1902	3.003	6
Cangelosi D, Pelassa S, Morini M, Conte M, Bosco MC, Eva A, Sementa AR, Varesio L.	Artificial neuronal network classifier predicts neuroblastoma patients' outcome	BMC Bioinformatics 2016; 17: 347	2.435	6
Cangemi G, Barco S, Castagnola E, Tripodi G, Favata F, D'Avolio A.	Development and validation of UHPLC-MS/MS methods for the quantification of colistin in plasma and dried plasma spots	J Pharmaceut Biomed 2016; 129: 551-557	3.169	6

Cappato S, Tonachini L, Giacomelli F, Tirone M, Galiotta LJV, Sormani M, Giovenzana A, Spinelli AE, Canciani B, Brunelli S, Ravazzolo R, Bocciardi R.	High throughput screening for modulators of ACVR1 transcription potentially applicable to the treatment of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva	Dis Model Mech 2016; 9: 685-696	4.316	6
Cappiello F, Di Grazia A, Li-Av SZ, Scali S, Ferrera L, Galiotta LJV, Pini A, Shai Y, Di YP, Mangoni ML.	Esculentin-1a-derived peptides promote clearance of P. aeruginosa internalized in cystic fibrosis bronchial cells as well as lung cells migration: Biochemical properties and a plausible mode of action	Antimicrob Agents Ch 2016; 60: 7252-7762	4.415	3
Caselli C, Cangemi G, Masotti S, Ragusa R, Gennai I, Del Ry S, Prontera C, Clerico A.	Plasma cardiac troponin I concentrations in healthy neonates, children and adolescents measured with a high sensitive immunoassay method: High sensitive troponin I in pediatric age	Clin Chim Acta 2016; 458: 68-71	2.799	6
Cesani M, Lorioli L, Grossi S, Amico Giulia, Fumagalli F, Spiga I, Filocamo M, Biffi A.	Mutation Update of ARSA and PSAP Genes Causing Metachromatic Leukodystrophy	Hum Mutat 2016; 37: 16-27	5.089	6
Covone A.E., Fiorillo C, Acquaviva M, Trucco F., Morana G., Ravazzolo R., Minetti C.	WES in a family trio suggests involvement of TECPR2 in a complex form of progressive motor neuron disease	Clin Genet 2016; 90: 182-185	3.892	6
Filosto M, Aureli M, Castellotti B, Rinaldi F, Schiumarini D, Valsecchi M, Lualdi S, Mazzotti R., Pensato V, Rota S, Gellera C, Filocamo M., Padovani A.	ASAH1 variant causing a mild SMA phenotype with no myoclonic epilepsy: a clinical, biochemical and molecular study	Eur J Hum Genet 2016; 24: 1578-1583	4.58	3
Fiorio P., Rosaia De Santis L, Cuoco Cristina, Gimelli G, Gastaldi R., Bonatti F, Ravazzolo R., Bocciardi R.	Hypogonadotropic hypogonadism in a trisomy X carrier: phenotype description and genotype correlation	Gynecol Endocrinol 2016; 32: 14-17	1.413	1
Galiotta LJV.	TMEM16 Proteins: Membrane Channels with Unusual Pores	Biophys J 2016; 111: 1821-1822	3.972	6
Gennai I, Di Iorgi N., Reggiardo G, Gatti C, Bertelli E, Allegri AE, Barco S., Maghnie M., Tripodi G., Cangemi G.	Age- and sex-matched reference curves for serum collagen type I C-telopeptides and bone alkaline phosphatase in children and adolescents: An alternative multivariate statistical analysis approach	CLIN BIOCHEM 2016; 49: 802-807	2.382	4
Gianotti A, Capurro V, Scudieri P, Galiotta LJV, Moran O, Zegarra Moran O.	Pharmacological rescue of mutant CFTR protein improves the viscoelastic properties of CF mucus	J Cyst Fibros 2016; 15: 295-301	3.853	6
Gianotti A, Ferrera L, Philp AR, Caci E., Zegarra-Moran O., Galiotta LJV., Flores CA.	Pharmacological analysis of epithelial chloride secretion mechanisms in adult murine airways	Eur J Pharmacol 2016; 781: 100-108	2.73	4
Gorrieri G, Scudieri P, Caci E, Schiavon M, Tomati V, Sirci F, Napolitano F, Carrella D, Gianotti A, Musante I, Favia M, Casavola V, Guerra L, Rea F, Ravazzolo R., Di Bernardo D, Galiotta LJV.	Goblet Cell Hyperplasia Requires High Bicarbonate Transport To Support Mucin Release	Sci Rep-UK 2016; 6: 36016	5.228	6
Griseri P., Garrone O, Lo Sardo A, Monteverde M, Rusmini M, Tonissi F, Merlano M, Bruzzi P, Lo Nigro C, Ceccherini I.	Genetic and epigenetic factors affect RET gene expression in breast cancer cell lines and influence survival in patients	Oncotarget 2016; 7: 26465-26479	5.008	6

Hegde RN, Parashuraman S, Iorio F, Ciciriello F, Capuani F, Carissimo A, Carrella D, Belcastro V, Subramanian A, Bounti L, Persico M, Carlile G, Galiotta LJV, Thomas DY, Di Bernardo D, Luini A.	Unravelling druggable signalling networks that control F508del-CFTR proteostasis	Elife 2015; 4: e10365	9.322	4
Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adihetty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Bachetti T, Ceccherini I et al.	Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)	Autophagy 2016; 12: 1-122	9.108	4
Lazzarini E, Balbi C, Altieri P, Pfeffer U, Gambini E, Canepa M, Varesio L, Bosco MC, Coviello D, Pompilio G, Brunelli C, Cancedda R, Ameri P, Bollini S.	The human amniotic fluid stem cell secretome effectively counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity	Sci Rep-UK 2016; 6: 29994	5.228	3
Li M, Corbelli A, Watanabe S, Armelloni S, Ikehata M, Parazzi V, Pignatari C, Giardino L, Mattinzoli D, Lazzari L, Puliti A, Cellesi F, Zennaro C, Messa P, Rastaldi MP.	Three-dimensional podocyte-endothelial cell co-cultures: Assembly, validation, and application to drug testing and intercellular signaling studies	Eur J Pharm Sci 2016; 86: 1-12	3.773	3
Marsili M, Ceccherini I, Di Battista C, Chiarelli F, Gattorno M, Breda L.	Neonatal-Onset Urticaria and Fever	J Pediatr-US 2016; 177: 329	3.89	6
Matera I, Rusmini M, Guo Y, Lerone M, Li J, Zhang J, Di Duca M, Nozza P, Mosconi M, Pini Prato A, Martucciello G, Barabino A, Morandi F, De Giorgio R, Stanghellini V, Ravazzolo R, Devoto M, Hakonarson H, Ceccherini I.	Variants of the ACTG2 gene correlate with degree of severity and presence of megacystis in chronic intestinal pseudo-obstruction	Eur J Hum Genet 2016; 24: 1211-1215	4.58	6
Melis D, Rossi A, Pivonello R, Del Puente A, Pivonello C, Cangemi G, Negri M, Colao A, Andria G, Parenti G.	Reduced bone mineral density in glycogen storage disease type III: evidence for a possible connection between metabolic imbalance and bone homeostasis	Bone 2016; 86: 79-85	3.736	3
Motta I, Filocamo M, Poggiali E, Stroppiano M, Dragani A, Consonni D, Barcellini W, Gaidano G, Facchini L, Specchia G, Cappellini MD.	Splenomegaly Gaucher Disease study group. - A multicentre observational study for early diagnosis of Gaucher disease in patients with Splenomegaly and/or Thrombocytopenia	Eur J Haematol 2016; 96: 352-359	2.544	2
Nieddu E, Pollarolo B, Mazzei MT, Anzaldi M, Schenone S, Pedemonte N, Galiotta LJV, Mazzei M.	Phenylhydrazones as Correctors of a Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	Arch Pharm 2016; 349: 112-123	2.043	2
Panza E, Escamilla-Honrubia JM, Marco-Marin C, Gougard N, De Michele G, Morra VB, Liguori R, Salviati L, Donati MA, Cusano R, Pippucci T, Ravazzolo R, Nemeth AH, Smithson S, Davies S, Hurst JA, Bordo D, Rubio V, Seri M.	ALDH18A1 gene mutations cause dominant spastic paraplegia SPG9: loss of function effect and plausibility of a dominant negative mechanism	Brain 2016; 139: e3	10.103	4
Pesce E, Gorrieri G, Sirci F, Napolitano F, Carrella D, Caci E, Tomati V, Zegarra-Moran O, Di Bernardo D, Galiotta LJV.	Evaluation of a systems biology approach to identify pharmacological correctors of the mutant CFTR chloride channel	J Cyst Fibros 2016; 15: 425-435	3.853	6

Petretto A, Carbotti G, Inglese E, Lavarello C, Pistillo MP, Rigo V, Croce M, Longo L, Martini S, Vacca P, Ferrini S, Fabbri M.	Proteomic analysis uncovers common effects of IFN- $\gamma$ and IL-27 on the HLA class I antigen presentation machinery in human cancer cells	Oncotarget 2016; 7: 72518-72536	5.008	6
Pierobon D, Raggi F, Cambieri I, Pelassa S, Occhipinti S, Cappello P, Novelli F, Musso T, Eva A, Castagnoli C, Varesio L, Giovarelli M, Bosco MC.	Regulation of Langerhans cell functions in a hypoxic environment	J Mol Med 2016; 94: 943-955	4.855	6
Pollock NL, Satriano L, Zegarrra-Moran O, Ford RC, Moran O.	Structure of wild type and mutant F508del CFTR: A small-angle X-ray scattering study of the protein-detergent complexes	J Struct Biol 2016; 194: 102-111	2.57	2
Romano MR, Di Menna L, Scarselli P, Mascio G, Madonna M, Notartomaso S, Puliti A, Bruno V, Battaglia G, Nicoletti F.	Type-1, but Not Type-5, Metabotropic Glutamate Receptors are Coupled to Polyphosphoinositide Hydrolysis in the Retina	Neurochem Res 2016; 41: 924-932	2.472	2
Rusmini M, Federici S, Caroli F, Grossi A, Baldi M, Obici L, Insalaco A, Tommasini A, Caorsi R, Gallo E, Olivieri AN, Marzano A, Coviello D, Ravazzolo R, Martini A, Gattorno M, Ceccherini I.	Next-generation sequencing and its initial applications for molecular diagnosis of systemic auto-inflammatory diseases	Ann Rheum Dis 2016; 75: 1550-1557	12.384	8
Scudieri P, Musante I, Gianotti A, Moran O, Galletta LJV.	Intermolecular Interactions in the TMEM16A Dimer Controlling Channel Activity	Sci Rep-UK 2016; 6: 38788	5.228	6
Stigliani M, Manniello MD, Zegarrra Moran O, Galletta LJV, Minicucci L, Casciaro R, Garofalo E, Incarnato L, Aquino RP, Del Gaudio P, Russo P.	Rheological Properties of Cystic Fibrosis Bronchial Secretion and in Vitro Drug Permeation Study: The Effect of Sodium Bicarbonate	J Aerosol Med Pulm D 2016; 29: 337-345	3.041	4
Tang CS, Gui H, Kapoor A, Kim JH, Luzon-Toro B, Pelet A, Burzynski G, Lantieri F, So MT, Berrios C, Shin HD, Fernandez RM, Le TL, Verheij JB, Matera I, Cherny SS, Nandakumar P, Cheong HS, Antinolo G, Amiel J, Seo JM, Kim DY, Oh JT, Lyonnet S, Borrego S, Ceccherini I, et al.	Trans-ethnic meta-analysis of genome-wide association studies for Hirschsprung disease	Hum Mol Genet 2016; 25: 5265-5275	5.985	3
Tassano E, Accogli A, Pavanello M, Bruno C, Capra V, Gimelli G, Cuoco C.	Interstitial 9p24.3 deletion involving only DOCK8 and KANK1 genes in two patients with non-overlapping phenotypic traits	Eur J Med Genet 2016; 59: 20-25	1.81	1
Tassano E, Janis S, Canepa A, Zanotto E, Torello Corrado, Gimelli G, Cuoco C.	Interstitial 11q24 deletion: a new case and review of the literature	J Appl Genet 2016; 57: 357-362	1.929	2
Tassano E, Severino M, Rosina S, Papa R, Tortora D, Gimelli G, Cuoco C, Picco P.	Interstitial de novo 18q22.3q23 deletion: clinical, neuroradiological and molecular characterization of a new case and review of the literature	Mol Cytogenet 2016; 9: 78	1.506	2
Tonduti D, Ardisson A, Ceccherini I, Giaccone G, Farina L, Moroni I.	Unusual presentations and intrafamilial phenotypic variability in infantile onset Alexander disease	Neurol Sci 2016; 37: 973-977	1.783	1
Ugolotti E, Larghero P, Vanni I, Bandettini R, Tripodi G, Melioli G, Di Marco E, Raso A, Biassoni R.	Whole-genome sequencing as standard practice for the analysis of clonality in outbreaks of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a paediatric setting	J Hosp Infect 2016; 93: 375-381	2.655	4

Vaccari CM, Tassano E, Torre M, Gimelli S, Divizia MT, Romanini MV, Bossi S, Musante I, Valle M, Senes F, Catena N, Bedeschi MF, Baban A, Calevo MG, Acquaviva M, Lerone M, Ravazzolo R, Puliti A.	Assessment of copy number variations in 120 patients with Poland syndrome	Bmc Med Genet 2016; 17: 89	2.094	2
Zampieri S, Filocamo M, Pianta A, Lualdi S, Gort L, Coll MJ, Sinnott R, Geberhiwot T, Bembi B, Dardis A.	SMPD1 Mutation Update: Database and Comprehensive Analysis of Published and Novel Variants	Hum Mutat 2016; 37: 139-147	5.089	6