

Volume LXIV - Nuova Serie
ANNO ACCADEMICO 2019-2020 305° DALLA FONDAZIONE

2019-2020

N. 4
Ottobre
Dicembre
2020

Atti della

Accademia

Lancisiana

*Aspicis illi...
Certe si qua mentem pingere ad...
Concilio eloquio medica quantum eminet arte
Dextera ni poterit reddere, scripta docent.*

RIVISTA MEDICO-SCIENTIFICA

www.attidellaaccademialancisiana.it
www.accademia-lancisiana.it



Periodico trimestrale

Anno Accademico 2019-2020: 305° dalla fondazione

Vol. LXIV - n. 4 – Ottobre-Dicembre 2020

Proprietà

ACCADEMIA LANCISIANA

Borgo Santo Spirito, 3

00193 Roma

lancisi@aruba.it

www.accademia-lancisiana.it

© Accademia Lancisiana

Direttore Responsabile:

Franco Salvati

Comitato Scientifico:

Laura Gasbarrone, Pierluigi Antignani, Raoul Borioni, Giovanni Minardi

Segreteria di Redazione:

Chiara Abruzzini e Valentina Carelli

Redazione

Borgo Santo Spirito, 3

00193 Roma

Telefono 06.68978137 – Fax 06.6867828

Autorizzazione Tribunale di ROMA n. 9191 del 7 maggio 1963

I diritti di traduzione, di memorizzazione elettronica, di riproduzione e di adattamento anche parziale, con qualsiasi mezzo, sono riservati per tutti i Paesi.

Ai sensi della legge n. 675 (tutela dati personali) e del GDPR UE 2016/679 si garantisce la massima riservatezza dei dati personali forniti e la possibilità di richiederne gratuitamente la rettifica o la cancellazione, o di opporsi al trattamento dei dati che riguardano, scrivendo a: Accademia Lancisiana, Borgo Santo Spirito, 3 – 00193 Roma.

INDICE

Conferenza a due voci “La complessa radiodiagnostica dei tumori rari del polmone e le sue implicazioni in ambito clinico”

13 ottobre 2020

Franco Salvati, Giovacchino Pedicelli

Aspetti epidemiologici e implicazioni medico-legali

IV-233

F. Salvati, M.L. Ripoli

I tumori rari del polmone: la diagnostica radiologica

IV-238

G. Pedicelli

Premio “Giovanni Maria Lancisi” per l’Anno Accademico 2018-2019

03 novembre 2020

Tesi di Laurea: “Studio morfologico, immunoistochimico e di espressione genica
del tessuto adiposo di soggetti obesi con e senza diagnosi di NAFLD” (Sintesi)

IV-242

G. Ciccarelli

Tesi di Laurea: “Regolazione dell’attività trascrizionale del meccano-trasduttore
YAP da parte della MAPK ERK5” (Sintesi)

IV-250

V. Consalvi

Tesi di Laurea: “Associazione della stimolazione elettrica transcranica (t-DCS)
duale alla terapia robotica dell’arto superiore in pazienti affetti da stroke cronico” (Sintesi)

IV-265

A. Cruciani

Tesi di Laurea: “Inibizione dell’Interleuchina-1 nell’infarto miocardico acuto
con soprasslivellamento del tratto ST (STEMI)” (Sintesi)

IV-274

L. Matrangolo

Tesi di Laurea: “Fattori implicati nella regolazione epigenetica dell’espressione
di Reelin nel colangiocarcinoma: analisi immunoistochimica” (Sintesi)

IV-284

G. Mazzotta

Conferenza a due voci “La complessa radiodiagnostica dei tumori rari del polmone e le sue implicazioni in ambito clinico”

13 ottobre 2020

Franco Salvati, Giovacchino Pedicelli

Aspetti epidemiologici e implicazioni medico-legali

F. Salvati, M.L. Ripoli

I tumori rari maligni del polmone rappresentano per gli Pneumologi una grande sfida: sono infatti caratterizzati da una notevole invasività e quindi da una prognosi ancor più infausta in confronto con quanto si osserva per le altre neoplasie del polmone. È da sottolineare, inoltre, un aspetto del tutto particolare dei tumori rari: hanno suggerito o addirittura rappresentato modelli da utilizzare nell'ambito della ricerca e in particolare per quanto concerne quella pneumoncologica.

Purtroppo ancora oggi i tumori rari polmonari, tranne sporadiche eccezioni, non sono adeguatamente considerati, sia a livello clinico che a livello della industria, sia quella farmaceutica che quelle biotecnologiche e ancor più in ambito di politica sanitaria.

Non sorprenderà quindi quanto, in occasione di un Congresso Internazionale del dicembre 2018, Paolo Bruzzi¹, Direttore dell'Epidemiologia Clinica dell'IRCCS del San Martino di Genova, autorevole esperto a livello internazionale nell'ambito dei tumori polmonari, ha espresso: (cito testualmente) “Vari sono i motivi (psicologici, statistici, organizzativi ed economici) che sono serviti a giustificare la disastrosa ‘sciatteria’ che ha caratterizzato sinora la ricerca clinica sui tumori rari e sui sottogruppi rari delle neoplasie classiche: ne è conseguita, pur considerando la estrema difficoltà di progettare studi randomizzati di adeguate

dimensioni, una completa anarchia metodologica”.

In termini epidemiologici infatti la dimensione casistica di questi tumori risulta estremamente ridotta. Dalla ricerca personalmente eseguita (su Pub Med principalmente) sono emersi i seguenti dati: nell'arco di tempo di 49 anni in letteratura sono state riportate 44 neoplasie rare maligne primitive del polmone 24 delle quali sono state riportate da AA orientali e 20 da AA occidentali (5 italiani) ma non erano citati né il caso di blastoma riportato nel 2007 da Cutrera et al, né il caso osservato al Forlanini da Storniello et al. nel 1969, di liposarcoma, all'epoca il settimo dei casi in letteratura.

Per dare un'idea di questa assai ristretta dimensione statistica a solo titolo esemplificativo cito soltanto alcuni dati: carcinomi a cellule granulose 0,4-4% di tutti i tumori primitivi del polmone, carcinomi di tipo ghiandolare salivare 0,1-0,2%, carcinoma sarcomatoide 0,3-3% (di tutti i NSCLC), melanoma primitivo polmonare 0-0,1%, meningioma: 8 casi in 50 anni. Nel *Medical Chinese Journal*, AA cinesi² descrivono di recente un caso di coriocarcinoma primitivo polmonare di loro osservazione, in un uomo di 71 anni: 30° caso riportato nelle ultime sette decadi. Quanto all'adenocarcinoma epatoide, dalle recenti review di Haninger et al³, di Grossman et al⁴, di Shi et al⁵ e di Yang

et al⁶ ne risultano mediamente 30 casi negli ultimi 35 anni.

Per quanto concerne le implicazioni cliniche, la prima è legata alla fase diagnostica e quindi in ultima analisi agli Anatomico-Pathologi, ai quali va riconosciuta la centralità in questa fase: questi lamentano il fatto che i clinici forniscano loro, il più delle volte, soltanto informazioni del tutto generiche sul caso in esame, sottolineando questo limite con l'espressione "scarsa informatività clinica".

Si deve peraltro considerare che la rarità delle neoplasie polmonari maligne è tale che anche secondo gli Epidemiologi necessiterebbe di un più ampio "intuito clinico" a riguardo anche perché, potendosi richiamare all'ormai eccezionale pratica del riscontro diagnostico "post-mortem", sottolineano che, i dati disponibili in proposito certificano che il riscontro fornisce evidenze del tutto inattese in ben oltre il 30% dei casi sottoposti al tavolo anatomico: e dobbiamo forse ammettere allora con gli Epidemiologi che comunque la cultura dei tumori maligni rari rimane ancora non sufficientemente adeguata.

Ho fatto all'inizio un particolare riferimento ai tumori polmonari rari in età pediatrica e a riguardo ho preso atto con soddisfazione che, in una recentissima pubblicazione Renato Cutrera⁷, Direttore Broncopneumologo dell'IRCCS Bambino Gesù, ha sostenuto che tra le "criticità" della Pneumologia pediatrica debbono essere considerate le problematiche relative alle "malattie respiratorie rare" tra cui quella neoplastica, richiamandosi verisimilmente alla sovraccitata sua personale esperienza: Cutrera ha poi criticato il fatto che assai spesso questa tematica non è inclusa tra le offerte formative agli studenti di Medicina, tanto più che, a prescindere dal fattore età, risulta ormai ineludibile l'esigenza di uno specifico approfondimento multidisciplinare, che va

affrontato con convinto criterio interdisciplinare.

Per trattare della prevenzione di questi tumori rari polmonari e del relativo ruolo dell'Oncogenetica, della Citogenetica, della Proteomica e delle altre numerose problematiche, peraltro in continua evoluzione⁸, è da auspicare che ci sia altra specifica occasione in questa prestigiosa sede accademica.

Per la mia parte di questa Conferenza a due voci mi sono proposto anche di affrontare in particolare la principale implicazione pratica che essa comporta quale è considerata ormai la implicazione relativa alla Medicina Difensiva. Sempre più frequenti in merito sono le vertenze processuali, che arrivano sino alla Corte di Cassazione. Dalle relative, numerose, sentenze è emerso che il fatto che una neoplasia rara è molto più difficile da diagnosticare rispetto alle altre neoplasie (quale che sia l'organo colpito) non costituisce motivo per giustificare l'errore dei medici coinvolti nell'errore stesso, inteso come ritardo diagnostico e quindi escludere la loro colpa, sia essa frutto di imperizia o di imprudenza o di negligenza, con relative, sempre più abituali conseguenze di ordine medico-legale. Il più recente caso che ho rilevato in letteratura⁹ (lo cito soprattutto avendo sottolineato precedentemente la maggiore incidenza in età pediatrica) riguarda invece un adulto assai anziano, età 91 anni, che presentava anamnesticamente emoftoe e tosse (persistente da ben oltre un mese!) e senza alcun riferimento nella sua storia ad eventuali esposizioni occupazionali: la vertenza medico-legale era insorta in quanto la neoplasia polmonare era stata diagnosticata come "mesotelioma", mentre al riscontro istopatologico post-mortem era risultato che si trattava di una delle rare forme di NSCLC adenocarcinoma broncogeno primitivo pseudo-mesoteliomatoso. Ovviamente veniva chiamata in causa la patologia da lavoro: asbesto sì, asbesto no?

Gli aspetti medico-legali non si limitano comunque alla colpa medica ma si estendono oltre che all'ambito del lavoro, anche all'ambito sociosanitario, per quanto concerne, ad esempio, i rimborsi per spese sostenute per trasferimenti all'estero in strutture specificamente dedicate a questo tipo di patologia rara.

Si affermava⁴ appena qualche anno addietro come il principale problema "pratico" che anche i tumori rari del polmone comportano fosse rappresentato non soltanto dalla difficoltà di giungere alla diagnosi ma anche dalla difficoltà di reperire specialisti e Centri specificamente dedicati ai tumori rari: veniva chiamata in causa la ancora scarsa informazione in proposito e si attribuiva la difficile gestione della malattia alla bassa incidenza di queste neoplasie rare (ricordo i dati epidemiologici che ho citato all'inizio, relativi ad alcuni tumori polmonari rari) con il conseguente purtroppo scarso interesse non solo dell'Industria farmaceutica a sostenere studi e ricerche in questo settore, ma anche al fatto che il Ministero della Salute non si dedicasse con il necessario effettivo impegno ad investire allo scopo sufficienti risorse, verisimilmente per il fatto, peraltro non dichiarato, che questa patologia riguardava soltanto una piccola quota di persone, implicitamente non considerandole nella loro specificità di portatori di malattia rara a prognosi marcatamente infausta.

Ma attualmente, a distanza di oltre un decennio, sono stati realizzati progressi concreti?

Per una oggettiva risposta a questo interrogativo voglio richiamarmi a una fonte autorevole internazionale¹⁰, quella del Dipartimento "Diagnostic Imaging" del Royal London Hospital: "è pur vero che quasi sempre la diagnosi dei tumori primitivi maligni rari del polmone viene formulata retrospettivamente, ma è altrettanto vero che i Clinici dovrebbero sempre e maggiormente tenersi all'erta in presenza di sintomi

respiratori vari (in particolare in presenza di tosse persistente da oltre un mese, talora addirittura da 4 anni), sintomi presi finalmente in considerazione soltanto allorché accentuatisi nell'ultimo mese; essi dovrebbero sì sollecitare i colleghi radiologi a interpretare con ancor più minuziosa attenzione il contesto delle immagini da loro acquisite, ma soprattutto a discutere con spirito interdisciplinare gli aspetti peculiari del singolo caso insieme agli specialisti di organo". In tema di progressi concreti e dell'interrogativo sopra espresso è peraltro doveroso sottolineare che già nel 2002 l'altrettanto autorevole Epidemiologo La Vecchia¹¹ aveva prospettato come inderogabile l'identica esigenza, rimasta comunque sostanzialmente inevasa. È mia modesta opinione pertanto che sia del tutto condivisibile la sollecitazione da parte degli Epidemiologi clinici particolarmente dedicati a questa rara patologia polmonare: acquisire una maggiore cultura in proposito e stimolare quanto più possibile quello che loro definiscono, forse un po' provocatoriamente, il nostro intuito clinico.

Concludo con quanto affermato in proposito da Guido Rindi¹², Anatomo-patologo dell'Università di Parma. "La diagnosi finale costituirà comunque la risultante di un processo intellettuale unico. È ragionevole pensare che solo con un lavoro cooperativo marcatamente interdisciplinare di gruppi (nel nostro caso Radiologi, Pneumologi, Anatomo-Patologi, ecc.) orientati a un comune obiettivo conoscitivo si potranno dare risposte cliniche ai pazienti portatori di tumori rari", come il rarissimo caso da Rindi stesso osservato: carcinoma a cellule aciniche del polmone, una delle rarissime varianti del NSCLC adenocarcinoma, peraltro, puntualizza Rindi, nel 1972 descritta per la prima volta da Fercher e della quale sono riportati in letteratura solo 9 casi.

Infine, richiamandosi alla già citata rarità del meningioma primitivo polmonare, è di

notevole interesse il caso del tutto particolare osservato recentemente dagli Pneumologi degli Ospedali Riuniti di Ancona¹³: uomo di 84 anni affetto da Fibrosi Polmonare Idiopatica (IPF) da molti anni e da loro regolarmente monitorato. Al follow-up del 2019 viene evidenziato e documentato meningioma primitivo polmonare, evento che costituisce rarità nella rarità in pazienti con IPF. Questa osservazione ha dato lo spunto a ipotesi

patogenetiche che hanno chiamato in causa, in quanto comuni alle due diverse patologie dello stesso Apparato, pathways molecolari varie, tra cui alterazioni genetiche ed epigenetiche, ritardata apoptosi, riduzione delle comunicazioni intercellulari, attivazioni anomale delle vie di trasduzione intracellulari del segnale, oltre a amplificazioni e translocazioni.

ELENCO DEI 44 TIPI DI TUMORI RARI MALIGNI

Adenocarcinoma epatoide primitivo	Adenocarcinoma fetale del polmone
Adenocarcinoma fetale "well differentiated"	Adenocarcinoma polmonare a cellule chiare
Adenocarcinoma pseudomesoteliosomatoso	Adenocarcinoma pseudomesoteliosomatoso rabdoide
Amartoma leiomiomatoso polmonare	Angiosarcoma primitivo polmonare
Blastoma polmonare maligno in children	Carcinoma adeno-cistico primitivo polmonare
Carcinoma epitelial-mioepiteliale polmonare	Carcinoma muco-epidermoidale del polmone
Carcinoma polmonare "giant cell"	Carcinoma polmonare primitivo "signet-ring cell"
Carcinoma polmonare sarcomatoide	Carcinoma polmonare "spindle cells"
Carcinoma squamoso acantolitico	Chemodectoma polmonare in child
Chorocarcinoma polmonare	Emoangiendotelioma epitelioide polmonare
Emoangiopericitoma primitivo polmonare	Ependimoma primitivo polmonare maligno
Fibroistiocitoma maligno	Granular cell tumor, fenotipo maligno
Istiocitoma primitivo polmonare "giant-cell"	Istiocitoma polmonare primitivo fibro-angiomatoide
Leiomiosarcoma polmonare primitivo	Malignant glomus tumor polmonare
Malignant tritons tumor of the lung	MALT linfoma polmonare primitivo
Melanoma maligno primitivo polmonare	Meningioma atipico polmonare
NUT midline carcinoma primitivo del polmone	Paraganglioma pneumomediastinico polmonare
Plasmocitoma polmonare primitivo	Pulmonary blastoma
Pulmonary granular cell tumor	Rabdomiosarcoma embrionale polmonare
Sarcoma sinoviale primitivo del polmone	Schwannoma polmonare
Schwannoma polmonare primitivo melanotico	Tumore neuroectodermico primitivo del polmone
Tumore polmonare muconodularpapillare ciliato	Tumore primitivo "salivary gland-type"

BIBLIOGRAFIA

1. Bruzzi P. La sovranità dell'incertezza. www.forward.recenti progressi.it
2. Ma Y, Wang C, Sun PL, et al. A case of male primary pulmonary choriocarcinoma. *Chin Med J* 2018; 131: 3001-3.
3. Haninger DM, Kloecker GH, Bousamra M, Nowacki MR, Slone SP. Hepatoid adenocarcinoma of the lung: report of five cases and review of the literature. *Mod Pathol* 2014; 27: 535-42.
4. Grossman K, Beasley MB, Braman SS. Hepatoid adenocarcinoma of the lung: review of a rare form of lung cancer. *Respir Med* 2016; 119: 175-9.
5. Shi YF, Lu JG, Yang QM, et al. Primary hepatoid adenocarcinoma of the lung in Yungui Plateau, China: a case report. *World J Clin Cases* 2019; 7: 1711-6.
6. Yang K, Jiang H, Li QL. Primary pulmonary hepatoid adenocarcinoma: a case report and review of the literature. *Medicine* 2019; 98: 14/e5043.
7. Di Cicco ME, Cutrera R. Il Libro Bianco della FIARPED: le criticità della Pneumologia Pediatrica. *Pneumorama* 2019; 95: 34-7.
8. Scopsi L, Frontini L, Clemente C. Tumori rari. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 2002.
9. Kennedy JM. The forensic significance of pseudomesotheliomatous adenocarcinoma of the lung. *Forensic Sci Med Pathol* 2019; 15: 458-62.
10. La Vecchia C. I tumori rari: alcuni concetti epidemiologici. In Scopsi L, Frontini L, Clemente C. Tumori rari. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 2002.
11. Rindi G. L'anatomia patologica e i tumori rari. In Scopsi L, Frontini L, Clemente C. Tumori rari. Roma: Il Pensiero Scientifico Editore, 2002.
12. Cirilli L, Bonifazi M. Meningioma anaplastico primitivo del polmone in corso di IPF: case report. Simposio "Advanced IPF Research", AIR Roche Meeting Italia 2019.

Prof. Franco Salvati, Primario Emerito
Pneumologia, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma

Dott.ssa Maria Letizia Ripoli, Avvocato, Roma

Per la corrispondenza:

francosalvati.1930@libero.it;

m.letiziaripoli@gmail.com

I tumori rari del polmone: la diagnostica radiologica

G. Pedicelli

Il concetto di “tumori rari” viene espresso con varie definizioni a seconda dei punti di vista e, soprattutto, del concetto che s’intende fare emergere. Seppure generica, a nostro parere resta la più equilibrata la definizione espressa dall’AIRC (Associazione Italiana Ricerca Cancro): “si definiscono tumori rari tutte quelle neoplasie che, pur molto diverse fra loro, sono accomunate dalla scarsa incidenza”.

Dal punto di vista della diagnostica per immagini si possono definire rare le neoplasie polmonari che si presentano con configurazioni fortemente equivoche o addirittura fuorvianti ai fini diagnostici. Con l’uso delle tecnologie più attuali e delle metodologie più appropriate di elaborazione delle immagini, l’imaging ha catturato e coltivato, negli ultimi tempi, modelli di configurazione tanto caratteristici da consentire l’individuazione di rari aspetti anatomo-radiologici nel contesto di lesioni neoplastiche considerate comuni o di rare forme neoplastiche di aspetto bizzarro, sia dal punto di vista radiologico che istologico.

Citiamo, ad esempio: il “*bubble-like sign*” costituito da bronchiolo-ectasie acute maligne nel contesto di un’area di consolidazione alveolare morfologicamente compatibile con lesione di natura flogistica; il “*tree-in-bud*” maligno costituito da diffusione angio-centrica di micronoduli maligni; il “silenzio vascolare” che caratterizza eventi neoplastici del tutto inattesi: ad esempio neoplasie che nascono e si sviluppano da tessuti e cellule particolari quali il sistema linfatico non capsulato (BALT) e le cellule di Kulchitsky .

Nella pratica clinica s’incontrano eventi rari il cui start può essere suggerito da aspetti di semeiotica radiologica elementare quale il “silenzio vascolare” riferito a strutture

vascolari di vario calibro, anche clamorose, come la mancanza di un ramo principale dell’arteria polmonare, “amputata” da un rarissimo tumore primitivo del vaso quale l’angiosarcoma, senza rispetto per l’età giovanile. Ma, al di là di eventi clinici rari, sarà opportuno trattare in modo sistematico alcune neoplasie primitive rare del polmone.

Iniziamo con una forma di cancro polmonare identificato specificamente negli ultimi anni e attualmente battezzato come “*cancro polmonare cistico*”. La sua frequenza è valutata dalla letteratura attuale in circa l’1-3,7% dei NSCLC. Esso rappresenta circa il 22% dei cancri polmonari ignorati nei programmi mondiali di screening del cancro polmonare¹: il frequente ritardo diagnostico di questo tipo di cancro è fortunatamente mitigato dalla sua lenta evoluzione.

All’attuale inquadramento di questa particolare neoplasia si arriva dopo diversi tentativi effettuati da alcuni gruppi di studio negli ultimi 15 anni: nel 2006 uno studio giapponese² descrive accuratamente casi di carcinoma broncogeno associati a formazioni bollose di aspetto cistico e frequentemente complicate da processi flogistici; un lavoro italiano del 2015³ descrive con cura, su 24 pazienti, le correlazioni di cancri polmonari associati a “spazi cistici”, con proposte di classificazione in base ai rapporti anatomo-patologici fra cisti e lesioni maligne; nell’anno successivo Rampinelli⁴ descrive sommariamente l’esordio di un cancro polmonare cistico fra le possibili configurazioni precoci di un cancro polmonare; nel 2019 un ampio studio cinese⁵ che coinvolgeva 4 grandi ospedali con osservazione temporale estesa a 7 anni e una casistica di 106 pazienti, esprimeva l’attuale interpretazione patogenetica di questa particolare forma di cancro polmonare, ponendo al centro l’ostruzione bronchiolare

associata ad un lento sviluppo di tessuto fibroso/neoplastico maligno e progressivo sviluppo di cisti con meccanismo a valvola.

Dalla nostra esperienza riferiamo su 3 casi che a nostro parere appaiono emblematici.

Il primo di essi si riferisce ad un uomo di 65 anni, forte fumatore afflitto da tosse cronica: 20 mesi prima aveva effettuato una HRCT del torace che aveva evidenziato un gruppetto di “cisti semplici” nel lobo superiore di sinistra. Alla nostra osservazione HRCT quelle “cisti semplici” si presentavano moderatamente aumentate di volume, pareti irregolarmente ispessite con configurazioni nodulari nel contesto. La PET, eseguita in sequenza, dava risultato negativo. Il paziente veniva sottoposto a lobectomia superiore sinistra nel sospetto di lesione maligna. Il reperto istologico eseguito sul pezzo operatorio confermava la diagnosi di “carcinoma adenosquamoso del polmone.” Questa diagnosi istologica si rivela particolarmente interessante perché testimone di una doppia rarità della lesione: rarità istologica dell’adenocarcinoma squamoso [1-2% dei cancri polmonari]⁶ nel contesto di una configurazione macroscopica di “cancro polmonare cistico”.

Il secondo caso si riferisce ad una giovane signora non fumatrice di anni 38 che presenta un’alterazione multi-cistica appena percepibile sulla radiografia del torace, in sede retroclaveare sinistra. L’esame HRCT conferma una configurazione cistica polilobata con pareti festonate di spessore moderato, pulite, con formazioni nodulari nel contesto. L’esame istologico eseguito su pezzo operatorio a seguito di lobectomia superiore di sinistra, conferma la diagnosi radiologica di “cancro cistico del polmone”.

Il terzo caso ha una storia più complessa. Si tratta di una signora di nazionalità indiana, di 65 anni che tre anni prima era stata studiata con HRCT per la presenza, nel segmento esterno del lobo medio, di un’area

di densità mista, del diametro di circa 5 cm., la cui struttura evocava l’ipotesi diagnostica di adenomatosi cistica congenita. Monitorata nel tempo, a distanza di tre anni la lesione descritta assumeva in modo convincente la configurazione HRCT di una probabile lesione maligna con i caratteri morfologici del “cancro polmonare cistico”: l’intervento di lobectomia (lobo medio) confermava istologicamente il sospetto diagnostico.

La seconda tipologia di tumori rari del polmone che trattiamo si riferisce alle rare *neoplasie che si sviluppano nelle strutture linfatiche non capsulate*, ovvero più specificamente quelle strutture linfatiche associate ai bronchioli intralobulari definite dall’acronimo **BALT** (Bronchial Associated Lymphoid Tissue). L’aggregato linfoide o sistema BALT si sviluppa nel soggetto adulto sano, tipicamente nel fumatore. Esso è abitualmente assente nel bambino e nell’adulto di età avanzata. È costituito da aggregati o “isole discontinue” di aggregati linfoidi adiacenti alle pareti dei bronchioli intralobulari che realizzano una sorta di “stazione di sorveglianza e di pronto intervento” a seguito di stimoli antigenici di varia natura. L’aggregato è ricco di linfociti B-T e plasmacellule, localizzati nella sottomucosa; coesistono cellule dendritiche di sorveglianza adiacenti, indovate fra le cellule epiteliali e la mucosa bronchiale, pronte a dare l’allarme qualora si avvicinasero degli intrusi. Quando questo accade le cellule dendritiche allarmano tutte le cellule di sorveglianza, principalmente i linfociti B che si moltiplicano rapidamente ed in parte si trasformano esse stesse in plasmacellule che entrano direttamente in battaglia inglobando e distruggendo elementi antigenici. Quando la battaglia diventa cronica per il persistere della causa (ad esempio il fumo), possono formarsi aggregati di grandi dimensioni, veri tumori estesi e ben documentabili con le metodologie radiologiche, definiti **baltomi**, generalmente benigni: vere, rare neoplasie assimilabili al linfoma non-Hodgkin a basso

grado di malignità. In rari casi si presentano bilaterali.

Altre volte il BALT può esprimersi macroscopicamente con la configurazione di iperplasia nodulare linfoide multipla o ramificata, assumendo un'identità di pseudo-linfoma anche di grosse dimensioni, lobulato, con broncogramma aereo nel contesto.

Il **MALT** (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*) è un aggregato linfoide di configurazione nodulare derivante dalla proliferazione monoclonale di cellule B con la compartecipazione di cellule T, plasmacellule, rari macrofagi e cellule dendritiche: il tutto nel contesto del BALT preesistente. Negli aggregati MALT si può sviluppare il MALT-linfoma, precisamente lungo la zona marginale dell'aggregato di cellule B. Il MALT-linfoma si può presentare sotto forma nodulare in aggregati singoli ma più spesso si configura come aggregati multipli e confluenti, mono-bilaterali, di estensione anche pluri-lobare. Dal punto di vista radiologico è caratteristico il broncogramma aereo che attraversa formazioni nodulari o masse anche di grosse dimensioni. È abbastanza frequente la coesistenza di noduli-masse parenchimali unitamente ad infiltrati di polmonite interstiziale linfoide (LIP), in un quadro generale complesso.

I **carcinoidi polmonari**, i più noti fra i tumori rari del polmone secondo i dati statistici recenti, costituiscono circa l'1% di tutti i tumori polmonari.

Essi rappresentano un gruppo eterogeneo di tumori neuro-endocrini che vanno da indolenti noduli benigni a forme aggressive metastatizzanti. Benché i termini "**carcinoide**" e "**tumore neuro-endocrino**" in ambito polmonare vengano spesso usati come sinonimi, va sottolineato che non tutti i tumori neuro-endocrini del polmone sono carcinoidi. Più precisamente, i tumori neuro-endocrini polmonari, che si sviluppano dalle cellule di Kulchitsky normalmente nella mucosa bronchiale, comprendono:

- a. il carcinoide tipico/atipico caratterizzato da un grado di malignità medio-basso;
- b. il carcinoide a grandi cellule caratterizzato da malignità elevata;
- c. il carcinoma a piccole cellule caratterizzato da malignità elevata.

Il **carcinoide** polmonare è frequentemente (85% dei casi) **centrale o tipico**. Esso si presenta generalmente con una configurazione sferica-ovale, raramente multi-nodulare.

Il suo accrescimento è lento, generalmente asintomatico. La scarsa sintomatologia è per lo più correlata con le alterazioni funzionali-meccaniche dovute ad ostruzione bronchiale (riduzione ipossica della vascolarità polmonare, bronchiectasie, flogosi ostruttive). Sono rare le linfadenopatie reattive o metastatiche. La valutazione dell'attività biologica mediante PET può risultare negativa o debolmente positiva. Tuttavia le forme periferiche, generalmente correlate con **carcinoide atipico**, possono presentarsi con tutte le caratteristiche di tumore maligno: accrescimento veloce, PET positiva con SUV elevato, reperto di metastasi linfonodali ilo-mediastiniche. Il carcinoide atipico può presentarsi fin dall'esordio diagnostico sotto forma di massa polmonare periferica accompagnata da noduli satelliti di significato ripetitivo. Meno frequenti sono le osservazioni di prima diagnosi con metastasi polmonari ilo-mediastiniche o a carico di altri organi (fegato, surreni).

Conclusioni

Dalla breve descrizione dei principali tumori rari del polmone crediamo di poter trarre alcune conclusioni:

- l'attuale semeiotica radiologica, specialmente quella correlata con gli esami HRCT, può far sospettare la natura maligna di una lesione apparentemente

innocente in base a preziosi segni specifici (*bubble-like sign, tree-in bud maligno*);

- non raramente la diagnosi radiologica di tumore polmonare, specie se in fase di sviluppo precoce, è correlata con reperto casuale;
- rispetto alle classificazioni consolidate del passato si è aggiunta recentemente una configurazione particolare di neoplasia costituita dal “tumore cistico del polmone”, una rarità clinico-radiologica che mostra un volto e una presentazione clinica sufficientemente caratteristiche;
- le strutture linfatiche non capsulate del polmone costituiscono una fonte, nel contempo insidiosa e affascinante, di neoplasie rare ben diagnosticabili e curabili.

BIBLIOGRAFIA

1. Scholten ET, Horeweg N, de Koning HJ, et al. Computed tomographic characteristics of interval and post screen carcinomas in lung cancer screening. *European Radiology* 2015; 25: 81-8.
2. Maki D, Takahashi M, Murata K, Sawai S, Fujino S, Inoue S. Computed tomography appearances of bronchogenic carcinoma associated with bullous lung disease. *J Comput Assist Tomogr* 2006; 30: 447-52.
3. Mascalchi M, Attinà D, Bertelli E, et al. Lung cancer associated with cystic airspaces. *J Comput Assist Tomogr* 2015; 39: 102-8.
4. Rampinelli C, Calloni SF, Minotti M, Bellomi M. Spectrum of early lung cancer presentation in low-dose screening CT: a pictorial review. *Insights Imaging* 2016; 7: 449-59.
5. Yang Tan, Jie Gao, Chongchong Wu, et al. Characteristics and Pathologic Basis of Solitary Cystic Lung Cancer. *Radiology* 2019; 291: 495-501.
6. Yu JQ, Yang ZG, Austin JHM, Guo YK, Zhang SF. Adenosquamous carcinoma of the lung: CT-pathological correlation. *Clin Radiol* 2005; 60: 364-9.

Prof. Giovacchino Pedicelli, Primario Emerito Radiologia, A.O. San Camillo-Forlanini, Roma

Per la corrispondenza:
giopedicelli@gmail.com

Premio Giovanni Maria Lancisi per l'Anno Accademico
2018-2019

03 novembre 2020

Tesi di Laurea: "Studio morfologico, immunoistochimico e di espressione genica del tessuto adiposo di soggetti obesi con e senza diagnosi di NAFLD" (Sintesi)

Autore: G. Ciccarelli

Relatore: M.G. Cavallo

Correlatore: F. A. Cimini

Introduzione

La steatosi epatica non-alcol correlata è una condizione clinico-patologica caratterizzata da accumulo di grasso nelle cellule parenchimali del fegato; essa comprende un ampio spettro di quadri istologici quali la steatosi, la steatoepatite (NASH, Non-Alcolic Steatohepatitis) e la cirrosi^{1, 2}. I meccanismi fisiopatologici alla base dello sviluppo e della progressione della NAFLD sono complessi e non ancora completamente chiariti. Negli ultimi anni è stata sempre più avvalorata la teoria della "multiple parallel hits hypothesis"³. Secondo questa teoria, l'accumulo iniziale di trigliceridi nel fegato (*first hit*) renderebbe l'organo più sensibile a diversi altri fattori, responsabili, quindi, dell'infiammazione e del danno epatico³. Dati sperimentali suggeriscono che, tra questi fattori, l'infiammazione e la conseguente disfunzione del tessuto adiposo (TA) possano svolgere un ruolo cruciale^{4, 5}. L'infiammazione del TA è una condizione patologica complessa, dovuta ad eccessivo introito calorico e al conseguente accumulo di acidi grassi. Le caratteristiche anatomopatologiche riscontrate in questa condizione sono l'ipertrofia degli adipociti, le alterazioni del compartimento stromale, l'infiltrazione macrofagica, l'espressione di citochine pro-infiammatorie, l'ipossia e la morte adipocitaria, l'eccessiva deposizione di

collagene⁶⁻⁹. Queste modificazioni conducono ad una riduzione progressiva della funzionalità dell'organo e provocano l'instaurarsi di uno stato pro-infiammatorio sistemico¹⁰⁻¹². Inoltre, l'evoluzione dell'infiammazione del TA verso la fibrosi limita la capacità dell'organo di immagazzinare lipidi e causa un aumento degli acidi grassi liberi in circolo, promuovendo così l'accumulo di questi in organi ectopici, come il fegato^{4, 5, 13, 14}. Per questo motivo sembra che il TA disfunzionale possa rappresentare il *primum movens* per lo sviluppo della steatosi epatica non alcolica (NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease) e possa anche promuoverne l'evoluzione. In particolare, questa associazione è stata dimostrata da Duval e collaboratori che hanno studiato lo sviluppo di NAFLD in topi sottoposti ad una dieta ipercalorica per 21 settimane. Nei modelli murini, alla diagnosi di NAFLD si associavano alterazioni morfologiche del TA epididimale, come le cosiddette "crown-like structures" costituite da adipociti atrofici circondati da cellule infiammatorie¹⁵.

Sulla base di queste premesse, lo scopo di questo studio è stato quello di indagare le alterazioni morfologiche, immunoistochimiche e di espressione genica del TA in relazione alla presenza di NAFLD in soggetti adulti obesi.

Materiali e metodi

Popolazione

Per questo studio sono stati reclutati 40 soggetti obesi tra quelli afferenti presso il Day Hospital di Endocrinologia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, per eseguire le valutazioni cliniche precedenti all'intervento di chirurgia bariatrica.

Il protocollo di studio è stato valutato e approvato dal Comitato Etico locale e lo studio è stato condotto in conformità con le procedure delineate nella Dichiarazione di Helsinki. La firma del consenso informato da parte di tutti i partecipanti ha preceduto l'arruolamento nello studio.

Per essere eleggibili, i pazienti dovevano soddisfare i seguenti criteri di inclusione: sesso maschile o femminile, etnia caucasica, età compresa tra 18 e 65 anni, Body Mass Index (BMI) > 35 kg/m², assenza di storia attuale o passata di eccessiva assunzione di alcol definita come consumo quotidiano > 30 grammi/die nell'uomo e > 20 grammi/die nella donna, negatività sierologica per presenza di antigene di superficie dell'epatite B e anticorpi per epatite C, assenza di storia o elementi clinici compatibili con diagnosi di cirrosi epatica, insufficienza epatica cronica, insufficienza renale, scompenso cardiaco, cancro e patologie psichiatriche.

Analisi cliniche e di laboratorio

Tutti i partecipanti sono stati sottoposti a *work-up* clinico comprensivo di esame obiettivo, misurazioni antropometriche e indagini di laboratorio. Peso ed altezza sono stati misurati indossando abiti leggeri e senza scarpe. Il BMI è stato calcolato come peso in kg diviso per il quadrato dell'altezza in metri (kg/m²). La circonferenza vita (cm) è stata misurata nel punto di mezzo tra la 12a costa e la cresta iliaca. La pressione arteriosa sistemica (sistolica, PAS; diastolica, PAD; mmHg) è stata misurata dopo cinque minuti di riposo attraverso strumento elettronico

provvisto di bracciale della misura appropriata alla circonferenza del braccio del paziente, con l'arto superiore collocato all'altezza del cuore. Sono state eseguite, quindi, tre misurazioni consecutive ed è stata riportata la media della seconda e terza misurazione ai fini delle analisi statistiche.

L'intera popolazione è stata sottoposta a prelievo venoso a digiuno per la misurazione dei valori sierici di glucosio (mg/dl), emoglobina glicosilata (HbA1c, %), colesterolo totale (mg/dl), colesterolo HDL (HDL, mg/dl), trigliceridi (mg/dl), aspartato aminotransferasi (AST, IU/l) e alanina aminotransferasi (ALT, IU/l) attraverso metodiche di laboratorio standardizzate.

I livelli di colesterolo LDL (LDL, mg/dl) sono stati calcolati applicando la formula di Friedwald.

I pazienti con glicemia a digiuno <126 mg/dl sono stati sottoposti a curva da carico orale standard con 75 gr di glucosio (OGTT) e prelievi per misurazione della glicemia e dell'insulinemia ai tempi 0', 30', 60', 90', 120' minuti dall'ingestione del glucosio.

Il grado di IR e quello di secrezione insulinica sono stati stimati attraverso calcolo degli indici statici e dinamici HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance)¹⁶, HOMA-β¹⁶ e QUICKI¹⁶.

Biopsia e istologia epatica e del tessuto adiposo

Tutta la popolazione di studio si è sottoposta ad intervento di chirurgia bariatrica con procedura di *sleeve-gastrectomy*.

Durante la seduta operatoria sono state eseguite biopsia epatica e di TA viscerale. I frammenti di fegato e TA sono stati prelevati, fissati in formalina durante la notte, inclusi in paraffina ed infine sezionati. La lettura delle *slide* è stata eseguita da un unico patologo esperto *blinded* per l'identità, la storia clinica e i parametri biochimici dei pazienti.

Per il tessuto epatico, è stata richiesta una lunghezza minima del campione biotico di 15 mm o almeno la presenza di 10 spazi portali completi. Per l'istologia del fegato sono state ottenute sezioni di 3-4 μm per colorazione con Ematossilina/Eosina e tricromica di Masson. La NASH è stata diagnosticata in base ai criteri di Brunt¹⁷ ed è stato inoltre calcolato il *NAFLD activity score* (NAS).

Lo studio istochimico e la deposizione di fibre collagene nel TA sono stati eseguiti con *fast green FCF/Sirius*. L'infiltrazione macrofagica è stata quantificata attraverso valutazione immunohistochimica dell'espressione nucleare del CD68 in relazione al numero totale dei nuclei (1:100, M0876; Dako) e le modificazioni nella densità micro-vascolare con la valutazione del CD34 (clone QBEnd/10; Leyca Biosystem, Newcastle, UK). Un doppio *immunostaining* ha permesso di identificare contemporaneamente la presenza di cellule adipocitarie apoptotiche (TUNEL assay) sul totale degli adipociti (Perilipin, ab3526; Abcam). Le cellule apoptotiche sono state identificate con kit *Apoptag plus peroxidase In Situ Apoptosis Detection* (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Le biopsie di TA sono state poi classificate in base alla presenza e severità di danno infiammatorio, consistente in infiltrazione e attivazione macrofagica, apoptosi adipocitaria e fibrosi. Per approfondire lo studio dell'infiammazione nel TA sono state eseguite specifiche colorazioni immunohistochimiche con anticorpi vs Neutrin-1 (1:200, AF1109; R&D Systems), Caveolin-1 (1:500, 610059; BD Biosciences), UNC5B (1:200, ab54430; Abcam), IL-8 (1:100, LS-B2809, LS Bio IL-1b), MIP-1 α (1:150, clone 3E1, LS-C174781, LS Bio), MIP-2 (1:100, aa34-107, LS-C294368, LS Bio) e TIMP1 (1:100, aa157-188IHC-plus, LS-B10535, LS Bio).

Biologia molecolare

Nel TA è stata inoltre valutata l'espressione mRNA di un ampio pattern di molecole immuno-infiammatorie (WISP1, GrB, Neutrin1, UNC5B, Caveolin1, IL8, MIP-1 α , MIP-2, TIMP1, Caspase3, Caspase7, PARP1, HIF-1 α).

Analisi statistica

Tutte le analisi sono state eseguite impiegando il software statistico SPSS versione 23. I valori sono riportati nel testo e nelle tabelle come media \pm deviazione standard (SD) per le variabili continue e come percentuale per le variabili categoriche. I confronti tra due gruppi sono stati eseguiti attraverso l'impiego del test T di Student per le variabili continue e test χ^2 per le variabili categoriche. Le variabili non distribuite normalmente sono state sottoposte a trasformazione logaritmica naturale. La significatività delle correlazioni bivariate è stata valutata attraverso calcolo del coefficiente di Spearman o attraverso correlazioni parziali aggiustate per età e sesso. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione sono riportate nella Tab. 1. Dei 40 soggetti partecipanti allo studio sottoposti a chirurgia bariatrica, il 75% è risultato affetto da NAFLD, in particolare il 50% da steatosi epatica semplice e il 25% da NASH, mentre il restante 25% non evidenziava danno epatico. Le caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione in relazione alla presenza o assenza di NAFLD sono illustrate nella Tab. 2.

I pazienti affetti da NAFLD differivano significativamente dai soggetti senza NAFLD per diversi parametri tra cui: BMI (43 ± 9.5 vs 47.3 ± 5.4 kg/m^2 , $p=0.02$), trigliceridi (133.1 ± 44.6 vs 96.9 ± 22.3 mg/dl , $p=0.03$), glicemia (101.8 ± 17.3 vs 92.5 ± 4.1 mg/dl , $p=0.02$), HbA1c (7.4 ± 1.47 vs $5.8 \pm 0.8\%$, $p=0.004$), HOMA-IR (3.61 ± 2.1 vs 1.75 ± 0.9 , $p=0.01$), HOMA- β (170.28 ± 41.6 vs 95.98 ± 34.3 %,

p=0.02) e ALT (33 ± 15.8 vs 17 ± 38 IU/l, p=0.009). Nei soggetti con diagnosi istologica di NAFLD la prevalenza di SM era significativamente maggiore rispetto ai soggetti sani (p=0.02) (Tab. 2).

I pazienti con NAFLD presentavano inoltre una maggiore severità del danno infiammatorio del TA all'istologia rispetto alla sottopopolazione senza NAFLD. In particolare la diagnosi di NAFLD si associava ad incrementata presenza di macrofagi CD68⁺ (r=0.33, p=0.04, Fig. 1), riduzione della densità microvascolare (r=-0.42, p=0.03) e aumentata fibrosi (r=0.38, p=0.04). La NAFLD si associava anche all'espressione nel TA di numerosi marcatori di stress, infiammazione e fibrosi tissutale come UNC5B (r=0.58, p=0.02), CASP7 (r=0.4, p=0.01), HIF1- α (r=0.43, p=0.02), IL-8 (r=0.4, p=0.03), MIP2 (r=0.4, p=0.03), WISP-1 (r=0.35, p=0.04) e GrB (r=0.3, p=0.04) (Tab. 3).

Parametri	Soggetti obesi n=40
Età	43.7 ± 9.6
Sesso (M/F)	10/30
BMI (kg/m ²)	43.6 ± 5.6
Circonferenza vita (cm)	128 ± 11.4
PAS (mmHg)	128.3 ± 16.1
PAD (mmHg)	84.8 ± 18.2
Colesterolo totale (mg/dl)	200.8 ± 29
HDL-C (mg/dl)	48.3 ± 9.8
LDL-C (mg/dl)	126.3 ± 25
Trigliceridi (mg/dl)	124 ± 42.9
Glicemia (mg/dl)	98.4 ± 29.3
HbA1c (%)	6.59 ± 2.1
HOMA-IR	4.59 ± 2.9
HOMA- β %	163.69 ± 82.1
QUICKI	0.32 ± 0.11
AST (IU/l)	22.9 ± 9.8
ALT (IU/l)	28.8 ± 15.4
Sindrome metabolica (%)	80%, 32
Diabete (% , n)	15%, 6

Tab. 1: Caratteristiche cliniche e biochimiche della popolazione

Parametri	Non NAFLD (n=10)	NAFLD (n=30)	P-value
Età (anni)	44.9 ± 9.5	43 ± 9.5	0.63
Sesso (M/F)	0/10	10/20	0.058*
BMI (kg/m ²)	47.3 ± 5.4	43 ± 9.5	0.02
Circonferenza vita (cm)	128 ± 15.5	128 ± 7.7	0.99
PAS (mmHg)	129.2 ± 12	125.1 ± 11.3	0.44
PAD (mmHg)	83.3 ± 8.7	86.2 ± 22.5	0.76
Colesterolo totale (mg/dl)	213.1 ± 33	196.7 ± 27.1	0.17
HDL-C (mg/dl)	51.6 ± 8.8	47.2 ± 10	0.28
LDL-C (mg/dl)	141.7 ± 26.7	121.2 ± 22.8	0.08
Trigliceridi (mg/dl)	96.9 ± 22.3	133.1 ± 44.6	0.03
Glicemia (mg/dl)	92.5 ± 4.1	101.8 ± 17.3	0.02
HbA1c (%)	5.8 ± 0.8	7.4 ± 1.47	0.004
HOMA-IR	1.75 ± 0.9	3.61 ± 2.1	0.01
HOMA- β %	95.98 ± 34.3	170.28 ± 41.6	0.02
QUICKI	0.31 ± 0.18	0.33 ± 0.11	0.4
AST (IU/l)	18.7 ± 5.9	24.4 ± 10.5	0.07
ALT (IU/l)	17 ± 38	33 ± 15.8	0.009
Sindrome metabolica	10%, 1	53%, 16	0.02*
Diabete (% , n)	0%, 0	20%, 6	0.15*

Tab. 2: Caratteristiche cliniche e biochimiche dei pazienti in relazione alla presenza o meno di NAFLD

*Chi-Quadro (χ^2)

	Coefficiente di Spearman	p-value
Presenza di macrofagi CD68+ nel	0.33	0.04
Densità microvascolare nel TA	-0.42	0.03
Fibrosi nel TA	0.38	0.04
Espressione di UNC5B nel TA	0.58	0.02
Espressione di CASP7 nel TA	0.4	0.01
Espressione di HIF1- α nel TA	0.43	0.02
Espressione di IL-8 nel TA	0.4	0.03
Espressione di MIP-2 nel TA	0.4	0.03
Espressione di WISP-1 nel TA	0.35	0.04
Espressione di GrB nel TA	0.3	0.04

Tab. 3: Correlazioni bivariate della diagnosi istologica di NAFLD

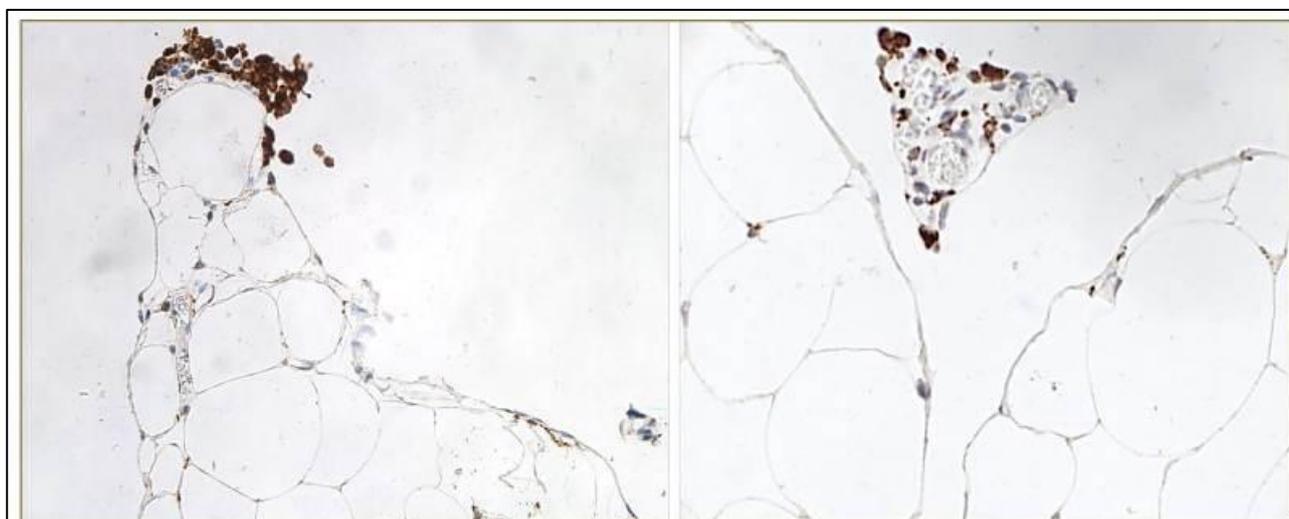


Fig. 1: Infiltrazione macrofaga CD68+ in tessuto adiposo viscerale

Discussione

Questo studio dimostra che, in soggetti obesi, la diagnosi istologica di NAFLD si associa strettamente con i parametri morfologici, immunoistochimici e di espressione genica di disfunzione del TA.

Tale associazione è stata precedentemente dimostrata in modelli murini di NAFLD il cui pannicolo adiposo epididimale presentava adipociti atrofici circondati da cellule infiammatorie, prevalentemente macrofagi, e fibrosi¹⁵. Successivamente, Du Plessis e colleghi hanno dimostrato l'associazione tra l'infiltrazione macrofagica del TA e l'espressione di geni

pro-infiammatori nel TA viscerale e sottocutaneo in soggetti con NAFLD¹⁴.

I nostri dati mostrano che la NAFLD oltre ad essere associata con un quadro morfologico caratteristico di infiammazione del TA è anche strettamente correlata con l'espressione adipocitaria di specifici marcatori di stress (CASP7, HIF1- α), infiammazione (UNC5B, IL-8, MIP2 e WISP-1) e fibrosi (GrB) del tessuto.

L'infiltrazione di macrofagi CD68⁺ nel TA dimostrava la presenza di infiammazione e disfunzione dell'organo ed è stata precedentemente associata, in modelli murini, all'infiltrazione macrofagica nel

fegato durante lo sviluppo di NAFLD, a dimostrazione della presenza di un cross-talk tra questi due organi, in corso di infiammazione^{10-12, 18, 19}. In linea con ciò, la NAFLD si associava anche all'espressione di molecole che mediano l'infiltrazione macrofagica come UNC5B e MIP2. UNC5B, infatti, stimola la ritenzione macrofagica nel TA, in risposta a neutrin-1, prodotta in condizione di aumentato accumulo di grassi^{18, 20}; MIP-2, invece, induce l'adesione endoteliale di cellule immunitarie nel TA, contribuendo all'infiammazione²¹.

La diagnosi di NAFLD si associava, poi, con l'espressione nel TA di IL-8, citochina prodotta da adipociti e cellule infiammatorie nel TA in condizione di obesità, mediatrice dell'infiammazione locale e sistemica e dell'insulino-resistenza d'organo^{22, 23}. Inoltre, per la prima volta negli uomini, abbiamo dimostrato l'espressione adipocitaria di WISP1, una nuova adipochina che inibisce la differenziazione degli adipociti e induce *pathways* infiammatori; nella nostra popolazione, la sua espressione correlava con la presenza di NAFLD^{24, 25}.

Ancora, la NAFLD si associava all'espressione di HIF-1 α , riconosciuto mediatore del segnale ipossico, e di CASP7, enzima della cascata apoptica^{26, 27}. L'ipossia partecipa alla disfunzione del TA inibendo la differenziazione degli adipociti e inducendo la polarizzazione dei macrofagi in senso pro-infiammatorio, mentre l'apoptosi riduce la riserva adipocitaria del TA, limitandone la funzionalità globale^{27, 28}. Questa condizione di ipossia e apoptosi cellulare è legata sia all'infiammazione sia all'alterata vascularizzazione del TA, che, in queste condizioni, perde la sua normale densità vascolare²⁹. Infatti, l'ipertrofia degli adipociti non è accompagnata da una parallela e funzionale vasculogenesi, probabilmente a causa di un perduto controllo nella regolazione dei fattori angiogenici e angiostatici^{27, 30}. Nella nostra analisi, una ridotta densità microvascolare, caratteristica

di un TA disfunzionale, correlava con la presenza di NAFLD.

Infine, abbiamo dimostrato, per la prima volta nell'uomo, l'espressione nel TA di GrB, una proteasi prodotta dai macrofagi infiltranti che causa morte cellulare, produzione di citochine infiammatorie, alterata permeabilità vascolare e rimodellamento della matrice extracellulare, partecipando quindi all'infiammazione e alla fibrosi del TA³¹⁻³⁴. I livelli di GrB e la fibrosi del TA, valutata allo studio istologico, correlavano tra loro e con la diagnosi di NAFLD.

In conclusione, questo studio dimostra che nei soggetti obesi esiste una stretta associazione tra diagnosi istologica di NAFLD e presenza di disfunzione del tessuto adiposo evidenziata da alterazioni morfologiche, immunoistochimiche e di espressione genica indicative di una condizione di infiammazione, ipossia e fibrosi.

Questi dati forniscono le basi per futuri studi volti ad approfondire il nesso di causalità tra la disfunzione del TA e lo sviluppo di NAFLD in soggetti obesi, ad indagare i meccanismi alla base di tale rapporto e identificare nuove strategie di prevenzione e terapia.

BIBLIOGRAFIA

1. Bhala N, Angulo P, van der Poorten D et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology* 2011; 54: 1208-16.
2. Angulo P, Lindor KD. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17 Suppl: S186-90.
3. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 2010; 52: 1836-46.
4. Park BJ, Kim YJ, Kim DH et al. Visceral adipose tissue area is an independent risk factor for hepatic steatosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: 900-7.

5. van der Poorten D, Milner KL, Hui J et al. Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 2008; 48: 449-57.
6. Spalding KL, Bernard S, Näslund E et al. Impact of fat mass and distribution on lipid turnover in human adipose tissue. *Nat Commun* 2017; 8: 15253.
7. Skurk T, Mack I, Kempf K, Kolb H, Hauner H, Herder C. Expression and secretion of RANTES (CCL5) in human adipocytes in response to immunological stimuli and hypoxia. *Horm Metab Res* 2009; 41: 183-9.
8. Giordano A, Murano I, Mondini E et al. Obese adipocytes show ultrastructural features of stressed cells and die of pyroptosis. *J Lipid Res* 2013; 54: 2423-36.
9. Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 2007; 56: 901-11.
10. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796-808.
11. Kang YE, Kim JM, Joung KH et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One* 2016; 11: e0154003.
12. Engin AB. Adipocyte-Macrophage Cross-Talk in Obesity. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 327-43.
13. Szendroedi J, Roden M. Ectopic lipids and organ function. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20: 50-6.
14. du Plessis J, van Pelt J, Korf H et al. Association of Adipose Tissue Inflammation With Histologic Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology* 2015; 149: 635-48.
15. Duval C, Thissen U, Keshtkar S et al. Adipose tissue dysfunction signals progression of hepatic steatosis towards nonalcoholic steatohepatitis in C57BL/6 mice. *Diabetes* 2010; 59: 3181-91.
16. Matsuda M, DeFronzo RA. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing: comparison with the euglycemic insulin clamp. *Diabetes Care* 1999; 22: 1462-70.
17. Brunt EM, Kleiner DE, Wilson LA, Belt P, Neuschwander-Tetri BA; NASH Clinical Research Network (CRN). Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and the histopathologic diagnosis in NAFLD: distinct clinicopathologic meanings. *Hepatology* 2011; 53: 810-20.
18. Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Ménager M et al. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity. *Nat Med* 2014; 20: 377-84.
19. Bijnen M, Josefs T, Cuijpers I et al. Adipose tissue macrophages induce hepatic neutrophil recruitment and macrophage accumulation in mice. *Gut* 2018; 67: 1317-27.
20. Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease. *J Cardiol* 2017; 69: 851-8.
21. Rouault C, Pellegrinelli V, Schilch R et al. Roles of chemokine ligand-2 (CXCL2) and neutrophils in influencing endothelial cell function and inflammation of human adipose tissue. *Endocrinology* 2013; 154: 1069-79.
22. Bruun JM, Pedersen SB, Richelsen B. Regulation of interleukin 8 production and gene expression in human adipose tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:1267-73.
23. Kobashi C, Asamizu S, Ishiki M et al. Inhibitory effect of IL-8 on insulin action in human adipocytes via MAP kinase pathway. *J Inflamm* 2009; 6:25.
24. Murahovschi V, Pivovarovova O, Ilkavets I et al. WISP1 is a novel adipokine linked to inflammation in obesity. *Diabetes* 2015; 64: 856-66.
25. Jung TW, Kang C, Goh J et al. WISP1 promotes non-alcoholic fatty liver disease and skeletal muscle insulin resistance via TLR4/JNK signaling. *J Cell Physiol* 2018; 233: 6077-87.
26. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70: 1469-80.
27. Tinahones FJ, Coín Aragüez L, Murri M et al. Caspase induction and BCL2 inhibition in human adipose tissue: a potential relationship with insulin signaling alteration. *Diabetes Care* 2013; 36: 513-21.
28. Engin A. Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Preadipocytes and Macrophages: Hypoxia Hypothesis. *Adv Exp Med Biol* 2017; 960: 305-26.
29. Moreno-Indias I, Tinahones FJ. Impaired adipose tissue expandability and lipogenic

capacities as ones of the main causes of metabolic disorders. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 970375.

30. Cao Y. Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 107-15.
31. Kim WJ, Kim H, Suk K, Lee WH. Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* 2007; 111: 57-65.
32. Buzza MS, Zamurs L, Sun J et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* 2005; 280: 23549-58.
33. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 388-400.
34. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol* 2010; 185: 1836-45.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 luglio 2019

Dott.ssa Gea Ciccarelli, Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Farmacia e Medicina, "Sapienza" Università di Roma

Prof.ssa Maria Gisella Cavallo, Ricercatore Dip. Medicina Sperimentale, "Sapienza" Università di Roma

Dott.ssa Flavia Agata Cimini, Dottoranda Dipartimento di Scienze Anatomiche Istologiche Medico Legali e dell'Apparato Locomotore, "Sapienza" Università di Roma

Per la corrispondenza:
ciccarelligea@gmail.com

Tesi di Laurea: “Regolazione dell’attività trascrizionale del mecano-trasduttore YAP da parte della MAPK ERK5” (Sintesi)

Autore: V. Consalvi

Relatore: L. Amicone

Introduzione. YAP

YAP (Yes-associated protein) è un co-fattore trascrizionale che in seguito alla risposta a diversi stimoli extracellulari, soprattutto quelli di origine meccanica, regola l’espressione di un elevato numero di geni coinvolti in diversi processi come proliferazione, differenziamento, omeostasi tissutale e mantenimento della staminalità^{1, 2}.

YAP è coinvolto nella fisiologia di molti organi e tessuti e per la sua azione positiva sulla proliferazione cellulare e per la sua attività antiapoptotica, è considerato un importante fattore pro-oncogenico. La sua overespressione, o attività costitutiva, è associata infatti a molti tumori umani^{3, 4}.

Il ruolo più studiato di YAP è quello di co-fattore trascrizionale. La sua funzione è strettamente correlata a quella di TAZ, un altro co-fattore trascrizionale ad esso paralogo, con cui interagisce formando un complesso dimerico¹.

Per poter svolgere questa funzione, il complesso YAP/TAZ, non avendo domini di legame al DNA, si lega a fattori trascrizionali, principalmente a quelli appartenenti alla famiglia TEAD¹.

Una volta avvenuta l’interazione con il fattore TEAD sul DNA, essi possono reclutare il complesso modificatore della cromatina SWI/SNF e la H3K4 metiltrasferasi NcoA6, attivando la trascrizione di diversi geni target, tra cui i più noti sono CTGF e Cry61⁵⁻⁸. YAP e TAZ presentano anche una funzione di repressione trascrizionale. Recentemente è stato visto che YAP/TAZ bloccano l’espressione di geni come DDIT4 e Trail

andando a reclutare il complesso NuRD⁹. Dati recenti indicano il gene master della Transizione Epitelio-Mesenchima (EMT) Snail ed il gene master della Transizione Mesenchima-Epitelio (MET) e differenziamento epatocitario HNF4 α , come nuovi target trascrizionali, rispettivamente positivo e negativo, di YAP¹⁰.

YAP rappresenta l’effettore finale di un’importante via molecolare di segnalazione, il pathway di Hippo, in grado di rispondere a diversi stimoli, sia di natura meccanica che biochimica, provenienti dal microambiente cellulare. Il pathway di Hippo comprende un vasto numero di proteine, la maggior parte delle quali conservata evolutivamente dalla Drosophila fino ai mammiferi¹¹. Nella cascata di eventi molecolari del pathway che portano all’attivazione di YAP, la fosforilazione e l’attivazione della Ser/Thr chinasi chiamata LATS1/2 gioca un ruolo importante. LATS1/2, infatti, è in grado di fosforilare YAP sui residui S127 e S381 favorendone il sequestro citoplasmatico oppure la degradazione proteasoma-mediata^{1, 12}. Quindi un pathway di Hippo attivo comporta l’inattivazione funzionale della proteina YAP. Invece se la chinasi LATS1/2 non viene attivata, YAP non viene fosforilata e potrà traslocare nel nucleo per svolgere la sua funzione sul DNA, grazie all’interazione con fattori trascrizionali, la maggior parte dei quali appartenenti alla famiglia TEAD¹³. Per quanto riguarda l’attivazione di LATS1/2, essa in generale è dovuta all’intervento della chinasi MST1/2 anche se si hanno sempre più evidenze di vie di attivazione alternative MST1/2 indipendenti^{14, 15}.

A questo riguardo è importante la proteina delle giunzioni baso laterali Scribble (SCRIB). La delocalizzazione di SCRIB dalla membrana e quindi una riduzione della sua attività sulle chinasi inibenti YAP/TAZ, comporta una traslocazione nucleare di questi ultimi e la conseguente attivazione di specifici profili trascrizionali^{16, 17}.

Un'altra proteina di membrana che sembra giocare un ruolo importante nel trasdurre segnali extracellulari in grado di regolare il pathway di Hippo nelle cellule epiteliali, è la Neurofibromina 2 (NF2). NF2 è un potente soppressore tumorale in grado, quando localizzata in membrana, di interagire con numerose proteine e di reclutare le chinasi LATS coordinandone l'attivazione¹⁵.

Oltre che dalle chinasi LATS1/2, YAP e TAZ possono essere inibiti da regolatori a monte del pathway di Hippo i quali li sequestrano e ne impediscono l'accesso al nucleo. Tra questi regolatori troviamo AMOT^{18, 19}, Tirosin Fosfatasi 14 (PTPN14)^{20, 21} e alfa-catenina.

Per anni si è ritenuto che il meccanismo di attivazione di YAP, per lo meno nel cancro, fosse quasi esclusivamente da attribuire allo "spegnimento" del pathway di Hippo con conseguente perdita delle funzioni delle chinasi LATS1/2 e delle fosforilazioni inattivanti^{12, 22}.

D'ogni modo una crescente letteratura dimostra che le condizioni note per presentare uno YAP attivo (es. trattamento con fattori di crescita e stimolazione meccanica o trasformazione neoplastica della cellula) siano caratterizzate da meccanismi di attivazione del co-fattore trascrizionale del tutto indipendenti dal signalling di Hippo oppure LATS1/2-dipendenti ma MST1/2-indipendenti²³⁻²⁶.

Vie di segnalazione in grado di attivare YAP in maniera Hippo o MST1/2-indipendente, sono quelle che coinvolgono le GTPasi della famiglia Rho, SRC/Yes e quelle

che partono da recettori associati a proteine G²⁷.

La MAPK ERK5

L'attivazione di ERK5 è coinvolta nella regolazione di molti processi cellulari, inclusi la proliferazione, la sopravvivenza, l'angiogenesi, il differenziamento, la transizione epitelio-mesenchima e il cancro²⁸.

Studi sui topi knock-out per ERK5, hanno dimostrato un ruolo importante della proteina nello sviluppo embrionale e, in particolare, nel differenziamento muscolare, neuronale ed endoteliale.

La mancanza della funzione di ERK5 induce infatti la morte dell'animale durante lo sviluppo dovuta principalmente al fallimento dell'angiogenesi, a un ridotto differenziamento neuronale e a difetti cardiovascolari²⁹⁻³¹.

Recentemente, è stato descritto un ruolo di ERK5 nella transizione epitelio-mesenchimale, il processo di transdifferenziamento durante il quale le cellule epiteliali, in determinate condizioni e sotto l'azione di fattori specifici, perdono la morfologia cuboidale e la polarità e acquisiscono un fenotipo fibroblastico con capacità migratorie³². In particolare, ERK5 è stata coinvolta nella regolazione trascrizionale e post-traduzionale di proteine master dell'EMT (Slug e Snail, rispettivamente)³³.

In accordo con il coinvolgimento di ERK5 in funzioni cellulari deregolate nei tumori, la sua via di segnalazione è stata trovata costitutivamente attiva in molti tumori umani, in seguito all'attivazione di diversi oncogeni o per amplificazione genica, dove contribuisce all'acquisizione di un fenotipo più maligno e metastatico, resistenza all'apoptosi, angiogenesi, farmacoresistenza e correla con una prognosi infausta^{34- 39}.

Scopo di questa tesi sperimentale è stato valutare il ruolo svolto dalla proteina chinasi ERK5 nella regolazione positiva di YAP.

L'ipotesi di lavoro parte da una serie di osservazioni, in gran parte raccolte nel laboratorio in cui ho preparato la tesi, tra le quali:

- a. ERK5 è risultato coinvolto nella trasduzione di diversi stimoli meccanici, nei quali il ruolo di YAP è stato ampiamente dimostrato, quali: lo stress da scorrimento di liquidi (shearstress) e lo stiramento della matrice (stretching);
- b. ERK5 ha un importante ruolo di controllo positivo della EMT indotta dal TGF β , processo in cui anche la proteina YAP risulta up-regolata;
- c. ERK5 è un importante regolatore positivo della proteina master della EMT Snail, che recentemente abbiamo dimostrato essere sottoposta ad un controllo diretto da parte di YAP.

Risultati

L'attività di YAP correla positivamente con quella di ERK5 in cellule epatiche.

Come già anticipato, diversi dati, sia provenienti dal nostro laboratorio che tratti dalla letteratura scientifica, indicano ERK5 come un possibile regolatore dell'attività del mecano-trasduttore YAP.

L'ipotesi sperimentale alla base del mio lavoro di tesi, e cioè che ERK5 possa guidare una via di regolazione a monte di YAP alternativa o cooperante con quella canonica LATS-dipendente, è stata verificata in linee cellulari di origine epatica, precedentemente caratterizzate per la loro attività trascrizionale YAP-dipendente. Le cellule precursori/staminali RLSC esprimono YAP a livello sia trascrizionale che proteico e localizzano la proteina nel nucleo, in cui essa funziona come attivatore/inibitore della trascrizione di specifici geni target. Inversamente, gli epatociti differenziati

HepE14 mostrano solo una residuale presenza della proteina YAP, prevalentemente citoplasmatica, incapace di accendere uno specifico profilo trascrizionale^{10, 40}.

Nell'ipotesi di una regolazione di YAP ERK5-dipendente, prima di tutto abbiamo voluto verificare se il comportamento biologico già noto della proteina YAP in queste linee cellulari correlasse in maniera diretta con l'attività di ERK5.

Come mostrato nella Figura 1, e a conferma di dati già prodotti nel nostro laboratorio⁴⁰, nelle RLSC la proteina YAP viene prodotta a livelli significativamente maggiori che nelle HepE14, la sua localizzazione, indagata tramite immunofluorescenza indiretta, è esclusivamente nucleare (Fig. 1A) e, coerentemente con questi dati, risulta significativamente trascritto il suo principale gene target positivo, CTGF (Fig. 1B).

Nelle cellule HepE14 la proteina YAP che ancora viene prodotta è in larga parte trattenuta nel citoplasma, con conseguente bassa espressione di CTGF (Fig. 1A e 1B).

La correlazione tra la funzione di ERK5 e quella di YAP è stata indagata nelle RLSC e nelle HepE14 tramite un doppio saggio di luciferasi in grado di valutare l'attività trascrizionale delle due proteine.

Nelle due linee cellulari è stata valutata la luminescenza emessa in seguito all'attività di due vettori esprimenti il gene della luciferasi sotto il controllo di:

- a) un promotore responsivo al fattore trascrizionale MEF2, uno dei principali target positivi dell'attività chinasi di ERK5 (vettore MEF2-LUC);
- b) un promotore responsivo a YAP, costituito dalla ripetizione di otto sequenze consensus per TEAD, suo principale partner trascrizionale (vettore 8XGTII-LUC) (Fig. 2A).

Come atteso, nelle RLSC è stato riscontrato un livello di attività della luciferasi del costrutto 8XGTII-LUC maggiore che nelle HepE14; nelle stesse cellule anche l'attività

della luciferasi del costrutto MEF2-LUC risulta significativamente maggiore di quella riscontrata nelle cellule con minore attività trascrizionale YAP-dipendente (Fig. 2B).

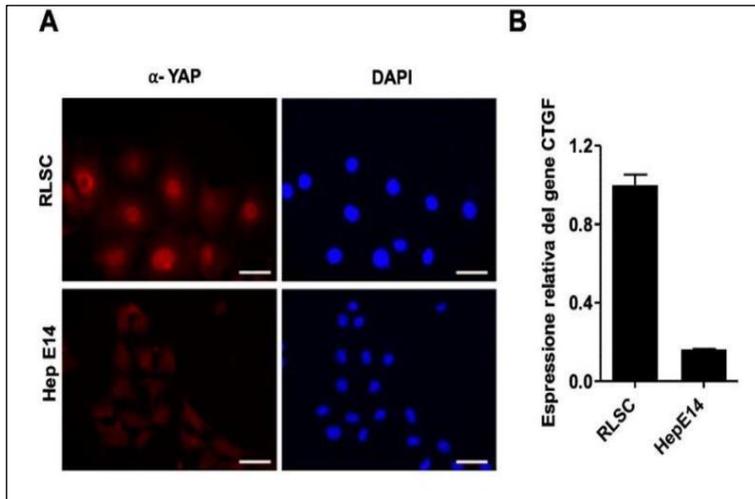


Figura 1: YAP viene prodotta in livelli significativamente maggiori nelle RLSC che nelle HepE14.

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti-YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di espressione genica ottenuta mediante RT-qPCR del gene CTGF nelle RLSC e nelle HepE14. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come "volte di induzione" rispetto al campione di controllo posto arbitrariamente pari a 1. Risultati rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

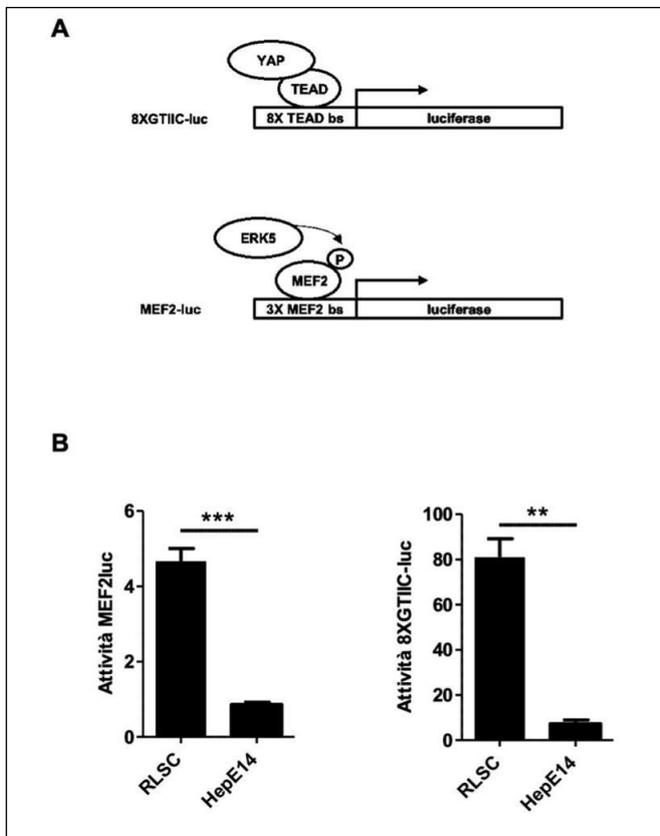


Figura 2: Attività di ERK5 e YAP in RLSC e HepE14.

A: Schematizzazione dei vettori 8XGTII-LUC e MEF2LUC.

B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (**p<0,01; ***p<0,001).

I dati appena riportati indicano quindi una contemporanea attività di ERK5 e YAP nelle cellule RLSC coltivate in condizioni standard, senza alcuno stimolo istruttivo particolare.

La conferma della correlazione tra le due funzioni è stata ottenuta in esperimenti di stimolazione delle due linee cellulari con segnali noti per modificare dinamicamente l'attività delle due proteine. In particolare, le cellule RLSC sono state fatte crescere su un substrato costituito da un hydrogel con un modulo di elasticità (stiffness) di 0,6 KPa, condizione nota per indurre un cambiamento morfologico e funzionale in senso epiteliale/epatocitario e una contemporanea delocalizzazione della proteina YAP dal nucleo al citoplasma. Al contrario, le cellule HepE14 sono state indotte in EMT tramite trattamento con TGF β , condizione nota per indurre un cambiamento morfologico e funzionale delle cellule in senso mesenchimale/staminale e una contestuale attivazione di ERK5. Come mostrato nella Fig. 3, nelle cellule RLSC cresciute su bassa

stiffness, rispetto a cellule cresciute con metodiche standard su plastica (stiffness dell'ordine dei MegaPa), la proteina YAP delocalizza nel citoplasma e la sua attività trascrizionale scende significativamente (Fig. 3A e 3B). In queste condizioni l'attività di ERK5, testata con saggio di luciferasi tramite vettore MEF2-LUC, diminuisce in modo altrettanto significativo (Fig. 3C).

Al contrario, nelle cellule HepE14 indotte in EMT, oltre che all'atteso incremento dell'attività del vettore MEF2-LUC, si osserva un significativo incremento dell'attività del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 3D) e un coerente e notevole aumento dell'espressione dei due geni target positivi di YAP, CTGF e Cyr61 (Fig. 3E), senza che si riscontri un significativo aumento della proteina YAP (Fig. 3F).

In conclusione, i dati fin qui presentati dimostrano una correlazione diretta tra l'attività di ERK5 e quella di YAP, correlazione riscontrabile anche quando si adottano condizioni di crescita in grado di modulare dinamicamente uno dei due fattori.

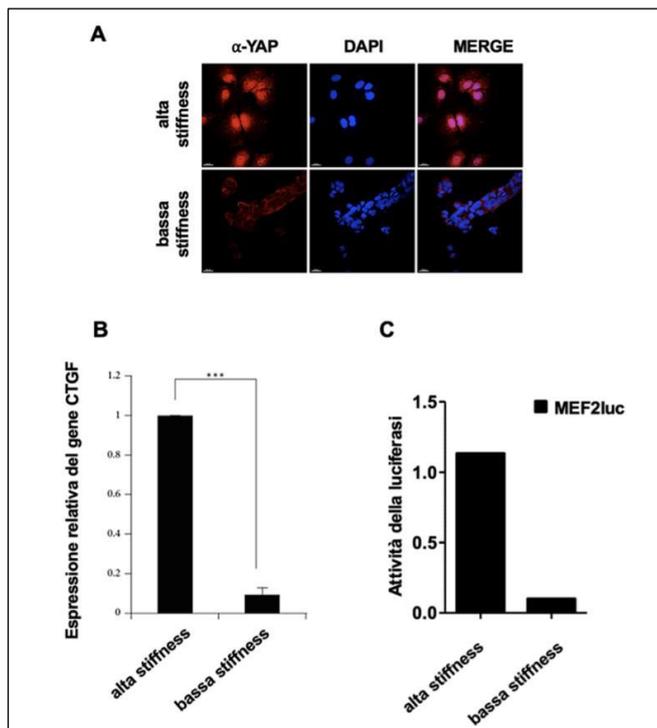


Figura 3: Attività di YAP ed ERK5 in RLSC cresciute su diversi moduli di elasticità.

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di espressione genica ottenuta mediante RT-qPCR del gene CTGF in condizioni di alta stiffness (plastica) e bassa stiffness (Hydrogel; 0,4 kPa). I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come "volte di induzione" rispetto al campione di controllo posto arbitrariamente pari a 1. Risultati rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da un singolo esperimento effettuato in triplicato.

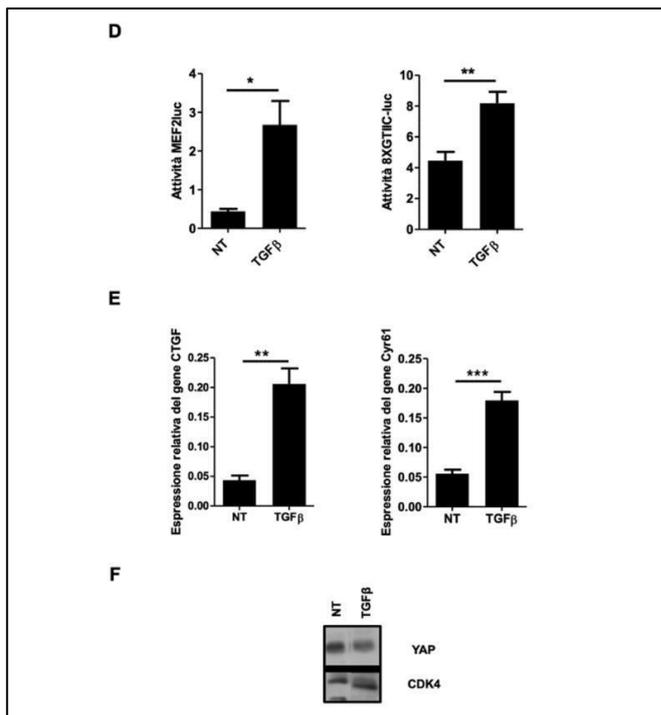


Figura 3 continua: Attività di ERK5 e YAP in HepE14 trattate con TGFβ.

D: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (**p<0,01; ***p<0,001).

E: Analisi RT-qPCR dei geni CTGF e Cyr61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati riportati come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

F: Analisi di Western Blot. La proteina CDK4 è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

ERK5 controlla positivamente la funzione di YAP

I dati presentati finora indicano una correlazione tra le funzioni delle due proteine ERK5 e YAP. Per dimostrare formalmente il ruolo di ERK5 di regolatore positivo a monte di YAP, abbiamo proceduto alla manipolazione della chinasi con esperimenti di over-espressione e di inibizione.

Gli effetti di una over-espressione di ERK5 sulla proteina YAP sono stati valutati nelle cellule HepE14 che, come detto, presentano una bassa attività della chinasi. Cellule HepE14 sono state trasfettate con un vettore esprimente ERK5 e con uno esprimente una forma costitutivamente attiva della chinasi MEK5, suo principale attivatore (questo al fine di garantire non solo una overspressione di ERK5 ma anche una sua efficiente attivazione). L'avvenuta overespressione, e quindi iperattività, di ERK5 e l'eventuale modulazione di risposta della proteina YAP, sono stati valutati mediante saggi di luciferasi. I vettori utilizzati sono stati ancora una volta MEF2-LUC, per la valutazione dell'attività chinasi di ERK5, e 8XGTII-LUC, per la valutazione dell'attività trascrizionale di YAP.

Come mostrato in Fig. 4, ad un aumento significativo dell'espressione della luciferasi ERK5-dipendente corrisponde un significativo aumento dell'attività del vettore YAP-dipendente 8XGTII-LUC (Fig. 4A e 4B), senza che vari il livello della proteina stessa (Fig. 4C).

Questo risultato dà una prima conferma all'ipotesi di una regolazione attiva (diretta o indiretta) di ERK5 sulla funzione trascrizionale di YAP.

Nonostante l'attivazione del gene reporter controllato da elementi responsivi a YAP, nelle cellule HepE14 over-esprimenti ERK5 non si è riscontrato un coerente aumento del gene endogeno CTGF, su cui il cofattore trascrizionale agisce utilizzando le stesse sequenze regolatrici (Fig. 4D).

Per valutare se il diverso comportamento tra espressione del gene reporter e quello del gene target endogeno potesse dipendere dallo stato differenziativo della cellula e quindi da uno specifico stato cromatinico in grado di condizionare l'accessibilità a determinati promotori di fattori trascrizionali, abbiamo esteso l'analisi a cellule che per il loro stato indifferenziato o

di trasformazione potessero essere meglio responsive alla modulazione dell'espressione di geni mesenchimali, come il CTGF. L'over-espressione di ERK5 nelle cellule di epatoma umano HepG2 e nelle cellule indifferenziate RLSC, in effetti, ha confermato l'influenza della chinasi su YAP, i cui geni target positivo e negativo, CTGF e DDIT4, aumentano e diminuiscono rispettivamente in modo significativo il loro livello di espressione (Fig. 4E).

Per dare maggiore consistenza ai dati ottenuti con esperimenti di over-espressione di ERK5, si è voluto valutare l'effetto su YAP di una inibizione dell'attività dell'enzima.

A tal fine si sono allestiti esperimenti di inibizione farmacologica dell'attività di ERK5 in cellule RLSC che, come precedentemente dimostrato, la presentano a livelli significativi.

In particolare, è stata usata una molecola sintetica in grado di inibire in maniera altamente specifica ERK5, la 2-[[2-Ethoxy-4-(4-idroxy-1-piperidinyl) phenil] amino] - 5,11-dihydro-5,11-dimethyl-6H-pyrimidol[4,5-b] [1,4] benzodiazepine-6, nota con il nome commerciale di XMD8-92. Questo inibitore in vivo e in vitro si è dimostrato particolarmente efficace nella soppressione della progressione tumorale in quei tumori dove c'è una iperattivazione di ERK5 (Stecca et al. 2019). In RLSC coltivate in condizioni standard e trattate con XMD8-92, si osserva l'attesa diminuzione dell'attività di ERK5, dimostrata mediante diminuzione dell'attività di luciferasi del costrutto MEF2-LUC, rispetto al campione non trattato (Fig. 5A).

L'inibizione dell'attività di ERK5 determina una significativa diminuzione dell'attività del vettore 8XGTII-LUC rispetto a quanto osservato nelle cellule non trattate (Fig. 5B) con una coerente diminuzione dei target positivi di YAP, CTGF e Cyr61 (Fig. 5C) senza che ci sia una sostanziale diminuzione della proteina (Fig. 5D).

Poiché quindi l'inibizione di ERK5 è sufficiente a ridurre significativamente l'espressione genica YAP-dipendente in condizioni cellulari di base, abbiamo verificato l'efficacia del trattamento con XMD8-92 anche in cellule epiteliali indotte in EMT tramite il TGF β che, come dimostrato in precedenza, induce una importante attivazione della chinasi e una up-regolazione dell'attività trascrizionale YAP-dipendente.

In cellule HepE14 trattate sia con il TGF β che con XMD8-92, abbiamo osservato la completa inibizione dell'aumento dell'espressione del vettore MEF2-LUC indotto dalla citochina e, cosa rilevante, un altrettanto significativo blocco dell'aumento dell'attività del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 6A).

I dati ottenuti con i saggi di luciferasi sono coerenti quelli della trascrizione dei geni target di YAP, CTGF e CYR61, i cui livelli di espressione non risultano più up-regolati dal TGF β dopo il trattamento con l'inibitore di ERK5 (Fig. 6B).

L'ulteriore conferma della funzione esercitata da ERK5 su YAP è stata infine ottenuta in cellule HepE14 over-esprimenti ERK5, dove, in seguito al trattamento con XMD8-92, accanto alla diminuzione dell'attività del vettore MEF2-LUC si osserva quella del vettore 8XGTII-LUC (Fig. 6C).

In conclusione, i dati riportati in questa prima parte del lavoro dimostrano per la prima volta il controllo positivo sull'attività trascrizionale di YAP esercitato dalla protein-chinasi ERK5, ed inseriscono a monte del trasduttore del segnale meccanico un nuovo elemento regolativo alternativo o cooperante con quelli già caratterizzati.

ERK5 regola l'attività di YAP controllando il suo legame al DNA, attraverso una via di segnalazione Hippo-indipendente

Dopo aver dimostrato la funzione regolativa di ERK5 su YAP, abbiamo cercato di caratterizzare i meccanismi molecolari coinvolti.

Considerando che uno dei meccanismi spesso adottati dai regolatori dei fattori trascrizionali per controllarne la funzione è la modulazione della loro localizzazione subcellulare, abbiamo indagato su un eventuale ruolo di ERK5 sulla traslocazione/ritenzione nucleare di YAP. Una immunofluorescenza con anticorpo anti-YAP, allestita in RLSC trattate o meno con l'inibitore XMD8-92, pur mostrando un aumento della presenza della proteina a livello citoplasmatico, rileva un sostanziale mantenimento di YAP nel nucleo (Fig. 7A), riducendo quindi la possibilità (che merita comunque ulteriori studi) che ERK5 possa agire sul cofattore trascrizionale regolandone la distribuzione subcellulare.

Se ERK5 non controlla la quantità di YAP né la sua distribuzione cellulare, una delle ipotesi è che ne possa direttamente o indirettamente regolare la capacità di interagire con le sequenze regolatrici dei geni target. Per verificare questo abbiamo effettuato un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo anti-YAP da estratti di RLSC trattate o meno con l'inibitore XMD8-92. Nella figura 7B è mostrato il mancato reclutamento della proteina YAP sul promotore del suo gene target CTGF, quando nelle cellule è inibita la funzione di ERK5.

I dati presentati finora indicano ERK5 come un nuovo regolatore positivo di YAP in grado di influenzarne capacità di essere reclutato sui promotori dei suoi geni target. Nel tentativo di identificare il meccanismo attraverso cui si esplica questa regolazione e considerando che la via di attivazione del mecano-trasduttore più nota e meglio caratterizzata è quella che passa attraverso l'inattivazione delle chinasi LATS1/2, abbiamo voluto verificare se l'azione di ERK5 passasse o meno attraverso l'attività di queste chinasi LATS1/2.

A tal fine ci siamo avvalsi dell'utilizzo di un costrutto che esprime una forma di YAP costitutivamente attiva (YAP5SA) (Zhao B. et

al. 2007), in quanto mutata nei siti specificamente fosforilati dalle chinasi LATS1/2.

Cellule HepE14 sono state trasfettate con il vettore esprimente YAP wild-type (YAPWT) e con il mutante YAP5SA e ne è stata valutata l'attività trascrizionale YAP-dipendente con saggio di luciferasi con il vettore 8XGTII-LUC, in presenza ed in assenza dell'inibitore di ERK5 XMD8-92.

Come mostrato in Fig. 8 e come atteso, l'attività di luciferasi del vettore 8XGTII-LUC è indotta sia nelle cellule trasfettate con YAPWT che in quelle trasfettate con YAP5SA. Il trattamento con XMD8-92 comporta una diminuzione dell'attività del vettore 8XGTII-LUC, sia nelle cellule trasfettate con YAPWT che in quelle esprimenti YAP5SA, senza che sia modulato il loro livello proteico (Fig. 8B).

Visto che ERK5 controlla funzionalmente anche un mutante di YAP resistente alle fosforilazioni inibitrici di LATS1/2, abbiamo voluto verificare se ERK5 fosse richiesto anche per il suo reclutamento sulle sequenze regolatrici dei geni target. A tal fine, abbiamo effettuato un esperimento di immunoprecipitazione della cromatina con anticorpo anti-YAP su estratti di HepE14 overesprimenti YAP5SA, trattate o meno con l'inibitore di ERK5 XMD8-92. Nella figura 9 è mostrato che anche il legame di YAP5SA sul promotore del suo gene target CTGF, è compromesso dall'inibizione della funzione di ERK5.

I dati riportati finora, quindi, indicano che ERK5 agisce positivamente sull'attività di YAP in maniera LATS-indipendente e senza modificare i livelli della proteina.

L'attività di ERK5 controlla l'interazione tra YAP e STAT3

I dati riportati precedentemente dimostrano che l'attività di ERK5 permette a YAP di essere reclutato sui promotori legati dal fattore trascrizionale TEAD.

In un lavoro recente del nostro laboratorio (cui ho contribuito con i risultati che seguono), è stato individuato il gene master della EMT, Snail, come un nuovo gene target di YAP. Su questo gene, YAP viene reclutato in una regione cromatinica che comprende la consensus per un diverso fattore trascrizionale, STAT3 (Fig. 10A).

Le cellule progenitrici in cui YAP è presente a livello nucleare e attiva, evidenziano una netta presenza di STAT3 nucleare rispetto a cellule differenziate, dove

YAP è assente o citoplasmatica (Fig. 10B e 10C).

Dati preliminari, ottenuti da esperimenti di co-immunoprecipitazione su estratti ottenuti da cellule trattate o non trattate con l'inibitore di ERK5, suggeriscono che l'attività della chinasi è richiesta anche per l'interazione fisica tra YAP e STAT3 (Fig. 10D).

Questi ultimi dati suggeriscono la possibilità che ERK5 possa modulare l'attività di YAP agendo direttamente sulla proteina piuttosto che sui fattori trascrizionali con cui interagisce sui geni target.

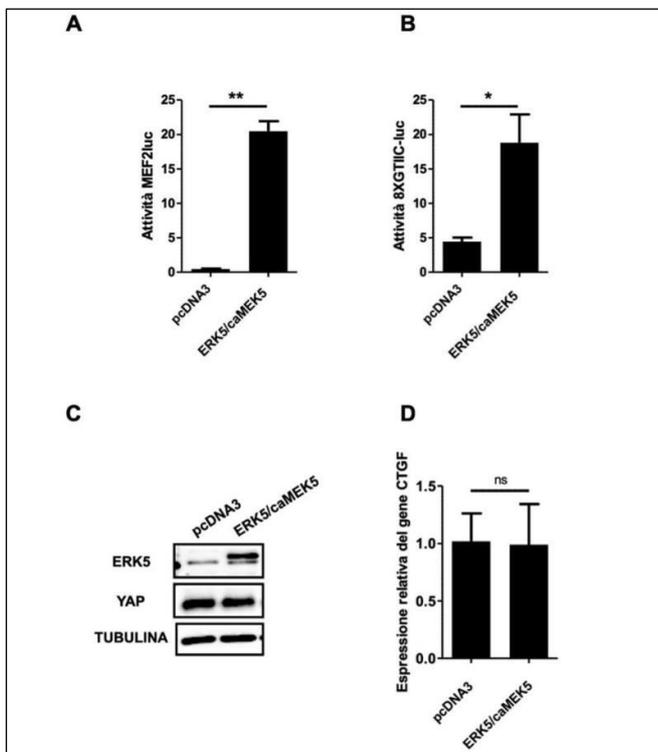


Figura 4: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 overesprimenti

ERK5/caMEK5.

A/B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi di RT-qPCR del gene CTGF. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti.

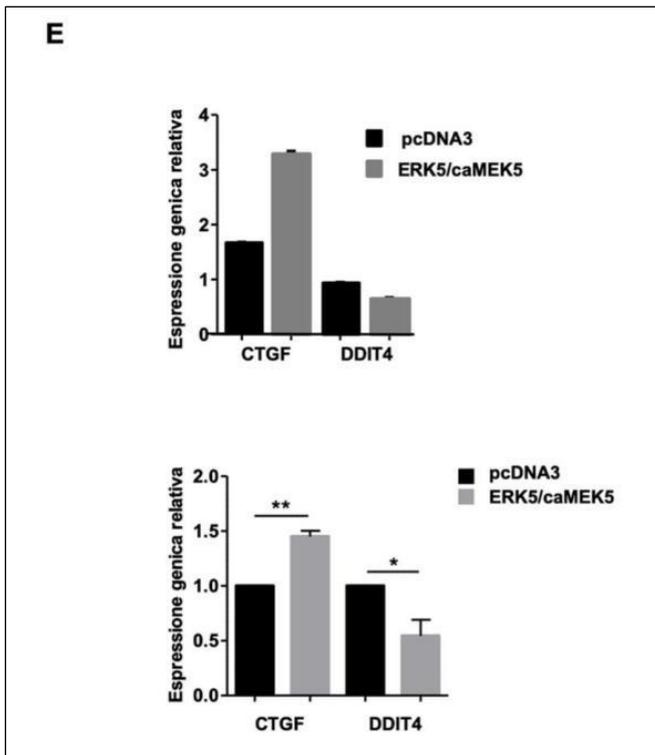


Figura 4 bis: Espressione genica YAP-dipendente in RLSC (pannello superiore) e HepG2 (pannello inferiore) overesprimenti ERK5/caMEK5.

E: Analisi di RT-qPCR del gene CTGF e DDIT4. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

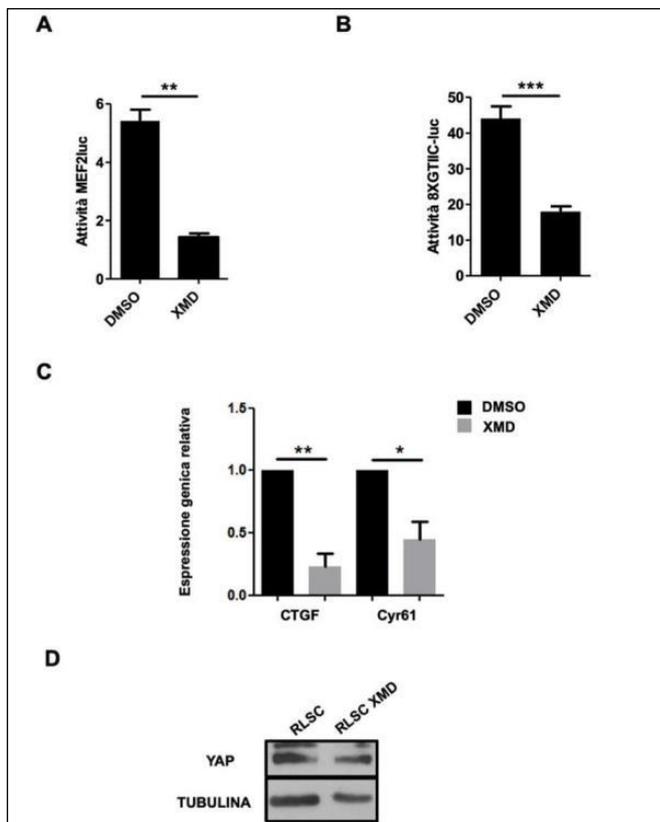


Figura 5: Analisi dell'attività di YAP in RLSC trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A/B: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

C: Analisi RT-qPCR del gene CTGF e CYR61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

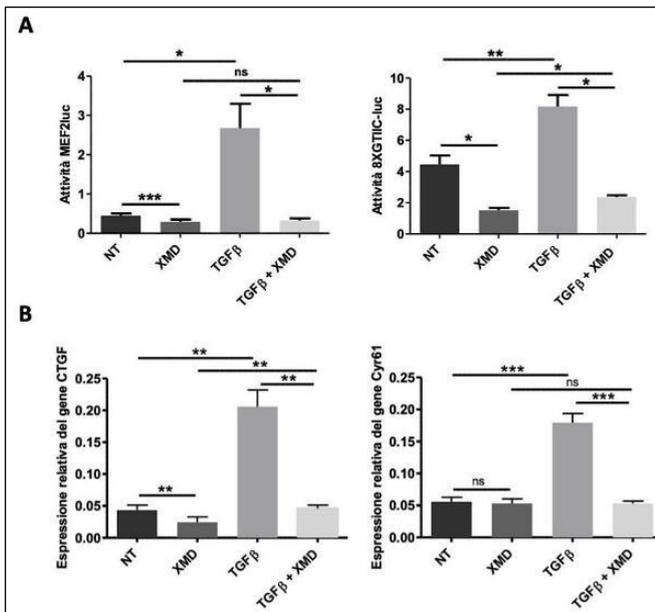


Figura 6: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 trattate con TGFβ e con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,00; ns=non significativo).

B: Analisi RT-qPCR del gene CTGF e CYR61. I livelli di espressione sono stati normalizzati rispetto ai livelli del gene *Housekeeping* L34 e sono stati espressi come media +/-SEM di tre esperimenti indipendenti. (**p<0,01; ***p<0,00; ns=non significativo).

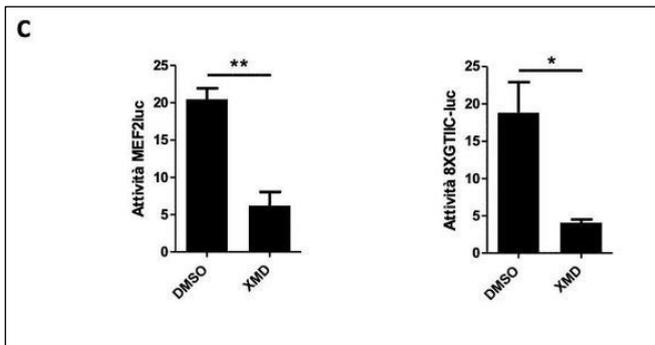


Figura 6 continua: Analisi dell'attività di YAP in HepE14 overesprimenti ERK5/caMEK5 trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

C: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (*p<0,05; **p<0,01).

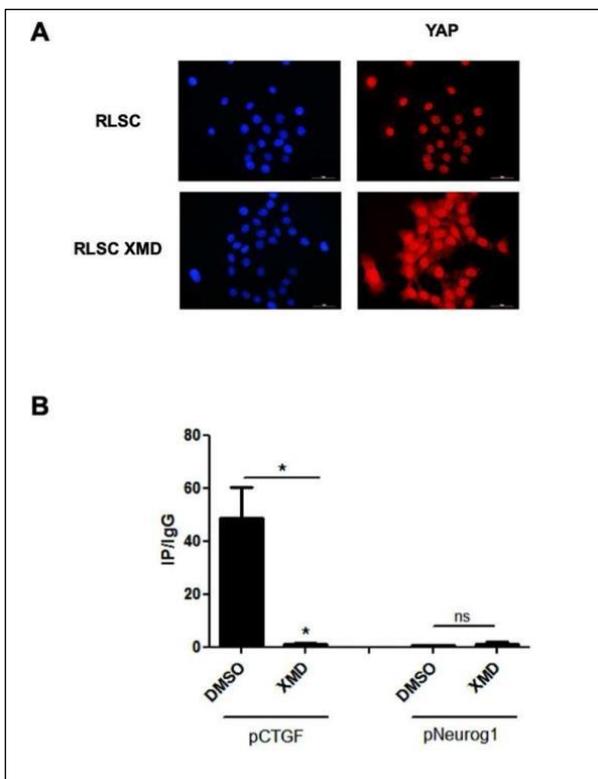


Figura 7: Analisi della localizzazione cellulare e del legame al DNA di YAP in RLSC trattate con l'inibitore di ERK5 (XMD8-92).

A: Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti YAP (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

B: Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. Il promotore di Neurogenina è stato usato come controllo negativo. Valori derivanti da almeno tre esperimenti indipendenti sono calcolati come IP/IgG e riportati come media ± S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (*p<0,05; ns=non significativo).

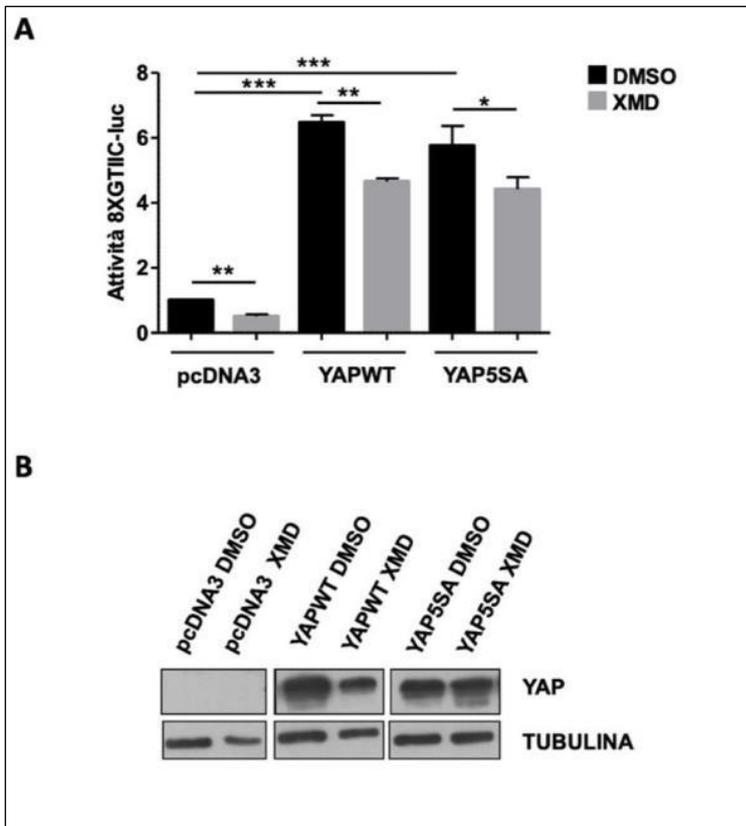


Figura 8: Analisi dell'attività di YAPWT e YAP5SA in cellule HepE14 trattate con XMD8-92.

A: Saggio di luciferasi. I valori di luminescenza, normalizzati rispetto al controllo Renilla, sono espressi come unità arbitrarie. I dati sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti effettuati in duplicato. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

B: Analisi di Western Blot. La proteina tubulina è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

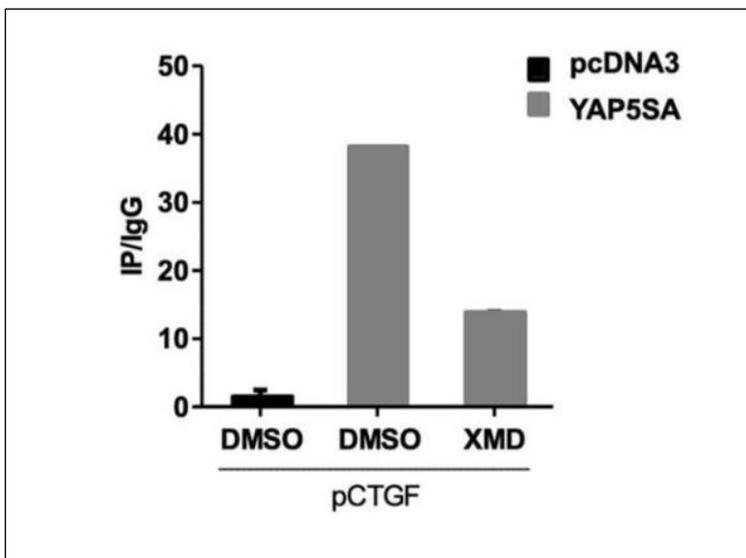


Figura 9: Analisi del legame al DNA di YAP in HepE14 overesprimenti YAP5SA.

Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. Valori derivanti da un singolo esperimento sono calcolati come IP/IgG e riportati come media \pm S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (* $p < 0.05$; ns=non significativo).

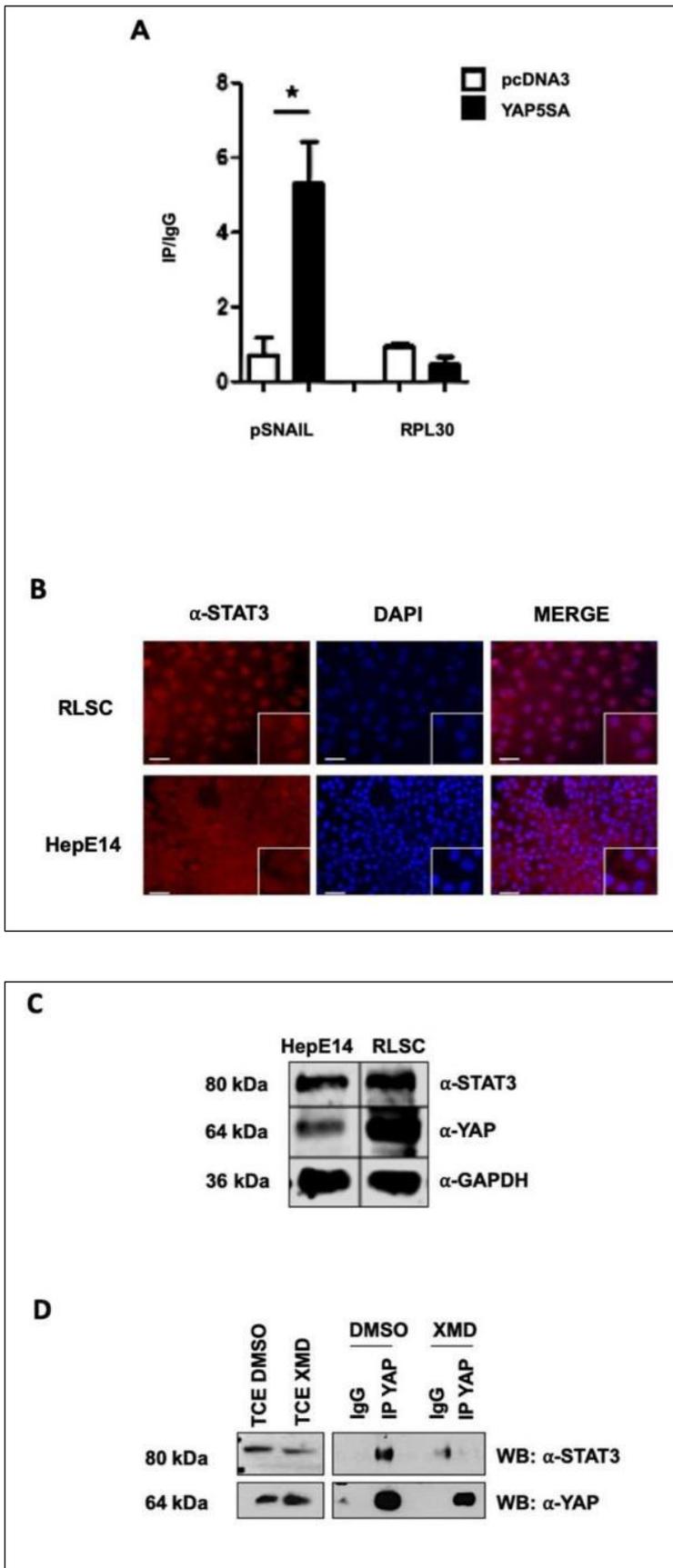


Figura 10: Analisi di STAT3 in RLSC e HepE14.

A: Analisi del legame al DNA di STAT3. Analisi di qPCR su cromatine immunoprecipitate con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. RPL30 è stato usato come controllo negativo. Valori derivanti da almeno tre esperimenti indipendenti sono calcolati come IP/IgG e riportati come media \pm S.E.M. rispetto al campione di controllo. (valore arbitrario=1) (* $p < 0.05$; ns=non significativo).

B: Analisi della localizzazione subcellulare di STAT3. Analisi di immunofluorescenza indiretta condotta con anticorpo anti-STAT3 (rosso). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu). Immagini rappresentative di tre esperimenti indipendenti. Ingrandimento 20X.

C: Analisi di Western Blot. La proteina GAPDH è stata usata come normalizzatore. L'immagine è rappresentativa di tre esperimenti indipendenti.

D: Analisi dell'interazione tra YAP e STAT3 in RLSC trattate con XMD8-92. Western Blot con Ab anti-YAP e anti-STAT3. I campioni proteici sono stati immunoprecipitati con Ab anti-YAP o, come controllo, con IgG di coniglio. TCE=Estratti Proteici Totali.

BIBLIOGRAFIA

1. Varelas X. The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* 2014; 141: 1614-26.
2. Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; 18: 758-70.
3. Cao J, Huang W. Two faces of Hippo: activate or suppress the Hippo pathway in cancer. *Anti-cancer Drugs* 2017; 28: 1079-85.
4. Zanconato F, Cordenonsi M, Piccolo S. YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* 2016; 29: 783-803.
5. Oh H, Slattery M, Ma L, Crofts A, White KP, Mann RS, et al. Genome-wide association of Yorkie with chromatin and chromatin-remodeling complexes. *Cell Rep* 2013; 3: 309-18.
6. Oh H, Slattery M, Ma L, White KP, Mann RS, Irvine KD. Yorkie promotes transcription by recruiting a histone methyltransferase complex. *Cell Rep* 2014; 8: 449-59.
7. Qing Y, Yin F, Wang W, et al. The Hippo effector Yorkie activates transcription by interacting with a histone methyltransferase complex through NcoA6. *ELife* 2014; 3: e02564.
8. Skibinski A, Breindel JL, Prat A, et al. The Hippo transducer TAZ interacts with the SWI/SNF complex to regulate breast epithelial lineage commitment. *Cell Rep* 2014; 6: 1059-72.
9. Kim M, Kim T, Johnson RL, Lim DS. Transcriptional co-repressor function of the hippo pathway transducers YAP and TAZ. *Cell Rep* 2015; 11: 270-82.
10. Noce V, Battistelli C, Cozzolino AM, et al. YAP integrates the regulatory Snail/HNF4alpha circuitry controlling epithelial/hepatocyte differentiation. *Cell Death Dis* 2019; 10: 768.
11. Mo JS, Park HW, Guan KL. The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO Rep* 2014; 15: 642-56.
12. Pan D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Developmental Cell* 2010; 19: 491-505.
13. Zhao B, Ye X, Yu J, et al. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 2008; 22: 1962-71.
14. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 246-57.
15. Yin F, Yu J, Zheng Y, Chen Q, Zhang N, Pan D. Spatial organization of Hippo signaling at the plasma membrane mediated by the tumor suppressor Merlin/NF2. *Cell* 2013; 154: 1342-55.
16. Cordenonsi M, Zanconato F, Azzolin L, et al. The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 2011; 147: 759-72.
17. Zhao B, Wei X, Li W, et al. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 2007; 21: 2747-61.
18. Chan SW, Lim CJ, Chong YF, Pobbati AV, Huang C, Hong W. Hippo pathway-independent restriction of TAZ and YAP by angiomin. *J Biol Chem* 2011; 286: 7018-26.
19. Zhao B, Lei QY, Guan KL. The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20: 638-46.
20. Liu X, Yang N, Figel SA, et al. PTPN14 interacts with and negatively regulates the oncogenic function of YAP. *Oncogene* 2013; 32: 1266-73.
21. Wang W, Huang J, Wang X, et al. PTPN14 is required for the density-dependent control of YAP1. *Genes Dev* 2012; 26: 1959-71.
22. Meng Z, Moroishi T, Guan KL. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev* 2016; 30: 1-17.
23. Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, et al. Hippo-independent activation of YAP by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell* 2014; 25: 831-45.
24. Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM. E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 11930-5.
25. Meng Z, Moroishi T, Mottier-Pavie V, et al. MAP4K family kinases act in parallel to MST1/2 to activate LATS1/2 in the Hippo pathway. *Nat Comm* 2015; 6: 8357.
26. Zhang N, Bai H, David KK, et al. The Merlin/NF2 tumor suppressor functions

- through the YAP oncoprotein to regulate tissue homeostasis in mammals. *Developmental Cell* 2010; 19: 27-38.
27. Yu FX, Zhao B, Panupinthu N, et al. Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell* 2012; 150: 780-91.
 28. Drew BA, Burow ME, Beckman BS. MEK5/ERK5 pathway: the first fifteen years. *Bioch Biophys Acta* 2012; 1825: 37-48.
 29. Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Nat Acad Scien USA* 2002; 99: 9248-53.
 30. Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 43344-51.
 31. Wang X, Merritt AJ, Seyfried J, et al. Targeted deletion of mek5 causes early embryonic death and defects in the extracellular signal-regulated kinase 5/myocyte enhancer factor 2 cell survival pathway. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 336-45.
 32. Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005; 24: 5764-74.
 33. Marchetti A, Colletti M, Cozzolino AM, et al. ERK5/MAPK is activated by TGFbeta in hepatocytes and required for the GSK-3beta-mediated Snail protein stabilization. *Cell Signall* 2008; 20: 2113-8.
 34. Esparis-Ogando A, Diaz-Rodriguez E, Montero JC, Yuste L, Crespo P, Pandiella A. Erk5 participates in neuregulin signal transduction and is constitutively active in breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 270-85.
 35. Mehta PB, Jenkins BL, McCarthy L, et al. MEK5 overexpression is associated with metastatic prostate cancer, and stimulates proliferation, MMP-9 expression and invasion. *Oncogene* 2003; 22: 1381-9.
 36. Ramsay AK, McCracken SR, Soofi M, et al. ERK5 signalling in prostate cancer promotes an invasive phenotype. *Br J Cancer* 2011; 104: 664-72.
 37. Simoes AE, Pereira DM, Gomes SE, et al. Aberrant MEK5/ERK5 signalling contributes to human colon cancer progression via NF-kappaB activation. *Cell Death Dis* 2015; 6:e1718.
 38. Weldon CB, Scandurro AB, Rolfe KW, et al. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-7 cells by using gene expression microarray. *Surgery* 2002; 132: 293-301.
 39. Zen K, Yasui K, Nakajima T, et al. ERK5 is a target for gene amplification at 17p11 and promotes cell growth in hepatocellular carcinoma by regulating mitotic entry. *Genes Chromosomes Cancer* 2009; 48: 109-20.
 40. Cozzolino AM, Noce V, Battistelli C, et al. Modulating the Substrate Stiffness to Manipulate Differentiation of Resident Liver Stem Cells and to Improve the Differentiation State of Hepatocytes. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 5481493.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 24 ottobre 2019

Dott.ssa Veronica Consalvi, Corso di Laurea in Biotecnologie Mediche, Dipartimento di Medicina Molecolare, Facoltà di Farmacia e Medicina, "Sapienza" Università di Roma

Prof.ssa Laura Amicone, Professore Associato, Dip. Di Medicina Molecolare, "Sapienza" Università di Roma

Per la corrispondenza:
veronicaconsalvi95@gmail.com

Tesi di Laurea: “Associazione della stimolazione elettrica transcranica (t-DCS) duale alla terapia robotica dell’arto superiore in pazienti affetti da stroke cronico” (Sintesi)

Autore: A. Cruciani

Relatore: V. Di Lazzaro

Correlatore: F. Capone

Introduzione

Il mondo sta affrontando quella che si può definire una vera e propria epidemia di ictus. Nonostante nelle due decadi passate si sia dimostrato una diminuzione nel rate di mortalità, il peso dell’ictus, in termini di DALY (disability adjusted life years), di mortalità ictus relata e prevalenza, risulta in aumento¹. Nel 2010 si è stimato come l’incidenza dell’ictus sia stata di circa 17 milioni che si vanno ad aggiungere ai 33 milioni di pazienti sopravvissuti ad un precedente ictus¹. Vi sono state, inoltre, più di 5,9 milioni di morti e circa 102 milioni di eventi con abbassamento del QALY, rendendo questa malattia la seconda causa di morte e la terza causa di abbassamento del QALY nel mondo.

Nei pazienti affetti da ictus si è dimostrato come ci sia una importante riorganizzazione a livello cerebrale con numerose variazioni nell’eccitabilità e nella struttura di pathways cerebrali². Queste modificazioni hanno una natura complessa, essendo caratterizzate non solo da una riduzione dell’eccitabilità della corteccia motoria primaria (M1) come diretta conseguenza della lesione ischemica, ma anche da modificazioni plastiche delle aree corticali circostanti o dell'emisfero controlaterale³ (Fig. 1). La complessità di queste modificazioni plastiche comporta una notevole incertezza nei modelli di recupero funzionale post ictus.

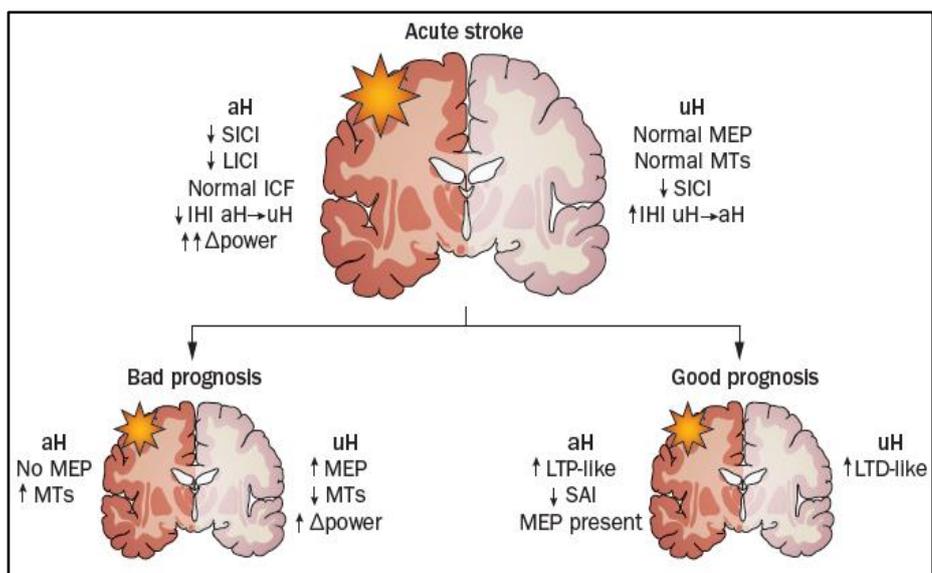


Fig. 1: Parametri neurofisiologici prognostici nell'ictus acuto (Di Pino et al. 2014)

I modelli principali di recupero sono sostanzialmente tre: il modello vicariante; il modello della competizione interemisferica e il modello *bimodal balance recovery* in cui si vanno a combinare i due modelli precedenti introducendo il concetto di riserva funzionale.

- **Il modello vicariante:** Per “Vicariare” ci si riferisce alla condizione in cui un’area cerebrale acquisisce le funzioni primariamente deputate alla regione cerebrale affetta. Hughlings Jackson fu il primo a proporre questo modello di recupero. Le aree perilesionali aumentano la propria attività così da vicariare le funzioni della regione affetta⁴. In altre situazioni è l’area omologa, nell’emisfero sano, a subire questa iperattivazione così da supplire al danno della regione controlaterale.

- **Il modello della competizione interemisferica:** in questo modello si suppone che ci sia una mutua inibizione tra gli emisferi e che questi siano fisiologicamente in equilibrio. Un danno in uno dei due emisferi va a perturbare questo equilibrio, a cui consegue un aumento dell’inibizione sul lato lesa del lato sano. Il lato lesa, quindi, sarebbe doppiamente inibito, dalla lesione stessa e dalla inibizione proveniente dal lato sano⁵.

- **Il modello *bimodal-balance recovery*:** Questo modello propone di combinare le precedenti due teorie andando ad introdurre un nuovo parametro, la riserva funzionale. È, infatti, la riserva funzionale che agisce da ago della bilancia tra modello vicariante e modello della competizione interemisferica, dove il primo predice meglio il recupero nei pazienti con riserva funzionale scarsa e viceversa⁶.

Basandoci su questi modelli sono stati quindi tentate numerosi interventi volti a ridurre le modificazioni plastiche e favorire il recupero funzionale post ictus. La t-DCS, in particolare, è in grado di modulare

l’eccitabilità corticale in modo efficiente, duraturo (con effetti che iniziano durante la stimolazione stessa e che durano per qualche ora a partire dalla fine della stimolazione) e sicuro nei soggetti sani⁷: inoltre, è in grado di produrre cambiamenti di eccitabilità nelle due direzioni, verso un incremento e verso una sua riduzione in dipendenza del solo posizionamento degli elettrodi sullo scalpo⁸. Nello specifico, la t-DCS sembra indurre fenomeni di metaplasticità, ovvero di modulare, in maniera dipendente dalla propria polarità, la risposta a successivi protocolli di potenziamento sinaptico: uno studio su modelli animali ha infatti dimostrato come l’esposizione a t-DCS subito precedente a protocolli di induzione di LTP (*Long Term Potentiation*) (elettrici o magnetici), modificava in maniera sostanziale l’induzione stessa dei fenomeni di potenziamento⁹, probabilmente influenzando l’espressione genica neuronale e l’attività dei recettori NMDA del glutammato. Alla luce di tali risultati, appare congruo il rationale di utilizzare la t-DCS immediatamente prima o nella primissima fase di interventi volti a promuovere la plasticità sinaptica, come le tecniche di neuroriabilitazione.

Razionale dello studio

Il nostro studio pilota randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco si propone di valutare l’effetto dell’associazione della tDCS duale (anodica sull’emisfero lesa e catodica su quello sano) alla terapia robotica dell’arto superiore in pazienti affetti da stroke cronico.

L’obiettivo primario è valutare se l’introduzione della tDCS combinata alla terapia robotica nei pazienti con ictus ischemico in fase cronica sia in grado di migliorare il deficit motorio e la funzionalità dell’arto superiore.

L’obiettivo secondario è valutare eventuali associazioni tra le variazioni dei

punteggi nelle scale cliniche e le misure neurofisiologiche prima e dopo l'intervento riabilitativo e le eventuali differenze tra i gruppi di trattamento.

Materiali e Metodi

Lo studio è stato organizzato come pilota randomizzato controllato in doppio cieco su due gruppi di pazienti sottoposti a trattamento robotico (ratio 1:1): un gruppo in cui viene applicata la tDCS bilaterale real nei 20' precedenti il trattamento robotico ed un gruppo di controllo (trattamento robotico associato alla tDCS sham).

Tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione clinica tra i 30 e i 15 giorni prima il trattamento (T-2), le valutazioni cliniche sono state ripetute il giorno dell'inizio del trattamento (T-1), il giorno della fine del trattamento (T0), ad un mese del trattamento (T1) e a tre mesi del trattamento (T2). Le valutazioni neurofisiologiche sono state eseguite al T-2 e successivamente ripetute al T0.

I soggetti che partecipano alla sperimentazione clinica sono pazienti con esiti di stroke cronico pervenuti presso l'ambulatorio di Neurologia del Policlinico Universitario Campus Bio-Medico di Roma o presso la Fondazione Santa Lucia.

Criteri di inclusione	Criteri di esclusione
Lesione di sola natura ischemica isolata, con diagnosi confermata tramite sistemi di brain imaging (MRI, TAC)	Deformità cronica dell'arto paretico
Funzioni cognitive e di linguaggio sufficienti a seguire le istruzioni che fornisce il medico ed il terapeuta	Paralisi completa e flaccida di tutte le performance motorie di spalla e gomito
Valore della Modified Ashworth Scale < 3	Grave eminattensione (batteria per unilateral spatial neglect Pizzamiglio)
Valore di Fugl-Meyer \geq 3 in modo che non siano completamente paralizzati	Seconda valutazione clinica pre-trattamento un incremento nella Fugl-Meyer > 2.1 punti rispetto al punteggio della prima valutazione
Firma del consenso informato a partecipare a questo studio	Controindicazioni all'esecuzione di stimolazioni magnetiche transcraniche – TMS - (pacemaker, impianti metallici ecc.)
Condizioni stabili, durante le due sedute di valutazione pre-trattamento per evitare l'Hawthorne effect	Epilessia
	Pregressi interventi neurochirurgici
	Severa osteoporosi dell'arto superiore
	Esiti di pregresse fratture
	MMSE \geq di 24

Tab. 1: Criteri di inclusione ed esclusione.

Le valutazioni cliniche comprendono le seguenti scale:

- **Modified Ashworth scale:** Questa scala di valutazione risulta essere di particolare importanza nella valutazione della spasticità post-ictus. La scala comprende un punteggio da 0 (nessun incremento nel tono muscolare) a 5 (la parte affetta è rigida in flessione o in estensione). La valutazione viene quindi effettuata nei muscoli che intendiamo studiare e il punteggio di ogni muscolo studiato viene quindi sommato al precedente.
- **Fugl-Meyer Assessment Upper Extremity (FMA-UE):** la scala Fugl-Meyer viene utilizzata per valutare l'impairment sensitivo-motorio in pazienti affetti da ictus. La FMA-UE, nello specifico, è utilizzata per valutare questo deficit nell'arto superiore. La valutazione è divisa in più sezioni che valutano 33 items, ad ogni item viene attribuito un punteggio da 0 a 2 per un massimo di 66 punti (in cui il paziente non ha deficit). Sono stati valutati i muscoli: abduttori spalla; flesso-estensori gomito; flesso-estensori polso; flesso-estensori dita; opponente del pollice.
- **Visual Analogue Scale (VAS):** la VAS è uno strumento semplice, ma accurato, per la valutazione del dolore. La scala consiste in una linea retta di 10 cm che parte da "nessun dolore" e arriva fino a "massimo dolore possibile", il paziente dovrà quindi fare un segno tra i due endpoint.
- **Barthel index:** L'indice o scala di Barthel, codificato alla fine degli anni cinquanta dall'infermiera inglese Barthel, ha lo scopo di stabilire il grado di indipendenza del paziente. È composto da 10 item che prevedono le comuni attività quotidiane (ADL *Activities of Daily Living*). Ad ogni item è attribuito un punteggio (massimo 100), la somma indica il grado di autonomia del paziente nello svolgimento delle attività di vita quotidiane.
- **NIH stroke scale:** il *National Institute of Health Stroke Scale* è un indice quantitativo che ci permette di valutare in maniera sistematica i deficit neurologici derivanti da un episodio cerebrovascolare. Si compone di 15 items che vanno ad indagare coscienza, linguaggio, neglet, perdita di campo visivo, movimenti oculari, forza motoria, atassia, disartria e deficit di sensibilità. Per ogni item si va da un punteggio normale di 0 fino a un punteggio di 3 per alcuni items e di 5 per altri. La misurazione richiede circa 10 minuti per essere completata.
- **Medical Research Council (MRC):** questa scala venne sviluppata dal *Medical Research Council* nel Regno Unito ma ad oggi risulta essere quella più utilizzata, a livello mondiale, per la valutazione della forza muscolare. La scala è così articolata: un punteggio di 0 corrisponde ad una assenza di contrazione muscolare visibile; un punteggio di 1 ad una contrazione muscolare visibile associata a un movimento dell'arto limitato o assente; un punteggio di 2 corrisponde ad un movimento dell'arto, ma non contro gravità; un punteggio di 3 ad un movimento contro gravità, ma non contro resistenza; un punteggio di 4 ad un movimento almeno contro la resistenza fornita dall'esaminatore; un punteggio di 5 invece corrisponde alla forza piena. Nel nostro studio abbiamo valutato: abduttori spalla; flesso-estensori gomito; flesso-estensori polso; flesso-estensori dita; opponente pollice.

Le valutazioni neurofisiologiche comprendono le valutazioni di RMT, AMT, cMAP amplitude, SICI, SAI dell'emisfero sano quando le risposte elettrofisiologiche non possono essere evocate nel lato lesa, mentre comprendono le stesse valutazioni su ambedue gli emisferi più l'effettuazione di una iTBS su lato lesa seguita dalla registrazione di MEP, RMT e AMT bilaterali post iTBS quando le risposte possono essere evocate in entrambi gli emisferi. La valutazione è stata effettuata utilizzando uno stimolatore magnetico (Magstim e co), uno stimolatore elettrico (Digitimer) ed un coil focale di 9 mm. Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato il sistema *Cambridge Electronic Design (CED) Signal*. Per l'erogazione della stimolazione magnetica transcranica ripetitiva (rTMS), secondo il protocollo iTBS, è stato utilizzato il sistema DUOMAG®. Le risposte motorie evocate venivano quindi registrate dal muscolo primo interosseo dorsale (FDI).

Una volta ritenuto idoneo il paziente è stato sottoposto alla prima valutazione (Tempo T-2). Alla fine della valutazione il paziente è stato assegnato, attraverso il sistema randomizzato casuale, ad uno dei due gruppi di studio:

- **Gruppo REAL stimulation:** Trattamento robotico con ArmeoPower® associato a tDCS REAL (anodica sull'emisfero lesa + catodica sull'emisfero sano)
- **Gruppo SHAM stimulation:** Trattamento robotico con ArmeoPower® associato a tDCS SHAM

Il dispositivo **ArmeoPower®** è un robot di tipo esoscheletrico per la rieducazione dell'arto superiore in grado di far eseguire al paziente movimenti del comparto prossimale (movimenti di spalla-gomito) e distale (movimenti del polso) dell'arto superiore. Una volta adattati i bracci del robot all'arto superiore del paziente, l'esoscheletro viene montato e settato per definire le aree di azione ed i volumi di esplorazione.



Fig. 2: ArmeoPower®

All'inizio di ogni seduta, si è provveduto al montaggio dell'esoscheletro dell'ArmeoPower® secondo i settaggi salvati per ogni paziente, operazione che richiede circa 10 minuti. A robot montato, si è proceduto alla stimolazione t-DCS real o sham, a seconda del gruppo di appartenenza.

I pazienti del gruppo REAL stimulation venivano sottoposti, subito prima di ogni seduta di trattamento robotico, a stimolazione con tDCS real mentre i pazienti del gruppo SHAM stimulation hanno eseguito il trattamento con la piattaforma robotica con le medesime caratteristiche di intensità e durata del gruppo 1 ma preceduto dalla stimolazione tDCS SHAM.

- **La t-DCS real** prevede l'applicazione dell'anodo sulla corteccia motoria (M1) lesa e del catodo sulla corteccia motoria (M1) sana, in modo tale da eseguire contemporaneamente una soppressione dell'eccitabilità dell'emisfero sano ed una attivazione della corteccia lesionata dall'ischemia. Le cortecce motorie vengono stimulate contemporaneamente ad una intensità pari a 1 mA e per una durata massima di 20 minuti.
- **La t-DCS combinata sham** prevede l'applicazione degli elettrodi nelle medesime posizioni e per la stessa durata, ma senza che

venga erogata una stimolazione elettrica.

Il trattamento riabilitativo robotico veniva iniziato immediatamente dopo il termine della stimolazione, ed il trattamento effettivo prevede una durata di 30 minuti. Il robot è in grado di alleviare il peso del braccio e assistere il paziente durante l'esecuzione motoria. Il paziente vedeva su di un monitor il target su cui deve spostare l'effettore ed esegue il movimento tramite l'assistenza attiva del robot che compensa i deficit motori del paziente. Venivano effettuati esercizi tipo game ed esercizi funzionali di training delle attività di vita quotidiane con feedback visivo, acustico, di performance. Un fisioterapista con un certificato di training specifico è sempre presente alle sedute che avvengono in rapporto 1:1 con i pazienti.

Ogni paziente ha eseguito 5 sedute settimanali per due settimane consecutive, al termine delle quali è stata eseguita la valutazione prevista al tempo T0; il paziente è stato quindi rivalutato in follow up ad 1 mese (T1) e dopo 3 mesi dalla fine del trattamento (T2).

Le variabili numeriche (età, punteggi delle scale cliniche, RMT, AMT, MEP) sono state espresse come media aritmetica \pm deviazione standard. Il livello di significatività è stato definito con una soglia pari a 0.05.

Il confronto fra i gruppi (real vs sham stimulation) sia per i parametri neurofisiologici che per le scale cliniche è stato realizzato attraverso un ANOVA (Analysis of Variance) per misure ripetute con i fattori tempo (T-2, T-1, T0, T1, T2) e soggetto (real vs sham), correggendo per l'età. Ove non diversamente specificato, il test di sfericità di Mauchly è risultato non significativo; in caso contrario è stata applicata correzione di Greenhouse-Geisser.

Le correlazioni fra i dati sono state realizzate attraverso il test di Spearman.

Per tutte le analisi statistiche è stato utilizzato il software SPSS (IBM Corp., Armonk, New York, USA, Version 24).

Risultati

Sono stati reclutati 38 pazienti (21 Femmine, 17 Maschi; Età media 58 anni \pm 12; Rapporto ictus emisferico Destro/Sinistro: 24/14; Mesi in media da ictus 31 \pm 27). 22 pazienti sono stati inseriti al gruppo REAL e 16 al gruppo SHAM; i due gruppi risultano appaiati per età, sesso e caratteristiche cliniche (NIHSS REAL/SHAM: 3,7/3,8; Fugl-Meyer REAL/SHAM: 20,4/22,9; Barthel Index REAL/SHAM: 83,7/80,1).

Il trattamento (t-DCS + riabilitazione con ArmeoPower®) ha determinato un significativo miglioramento in tutti i parametri clinici misurati ($p < 0,001$).

Il confronto tra gruppi non ha documentato significative differenze tra i pazienti trattati con t-DCS REAL e quelli con t-DCS SHAM ($p > 0,05$).

Lo studio dell'eccitabilità corticale è stato condotto su tutti i pazienti (a 15 pazienti lo studio è stato esteso all'emisfero affetto). Non si sono evidenziate significative modificazioni nell'eccitabilità corticale tra gruppo REAL e gruppo SHAM né prima né dopo intervento riabilitativo (t-DCS + riabilitazione con ArmeoPower®) ($p > 0,05$) (Tab. 2).

Al fine di identificare eventuali fattori predittivi positivi di risposta al trattamento i pazienti del gruppo REAL sono stati divisi in Responders (aumento \geq 5 punti della scala Fugl-Meyer) e Non Responders (aumento $<$ 5 punti della scala Fugl-Meyer). Non sono state evidenziate differenze significative in nessuno dei parametri clinici ed elettrofisiologici considerati ($p > 0,05$).

L'ampiezza dei cMAP amplitude nell'emisfero sano è risultato nettamente più elevata nel gruppo dei Responders rispetto ai Non Responders (1321 mV vs. 725 mV) anche se tale differenza non risulta statisticamente significativa probabilmente a causa dell'elevata variabilità interindividuale ($p = 0,161$) (Tab. 3).

Emisfero Affetto	REAL		SHAM		Confronto REAL/SHAM
	Pre	Post	Pre	Post	<i>p</i>
RMT	65,57 ± 31,81	62,57 ± 30,23	53,75 ± 28,67	55,62 ± 29,73	0,251
AMT	53,14 ± 26,16	51 ± 24	41,5 ± 22,62	46,75 ± 24,99	0,107
cMAP	1176 ± 827	1059 ± 748	479 ± 360	248 ± 208	0,501
SICI	0,48 ± 0,26	0,59 ± 0,27	0,73 ± 0,37	0,96 ± 0,53	0,54
SAI	0,92 ± 0,45	0,92 ± 0,43	1,14 ± 0,60	1,06 ± 0,55	0,48

Emisfero Sano	REAL		SHAM		Confronto REAL/SHAM
	Pre	Post	Pre	Post	<i>p</i>
RMT	59,68 ± 12,11	59,04 ± 14,23	51,12 ± 9,9	51,87 ± 10,75	0,625
AMT	45 ± 11,67	44,09 ± 12,45	39,25 ± 8,28	40,68 ± 7,86	0,293
cMAP	1004 ± 963	1028 ± 1084	1472 ± 1573	1338 ± 1092	0,649
SICI	0,42 ± 0,37	0,67 ± 0,67	0,63 ± 0,43	0,66 ± 0,47	0,302
SAI	0,51 ± 0,28	0,62 ± 0,35	0,69 ± 0,28	0,71 ± 0,34	0,401

Tab. 2: Dati neurofisiologici.

Emisfero Sano	RESPONDERS		NON RESPONDERS		Confronto RESPONDERS/NON
	Pre	Post	Pre	Post	<i>p</i>
RMT	56,9 ± 14,62	58,45 ± 14,99	61 ± 7,74	57 ± 11,95	0,91
AMT	44,54 ± 14,67	46,09 ± 14,45	44 ± 7,47	40,3 ± 9	0,361
cMAP	1321 ± 1208	1098 ± 1402	725 ± 527	1043 ± 678	0,161
SICI	0,45 ± 0,44	0,82 ± 0,88	0,42 ± 0,31	0,58 ± 0,42	0,372
SAI	0,53 ± 0,33	0,66 ± 0,36	0,52 ± 0,25	0,59 ± 0,39	0,789

Emisfero Affetto	RESPONDERS		NON RESPONDERS		Confronto RESPONDERS/NON
	Pre	Post	Pre	Post	<i>p</i>
RMT	64 ± 33	64,25 ± 33	68,5 ± 29	58 ± 24	0,99
AMT	52,25 ± 27,8	50,75 ± 26,67	52,5 ± 22,34	49 ± 20	0,95
cMAP	1594 ± 1097	1336 ± 998	876 ± 395	868 ± 378	0,64
SICI	0,69 ± 0,35	0,57 ± 0,27	0,35 ± 0,14	0,55 ± 0,23	0,43
SAI	1,14 ± 0,54	1,01 ± 0,47	0,88 ± 0,38	0,92 ± 0,39	0,28

Tab. 3: Dati neurofisiologici responders/non responders.

Conclusioni

Il nostro studio dimostra come la terapia riabilitativa robotica, anche a distanza di anni, possa determinare un significativo miglioramento della performance motoria in maniera clinicamente significativa (Miglioramento ≥ 5 punti della scala Fugl-Meyer). Questo dato trova conferma nei risultati di altri studi^{10, 11} dove si riportava un modesto ma sostanziale miglioramento della performance motoria in pazienti con stroke cronico sottoposti a trattamento riabilitativo robot-mediato ad alta intensità per 12 settimane.

Come riscontrato anche in recenti pubblicazioni¹⁰, il nostro studio mette in luce come trattamenti riabilitativi di breve durata (10 giorni), portino ad un beneficio clinico comparabile a quello ottenuto tramite trattamenti riabilitativi di durata notevolmente maggiore (> 12 settimane). Questo potrebbe essere un risvolto importante nel campo della pianificazione della neuroriabilitazione post ictus, aprendo così la possibilità della scelta di iter riabilitativi più brevi e meno impegnativi per il paziente.

Un altro dato clinico importante, suggerito dal nostro lavoro, è quello dell'evidenza di miglioramento di numerose scale cliniche (Barthel, Ashworth, NIH, VAS) fondamentali nella qualità di vita del paziente. Il trattamento riabilitativo robotico, quindi, non andrebbe solamente a migliorare la performance motoria, ma porterebbe un beneficio globale al paziente che si ripercuote sull'autonomia del soggetto.

La tDCS non sembra determinare un guadagno aggiuntivo rispetto al trattamento robotico, questo dato è in accordo con le osservazioni di numerosi altri trial che giungono allo stesso risultato^{10, 12}. Una possibile spiegazione a questa mancanza di efficacia potrebbe essere il cosiddetto "*Ceiling Effect*", per il quale già il trattamento robotico, da solo, porterebbe ad un miglioramento talmente importante della performance motoria dell'arto superiore da non poter essere implementato dall'associazione con tecniche di stimolazione transcranica non invasive.

Un ulteriore possibile spiegazione deriverebbe dal fatto che non tutti i pazienti possano giovare dalle medesime tecniche di stimolazione, queste dovrebbero essere scelte in base a differenti parametri propri di ogni soggetto⁶. I nostri dati si trovano in linea con questa osservazione: i pazienti del gruppo REAL con risposta clinica migliore sono quelli che, alla valutazione pre trattamento, presentavano i cMAP più elevati nell'emisfero sano, indice di una iperattivazione corticale. Questi pazienti, quindi, sarebbero i candidati ideali per protocolli di stimolazione non invasiva di tipo inibitorio (t-DCS), al contrario di quelli con cMAP ad ampiezza minore che potrebbero trarre giovamento da altri protocolli di stimolazione. Dobbiamo quindi cercare di abbandonare il concetto di "one-size-fit-all" passando ad un più preciso modello di riabilitazione "tailored" sul paziente.

Alla luce di questo sembra quindi idoneo continuare la ricerca in questo campo andando però a implementare i successivi studi con delle ulteriori caratterizzazioni. Ulteriori parametri da poter valutare comprendono indagini Neurofisiologiche, con una possibile stratificazione sulla base dei cMAP¹³, indagini Neuroradiologiche, con studi fMRI per la valutazione della connettività cerebrale¹⁴ o studi di RM per la valutazione della sede di lesione, e Genetiche, andando a ricercare la eventuale presenza del polimorfismo Val66Met del BDNF¹⁵.

BIBLIOGRAFIA

1. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: Findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2014; 383: 245-54.
2. Rossini PM, Tecchio F, Pizzella V, Lupoi D, Cassetta E, Pasqualetti. Interhemispheric differences of sensory hand areas after monohemispheric stroke: MEG/MRI integrative study. *Neuroimage* 2001; 14: 474-85.
3. Murphy TH, Corbett D. Plasticity during stroke recovery: From synapse to behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10: 861-72.
4. Cramer SC, Nelles G, Benson RR, et al. A functional MRI study of subjects recovered from hemiparetic stroke. *Stroke* 1997; 28: 2518-27.
5. Murase N, Duque J, Mazzocchio R, Cohen LG. Influence of Interhemispheric Interactions on Motor Function in Chronic Stroke. *Ann Neurol* 2004; 55: 400-9.
6. Di Pino G, Pellegrino G, Assenza G, et al. Modulation of brain plasticity in stroke: A novel model for neurorehabilitation. *Nat Rev Neurol* 2014; 10: 597-608.
7. Nitsche MA, Paulus W. Excitability changes induced in the human motor cortex by weak transcranial direct current stimulation. *J Physiol* 2000; 527: 633-9.
8. Nitsche MA, Nitsche MS, Klein CC, Tergau F, Rothwell JC, Paulus W. Level of action of cathodal DC polarisation induced inhibition of the human motor cortex. *Clin Neurophysiol* 2003; 114: 600-4.

9. Ranieri F, Podda MV, Riccardi E, et al. Modulation of LTP at rat hippocampal CA3-CA1 synapses by direct current stimulation. *J Neurophysiol* 2019; 107: 1868-80.
10. Di Lazzaro V, Capone F, Di Pino G, et al. Combining robotic training and non-invasive brain stimulation in severe upper limb-impaired chronic stroke patients. *Front Neurosci* 2016; 10: 88.
11. Lo AC, Guarino PD, Richards LG, et al. Robot-Assisted Therapy for Long-Term Upper-Limb Impairment after Stroke. *N Engl J Med* 2010; 362: 1772-83.
12. Triccas LT, Burridge J, Hughes AM, Verheyden G, Desikan M, Tothwell JC. A double-blinded randomised controlled trial exploring the effect of anodal transcranial direct current stimulation and uni-lateral robot therapy for the impaired upper limb in sub-acute and chronic stroke. *NeuroRehabilitation* 2015; 37, 181-91.
13. Edwards DJ, Cortes M, Rykman-Peltz A, et al. Clinical improvement with intensive robot-assisted arm training in chronic stroke is unchanged by supplementary tDCS. *Restor Neurol Neurosci* 2019; 37: 167-80.
14. Ovadia-Caro S, Khalil AA, Sehm B, Villringer A, Nikulin VV, Nazarova M. Predicting the response to noninvasive brain stimulation in stroke. *Front Neurol* 2019; 10: 302.
15. Di Pino G, Pellegrino G, Capone F, et al. Val66Met BDNF Polymorphism Implies a Different Way to Recover from Stroke Rather Than a Worse Overall Recoverability. *Neurorehabilitation Neural Repair* 2016; 30: 3-8.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 25 luglio 2019

Dott. Alessandro Cruciani, Corso di Laurea
Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di
Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-
Medico di Roma

Prof. Vincenzo Di Lazzaro, Professore
Ordinario di Neurologia, Direttore Scuola di
Specializzazione in Neurologia, Università
Campus Bio-Medico di Roma

Dott. Fioravante Capone, Dirigente Medico
Neurologia, Campus-Biomedico, Roma

Per la corrispondenza:
AlessandroCruciani93@hotmail.it

Tesi di Laurea: “Inibizione dell’Interleuchina-1 nell’infarto miocardico acuto con sopraslivellamento del tratto ST (STEMI)” (Sintesi)

Autore: L. Matrangolo

Relatore: G. Di Sciascio

Correlatori: A. Abbate, A. Nusca

L'infarto miocardico acuto (IMA) è una condizione di necrosi miocardica definita patologicamente come morte cellulare miocardica in seguito ad una prolungata ischemia¹.

L'IMA rimane una delle cause più significative di morbilità e mortalità in tutto il mondo, con un'incidenza di circa 200 per 100.000, una mortalità a 30 giorni di circa il 10% e costituisce un onere economico significativo²⁻⁴.

L'insufficienza cardiaca che complica l'infarto del miocardio è comune e, durante il ricovero per infarto miocardico, è un importante fattore predittivo di outcomes clinici a breve e lungo termine. Vari studi hanno tentato di esaminare i fattori di rischio per ospedalizzazione dopo IMA⁵⁻¹². Nonostante l'utilizzo della rivascolarizzazione coronarica precoce, che ha migliorato gli esiti clinici durante l'ospedalizzazione per IMA¹³, l'incidenza di scompenso durante infarto miocardico è riportata dal 20% al 30% nei registri contemporanei⁹⁻¹³ e rappresenta una delle principali fonti di morbilità intraospedaliera, aumento della durata della degenza, riammissione in ospedale e costi elevati⁷⁻¹⁵.

Lo scompenso cardiaco (HF) si può manifestare al momento del ricovero, può svilupparsi durante o dopo lo stesso.

Lo sviluppo di HF durante il ricovero è stato associato a un più alto rischio di mortalità ospedaliera (5,8% contro 1,1% in pazienti senza scompenso cardiaco, $p < 0,0001$) e maggiore durata di degenza¹⁶.

Un determinante importante nello sviluppo di scompenso cardiaco e comparsa

di morte è la dimensione dell'infarto successiva allo STEMI; pazienti con un infarto più esteso presentano un aumentato rischio di insufficienza cardiaca sintomatica e morte^{17, 18}. L'area a rischio (AAR) è la regione del letto del miocardio fornita dall'arteria correlata all'infarto (IRA).

Nell'era della riperfusione, non tutta la AAR diventerà infartuata. A seconda del tempo di riperfusione e della posizione esatta dell'occlusione, ci sarà una porzione dell'AAR (messa a repentaglio ma non infartuata¹⁹) che può essere salvata con la terapia di riperfusione. Questo può essere calcolato come AAR-infarct size. Evidenze indicano che il meccanismo che porta dall'IMA a HF consiste in un rimodellamento negativo, derivante da una risposta infiammatoria esagerata che ha inizio durante l'ischemia e la riperfusione precoce^{20, 21}. Inoltre numerosi studi hanno dimostrato una correlazione tra elevati livelli circolanti di citochine pro-infiammatorie ed eventi clinici avversi nel contesto dello scompenso cardiaco²²⁻²⁴.

Una delle molecole infiammatorie più importanti coinvolte nello sviluppo dello scompenso cardiaco è l'interleuchina-1 (IL-1). L'evidenza principale che ha portato ad ipotizzare il percorso dell'IL-1 come una chiave dei disordini auto-infiammatori sta nel fatto che i livelli ematici di IL-1 rilasciati dai monociti circolanti, dai macrofagi tissutali e dalle cellule dendritiche a seguito del danno cellulare, sono significativamente più alti di quelli di soggetti sani²⁵⁻²⁸. La ragione può essere dedotta non solo dalla peculiare capacità dell'IL-1 di stimolare la propria sintesi da parte delle cellule su cui agisce, ma

anche dal fatto che ci sono altri tipi di stimolazione (in primis ATP) che contribuiscono all'amplificazione e alla perpetuazione del processo infiammatorio IL-1-mediato²⁹.

Evidenze hanno mostrato non solo il coinvolgimento dell'IL-1 nel processo di rimodellamento ventricolare post-infartuale, ma anche l'impatto positivo dell'inibizione del pathway dell'IL-1 sul processo di rimodellamento, sia a livello preclinico che clinico. I modelli di base hanno sostanzialmente dimostrato come l'inibizione dell'inflammasoma³⁰ e dell'IL-1 (a livello genetico³¹ o farmacologico^{32, 33}) migliori significativamente il rimodellamento ventricolare e preservi, almeno in parte, la funzionalità cardiaca.

Questi promettenti risultati hanno portato a studi clinici con Anakinra (antagonista del recettore IL-1) in pazienti con IMA, sia STEMI (VCU-ART e VCU-ART2, Virginia Commonwealth University - Anakinra Remodeling Trial 1 e 2), e NSTEMI (MRC -ILA-HEART):

- VCU-ART / VCU-ART2: comprendevano 10 e 30 pazienti IMA-STEMI, prontamente rivascolarizzati e stabilizzati prima di essere inclusi nello studio e randomizzati ad Anakinra 100 mg / die per 14 giorni o placebo. I pazienti randomizzati con Anakinra hanno mostrato una diminuzione significativa della risposta infiammatoria (valutabile con una significativa riduzione dei livelli plasmatici di PCR), così come una riduzione dell'incidenza di scompenso cardiaco a 3 mesi, mentre nessun effetto statisticamente significativo del farmaco è stato dimostrato sui parametri di rimodellamento ventricolare (LVESVi - volume ventricolare sinistro tele-sistolico, LVEDVi - volume ventricolare sinistro tele-diastolico) rispetto al placebo^{34, 35} (Fig. 1). Per quanto riguarda i 40 pazienti in questi due studi pilota, i dati a lungo termine (follow-up mediano di 28 mesi) mostrano un effetto neutro

sulla riduzione degli eventi ischemici ricorrenti, ma soprattutto una riduzione del rischio di scompenso cardiaco post-IMA anche a lungo termine (e non solo a 3 mesi come originariamente riportato)³⁶.

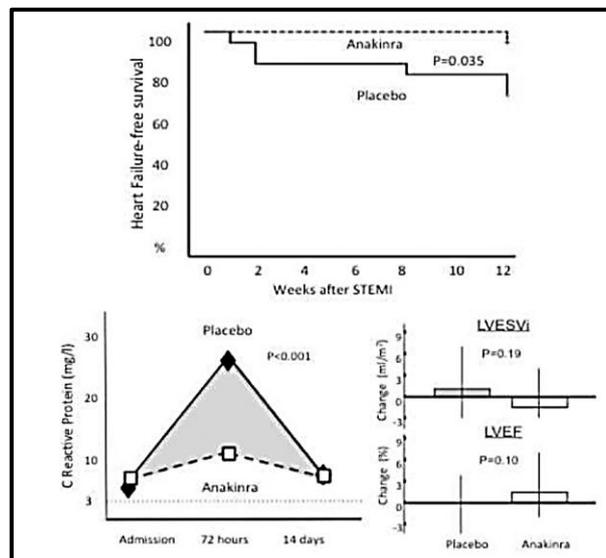


Fig. 1: Risultati del VCU-ART/VCU-ART2, tradotto da Van Tassell, Abbate et al. "Targeting interleukin-1 in heart disease." (Circulation, 2013)

- MRC-ILA-HEART: questo studio ha randomizzato 182 pazienti con IMA-NSTEMI, entro 48 ore dall'esordio dei sintomi, con Anakinra 100 mg / die per 14 giorni o placebo. I risultati hanno dimostrato come, considerando l'AUC (Area Under the Curve) per la PCR come parametro di valutazione, nelle prime due settimane il trattamento ha contribuito significativamente a disattivare la risposta infiammatoria post-infartuale, dimostrando come il pathway dell'IL-1 sia coinvolto in un aumento dei livelli di PCR in pazienti con IMA-NSTEMI³⁷.

Alcuni studi suggeriscono anche un ruolo prognostico dei livelli circolanti pre-procedurali di IL-1Ra (antagonista del recettore IL-1) in pazienti con cardiopatia coronarica che si sottopongono a PCI, che potrebbe identificare quei pazienti che

hanno più probabilità di avere eventi post-procedurali: in particolare, i pazienti con elevati livelli di IL-1Ra pre-procedurali hanno un aumento non significativo dei principali eventi avversi cardiovascolari, mentre i pazienti con bassi livelli di IL-1Ra non hanno avuto eventi simili a 18 mesi di follow-up³⁸. Inoltre, è stato dimostrato che i livelli circolanti di IL-1Ra correlano in modo significativo con l'estensione della necrosi miocardica, misurata dal picco plasmatico degli enzimi cardiaci e dalla riduzione di LVEF e sono anche predittivi di eventi avversi intraospedalieri³⁹.

Metodi

Anakinra (Kineret®, Swedish Orphan Biovitrum, Stockholm, Sweden) è una variante ricombinante non glicosilata dell'IL-1Ra umana (antagonista del recettore IL-1), dalla quale differisce solo per un'aggiunta di metionina nel residuo N-terminale. Come variante ricombinante della IL-1Ra fisiologica, Anakinra lega il recettore IL-1 ed esercita una forte attività inibitoria sia contro IL-1 α che IL-1 β , senza effetti off-target osservabili⁴⁰.

Anakinra è approvato per l'artrite reumatoide attiva e per la CAPS (Sindrome periodica associata alla criopirina).

La Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial-3 (VCU-ART3) è uno studio clinico di fase II, multicentrico, a doppio cieco, randomizzato, controllato con placebo. Sono stati arruolati 99 pazienti, trattati entro 12 ore dall'angiografia/angioplastica coronarica ed entro 24 ore dall'esordio del dolore toracico. I pazienti sono stati randomizzati con rapporto 1:1:1 in tre gruppi: un gruppo di pazienti (31) ha ricevuto Anakinra 100 mg due volte al giorno per 14 giorni; un secondo gruppo (33) ha ricevuto Anakinra 100 mg alternati a placebo due volte al giorno per 14 giorni, quindi Anakinra veniva di fatto somministrato ogni 24 ore; un terzo gruppo (35) ha ricevuto placebo due volte al giorno per 14 giorni (Fig. 2).

Lo studio ha arruolato pazienti con età ≥ 21 anni, presentatisi all'ospedale con STEMI acuto, definito come dolore toracico o equivalente con evidenza elettrocardiografica di elevazione del segmento ST (> 1 mm) in ≥ 2 derivazioni anatomicamente contigue e sottoposti ad angiografia coronarica per un potenziale intervento entro 12 ore dall'inizio dei sintomi. I pazienti venivano esclusi se in presenza di uno dei seguenti criteri:

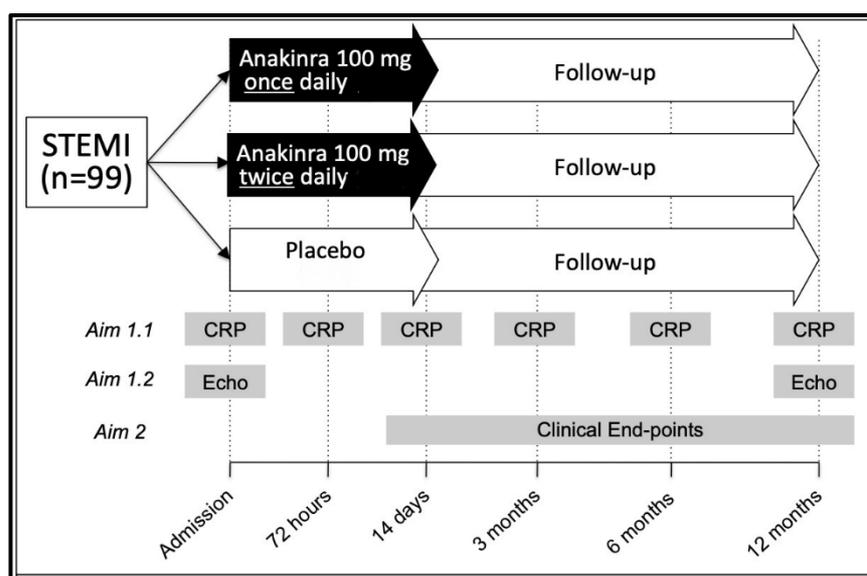


Fig. 2: Virginia Commonwealth University Anakinra Remodelling Trial-3 (VCU-ART3).

- Incapacità di dare il proprio consenso informato
- Gravidanza
- Insufficienza cardiaca congestizia preesistente (classe AHA / ACC C-D, New York Heart Association III-IV)
- Disfunzione ventricolare sinistra grave preesistente (FE <20%)
- Cardiopatia valvolare grave preesistente
- Infezioni attive (acute o croniche) – escludendo HCV + con RNA non rilevabile
- Recente (<14 giorni) o uso attivo di farmaci anti-infiammatori (esclusi i FANS o i corticosteroidi utilizzati solo per l'allergia al mezzo di contrasto ev)
- Malattia cronica autoimmune o autoinfiammatoria (incluso ma non limitato all'artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico)
- Cancro attivo (escluso cancro cutaneo localizzato)
- Necessità di cardio-chirurgia
- Neutropenia (conta assoluta dei neutrofili <1.800 / mm³ [o <1.000 / mm³ in pazienti afro-americani])
- Grave compromissione della funzionalità renale (velocità di filtrazione glomerulare stimata <30 ml / kg * min)
- Allergia alla gomma o al lattice
- Allergia a prodotti derivati da Escherichia coli

End-point primario

L'end-point primario dello studio è la differenza nell'area sotto la curva (AUC) per la PCR dal ricovero al giorno 14 comparando Anakinra 100 mg al giorno e Anakinra 100 mg due volte al giorno rispetto al placebo.

I pazienti che presentano STEMI hanno una più marcata risposta dell'IL-1 valutata tramite l'elevazione dei marcatori sierici come la PCR, portando ad eventi clinici avversi. Questo studio considera Anakinra (dose standard) in grado di ridurre i livelli di

PCR durante lo STEMI, come osservato negli studi pilota; Anakinra (dose elevata) è in grado di ridurre ulteriormente la PCR rispetto al placebo e Anakinra dose standard.

End-point secondari

Gli end-point aggiuntivi includono i parametri misurati all'ecocardiografia, i livelli di biomarcatori valutati in acuto e al follow-up e gli outcomes clinici. In particolare mediante l'ecocardiografia transtoracica sono stati valutati il volume telediastolico ventricolare sinistro (LVEDV), il volume ventricolare telesistolico sinistro (LVESV), stroke volume (SV), la frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF), lo spessore ventricolare, la funzione sistolica ventricolare sinistra e destra, il flusso transmitralico, il doppler tissutale dell'annulus della valvola mitralica e tricuspidalica, il diametro della vena cava inferiore, dell'aorta e dell'arteria polmonare.

Outcomes clinici:

Incidenza di morte (cardiaca e non cardiaca) e la ricorrenza di ospedalizzazioni (per scompenso cardiaco, per altre cause cardiache non correlate allo scompenso o per ragioni non cardiache) sono state registrate in tutte le fasi dello studio (dimissione, 2 settimane, 3, 6 e 12 mesi) per ogni paziente, e anche successivamente alla fine dello studio, tramite revisione di un grafico e / o intervista telefonica.

Un comitato indipendente dedicato ha giudicato gli eventi clinici tra cui la morte, l'insufficienza cardiaca e l'ospedalizzazione per scompenso cardiaco.

Risultati

Lo screening è iniziato il 28 luglio 2014 e si è concluso il 27 dicembre 2017. Sono stati valutati complessivamente 311 pazienti in 3 centri diversi e 99 sono stati randomizzati nei 3 diversi gruppi: Anakinra una volta al giorno (dose standard, N = 33 [33%]), Anakinra due volte al giorno (dose alta, N = 31 [31%]) o placebo (N = 35 [36%]). Le principali ragioni di esclusione sono state il rifiuto del paziente

(N = 53), l'incapacità di fornire il consenso (N = 39), la presenza di infezione attiva o cronica (N = 27), un'anamnesi per cancro attivo o recente (N = 23). Tutti i 99 pazienti (100%) hanno ricevuto almeno 1 dose di farmaco sperimentale, e 77 (78%) disponevano dei valori dei biomarcatori per il follow-up iniziale, al momento del ricovero e a 2 settimane, consentendo la valutazione dell'end-point primario di PCR-AUC. Il follow-up clinico è stato eseguito in tutti i 99 soggetti (100%) da 3 a 365 giorni, con una durata media di 365 [287-365] giorni; 71 pazienti (72%) hanno completato un follow-up di almeno 365 giorni mentre 87 (88%) un follow-up maggiore di 180 giorni.

Effetti della somministrazione di Anakinra sugli indici di infiammazione

L'area sotto la curva per PCR (PCR-AUC) è stata utilizzata come misura della risposta infiammatoria sistemica acuta durante STEMI e come end-point primario per lo studio.

L'AUC per la PCR era significativamente più bassa nel gruppo Anakinra (entrambe le dosi combinate) rispetto al gruppo placebo (67 [39-120] contro 214 [131-394] mg • giorno / L, $P < 0,001$ e $P < 0,001$ per ogni braccio di Anakinra versus placebo separatamente, senza differenze significative tra i due bracci di Anakinra, $P = 0.41$) (Fig. 3).

Effetti sulle dimensioni del ventricolo sinistro e sulla funzione sistolica

I dati ecocardiografici sono risultati disponibili per 66/99 pazienti (67%) con una media di 362 giorni [336-375] dalla randomizzazione: 25/35 (71%) pazienti con placebo e 41/64 (64%) pazienti con Anakinra (entrambe le dosi combinate).

Il volume tele-diastolico ventricolare sinistro (LVEDV), il volume tele-sistolico del ventricolo sinistro (LVESV), lo stroke volume (SV) e la frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) non sono risultate significativamente differenti tra placebo e Anakinra (tutti $P > 0,05$).

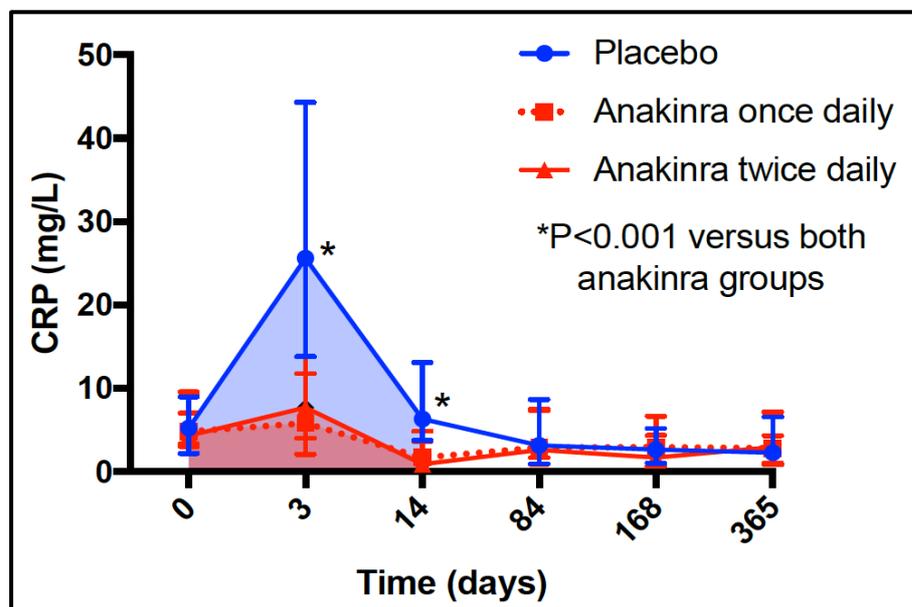


Fig. 3: Effetti dell'Anakinra sulla PCR. Anakinra una volta al giorno o due volte al giorno ha ridotto significativamente l'area sotto la curva per la proteina C-reattiva ad alta sensibilità (AUC CRP) a 14 giorni (aree ombreggiate) ($P < 0,001$ per ciascun gruppo di Anakinra rispetto a placebo, $P < 0,001$ per Anakinra gruppi combinati rispetto a placebo). Non abbiamo riscontrato differenze significative tra i regimi Anakinra una volta al giorno e due volte al giorno.

* $P < 0,001$ per il placebo rispetto a entrambi i gruppi di Anakinra.

I pazienti trattati con Anakinra hanno presentato un significativo miglioramento dal baseline al follow-up all'interno del gruppo LVEF dal 49,8% [42,6-55,4%] al 54,3% [46,3-58,1%] (P = 0,007) e SV da 43,4 ml [37,2-52,1 ml] a 48,8 ml [41,1-62,5 ml] (P = 0,001), mentre non ci sono stati cambiamenti significativi all'interno del gruppo placebo. Inoltre i pazienti trattati con Anakinra hanno presentato un miglioramento significativo dello stroke work (SW), SW normalizzato a LVEDV (rapporto SW / LVEDV) ed SW efficiency (misurato come SW diviso l'intero lavoro) rispetto al placebo. Considerando i risultati ottenuti al baseline e successivamente a 12 mesi, nell'ambito dello stesso gruppo Anakinra si osservava un netto miglioramento di questi parametri ecocardiografici, mentre non si osservavano cambiamenti per LVEDV e LVESV in entrambi i gruppi. Cinque dei 66 pazienti (8%) hanno mostrato una riduzione di LVEF > 10% al follow-up, 1 nel gruppo trattato con Anakinra (2%) e 4 nel gruppo trattato con placebo (16%, P = 0,064) (Fig. 4).

Effetti sugli eventi clinici

Si è verificato un decesso (3%) nel gruppo placebo mentre nessuno nel gruppo Anakinra. Il trattamento con Anakinra è stato associato ad una significativa riduzione rispetto al placebo nell'incidenza dell'end-point composito di morte per qualsiasi causa e peggioramento/nuova insorgenza di insufficienza cardiaca (6/64 [9,4%] contro 9/35 [25,7%], Chi-Quadro = 3,995, P = 0,041), nonché una riduzione dell'end-point composito di morte, dovuta a qualsiasi causa, e ospedalizzazione per insufficienza cardiaca (0/64 [0] contro 4/35 [11,4%], Chi-quadro = 6.516, P = 0.014), senza alcuna differenza significativa tra i due bracci di Anakinra. Non ci sono state differenze nei principali eventi avversi cardiaci quali morte, IMA ricorrente o rivascolarizzazione urgente: 6 nel gruppo Anakinra (9%) e 5 (14%) nel gruppo placebo (P > 0.05). Il trattamento con Anakinra è stato ben tollerato senza eventi avversi gravi non previsti. 9 pazienti nel gruppo Anakinra (14%)

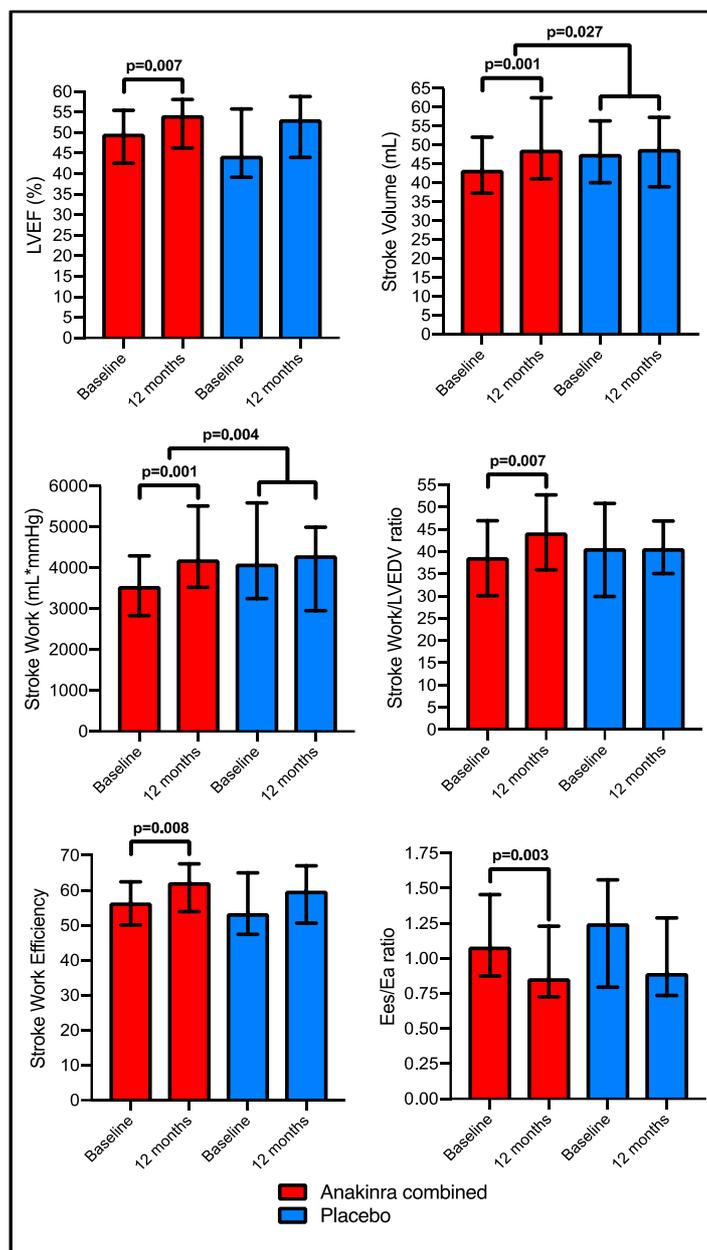


Fig. 4: Effetti di Anakinra sulla funzione cardiaca. I pazienti trattati con Anakinra hanno sperimentato un miglioramento significativo della frazione di eiezione ventricolare sinistra (LVEF) e dello stroke volume (SV), mentre non si sono verificati cambiamenti significativi nel gruppo placebo. Anche i pazienti trattati con Anakinra hanno avuto un miglioramento significativo nello stroke work (SW), SW normalizzato a LVEDV (rapporto SW / LVEDV) e SW efficiency (misurato come SW sull'intero lavoro) e accoppiamento ventricolare-arterioso. Le differenze tra i gruppi che confrontano i cambiamenti tempo-dipendente dell'Anakinra rispetto a placebo hanno raggiunto un significato statisticamente valido per SV e SW ma non per LVEF, SW / LVEDV ratio o SW efficiency.

e 5 nel gruppo placebo (14%, $P = 0,98$) hanno presentato un'infezione grave che ha richiesto la prescrizione di un farmaco antimicrobico, tutti considerati non correlati al trattamento sperimentale (Tab. 1). Le reazioni al sito di iniezione erano significativamente più comuni nel gruppo Anakinra rispetto al placebo (16/64 [22%] versus 1/35 [3%], $P = 0,016$), portando a interruzione precoce del trattamento in 6 pazienti trattati con Anakinra (9 %) e 1 paziente trattato con placebo (3%, $P = 0,419$). Non c'è stata alcuna differenza significativa in nessuno degli end-point che confrontava Anakinra una volta al giorno con Anakinra due volte al giorno (Fig. 5).

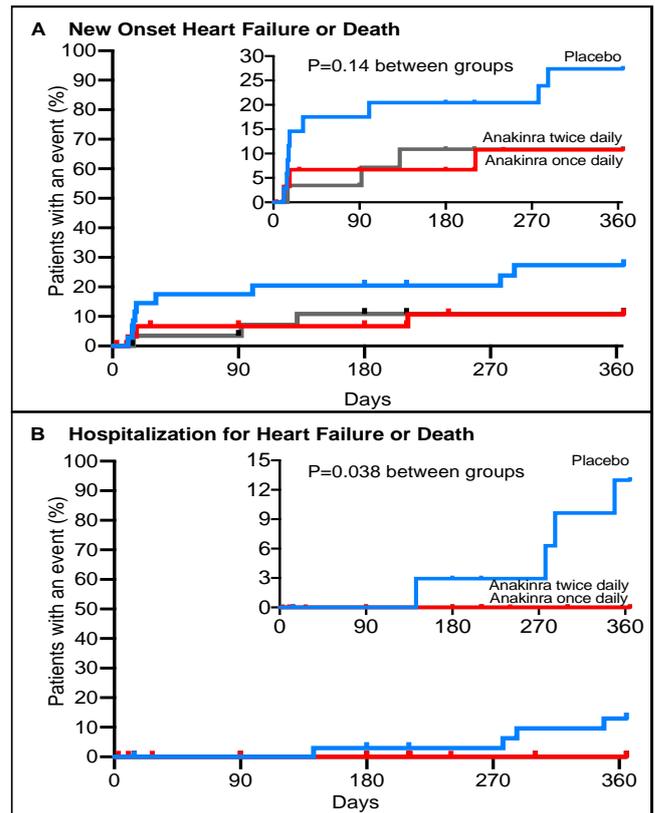


Fig. 5: Effetti dell'Anakinra sullo scompenso cardiaco. I pazienti trattati con Anakinra presentavano un'incidenza significativamente più bassa di eventi clinici correlati allo scompenso cardiaco rispetto al placebo.

Outcome	Anakinra once daily (N=33)	Anakinra twice daily (N=31)	Placebo (N=35)	<i>P</i> between groups	Anakinra combined (N=64)	<i>P</i> versus placebo
Death (%)	0	0	1 (3%)	0.40	0	0.17
Death or hospitalization for heart failure (%)	0	0	4 (11%)	0.022	0	0.014
Death, new onset or worsening heart failure, (including outpatient and hospitalization)(%)	3 (9%)	3 (10%)	9 (26%)	0.09	6 (9%)	0.041
Death or recurrent acute myocardial infarction or urgent revascularization (%)	5 (15%)	1 (3%)	5 (14%)	0.24	6 (9%)	0.51
Death or stroke	1 (3%)	1 (3%)	0	0.57	2 (3%)	0.54
Sepsis or serious infection (%)	3 (9%)	6 (19%)	5 (14%)	0.24	9 (14%)	0.98
Death or serious infections (%)	3 (9%)	6 (19%)	5 (14%)	0.24	9 (14%)	0.98
Injection site reactions (%)	6 (18%)	8 (26%)	1 (3%)	0.029	14 (22%)	0.016
Injection site reaction leading to discontinuation (%)	3 (9%)	2 (6%)	1 (3%)	0.56	6 (9%)	0.42

P values reported for Chi-square test or Fisher exact tests.

Tab. 1: End-point clinici.

Blocco dell'IL-1 nell'AMI

La forte riduzione dei livelli della PCR ottenuti con Anakinra, sia a dosaggio standard che ad alta dose, conferma ed arricchisce i precedenti studi riguardanti la potenziata attività dell'IL-1 nei pazienti con STEMI e fornisce le basi per futuri studi sull'utilizzo dell'IL-1 come target nel trattamento dello STEMI.

L'assenza di differenze tra Anakinra standard e ad alto dosaggio suggerisce che la dose standard sia sufficiente a bloccare il recettore dell'IL-1, in modo da modulare la risposta infiammatoria nello STEMI.

Lo studio ha anche esaminato gli effetti dell'Anakinra sulle dimensioni e sulla funzionalità del ventricolo sinistro a 12 mesi. Il rimodellamento negativo è considerato il substrato per l'insufficienza cardiaca che complica lo STEMI.

Limiti e punti di forza

Le attuali strategie di riperfusion e blocco neuroormonale precoce hanno ridotto significativamente il rimodellamento cardiaco negativo dopo STEMI. Inoltre, l'elevato numero di dati mancanti al follow-up ha limitato la possibilità di rilevare le differenze nelle dimensioni cardiache e nella funzionalità tra i pazienti trattati con Anakinra e con placebo.

I risultati del VCUART3 confermano e ampliano i risultati degli studi pilota del VCUART e VCUART2^{41, 42}. Nonostante i limiti dati dalla piccola dimensione del campione, la significativa riduzione dei livelli di PCR associata ad un profilo di sicurezza favorevole del farmaco, e un segnale per la riduzione dell'incidenza di nuova insufficienza cardiaca o peggioramento della stessa, apre la strada ad una nuova strategia terapeutica da testare ulteriormente in studi clinici di fase III in pazienti con STEMI. Nonostante il crescente interesse per l'infiammazione e l'IMA, non ci sono in effetti farmaci anti-infiammatori che sono attualmente approvati per l'uso nell'IMA, ma c'è un urgente bisogno di trovare ulteriori

trattamenti per prevenire e curare l'insufficienza cardiaca.

Conclusioni

Nei pazienti con STEMI, l'inibizione dell'IL-1 con Anakinra riduce significativamente la risposta infiammatoria sistemica rispetto al placebo, senza alcuna differenza significativa tra regimi standard o di dosi elevate. Le analisi sugli end-point clinici dimostrano una ridotta incidenza di scompenso cardiaco e ridotte ospedalizzazioni per scompenso cardiaco, supportando l'ipotesi degli effetti benefici tramite il blocco dell'IL-1 in pazienti con infarto miocardico acuto.

BIBLIOGRAFIA

1. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2012; 60: 1581-98.
2. Roger VL, Weston SA, Gerber Y, et al. Trends in incidence, severity, and outcome of hospitalized myocardial infarction. *Circulation* 2010; 121: 863-9.
3. Furman MI, Dauerman HL, Goldberg RJ, et al. Twenty-two year (1975 to 1997) trends in the incidence, in-hospital and long-term case fatality rates from initial Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction: A multi-hospital, community-wide perspective. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1571-80.
4. Zhao Z, Winget M. Economic burden of illness of acute coronary syndromes: Medical and productivity costs. *BMC Health Serv Res* 2011; 11: 35.
5. Lewis EF, Velazquez EJ, Solomon SD, et al. Predictors of the first heart failure hospitalization in patients who are stable survivors of myocardial infarction complicated by pulmonary congestion and/or left ventricular dysfunction: a VALIANT study. *Eur Heart J* 2008; 29: 748-56.
6. Anavekar NS, Anavekar NS. Clinical modifiers for heart failure following myocardial infarction. *Curr Heart Fail Rep* 2005; 2: 165-73.
7. Steg PG, Dabbous OH, Feldman LJ, et al. Global Registry of Acute Coronary Events Investigators. Determinants and prognostic impact of heart failure complicating acute

- coronary syndromes: observations from the Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE). *Circulation* 2004; 109: 494-9.
8. Najafi F, Dobson AJ, Hobbs M, Jamrozik K. Temporal trends in the frequency and longer-term outcome of heart failure complicating myocardial infarction. *Eur J Heart Fail* 2007; 9: 879-85.
 9. Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC, McAlister FA. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 13-20.
 10. Hasdai D, Topol EJ, Kilaru R, et al. Frequency, patient characteristics, and outcomes of mild- to-moderate heart failure complicating ST-segment elevation acute myocardial infarction: lessons from 4 international fibrinolytic therapy trials. *Am Heart J* 2003; 145: 73-9.
 11. Emanuelsson H, Karlson BW, Herlitz J. Characteristics and prognosis of patients with acute myocardial infarction in relation to occurrence of congestive heart failure. *Eur Heart J* 1994; 15: 761-8.
 12. Ali AS, Rybicki BA, Alam M, et al. Clinical predictors of heart failure in patients with first acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 138 (6 Pt 1): 1133-9.
 13. Yeh RW, Sidney S, Chandra M, Sorel M, Selby JV, Go AS. Population trends in the incidence and outcomes of acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2010; 362: 2155-65.
 14. Bennett KM, Hernandez AF, Chen AY, et al. Heart failure with preserved left ventricular systolic function among patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2007; 99: 1351-6.
 15. Lacey L, Tabberer M. Economic burden of post-acute myocardial infarction heart failure in the United Kingdom. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 677-83.
 16. Ali AS, Rybicki BA, Alam M, et al. Clinical predictors of heart failure in patients with first acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 138: 1133-9.
 17. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977; 56: 786-94.
 18. Botker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, et al. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010; 375: 727-34.
 19. Shah RV, Holmes D, Anderson M, et al. Risk of Heart Failure Complication During Hospitalization for Acute Myocardial Infarction in a Contemporary Population: Insights From the National Cardiovascular Data ACTION Registry. *Circ Heart Fail* 2012; 693-73.
 20. Lonborg J, Kelbaek H, Vejstrup N, et al. Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Interv* 2010; 3: 34-41.
 21. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DP. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res* 2012; 94: 276-83.
 22. Chavez-Sanchez L, Espinosa-Luna JE, Chavez-Rueda K, Legorreta-Haquet MV, Montoya-Diaz E, Blanco-Favela F. Innate immune system cells in atherosclerosis. *Arch Med Res* 2014; 45: 1-14.
 23. Aukrust P, Ueland T, Lien E, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1999; 83: 376-82.
 24. Heymans S, Hirsch E, Anker SD, et al. Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur J Heart Fail* 2009; 11: 119-29.
 25. Lachmann HJ, Lowe P, Felix SD, et al. In vivo regulation of interleukin 1beta in patients with cryopyrin-associated periodic syndromes. *J Exp Med* 2009; 206: 1029-36.
 26. Pascual V, Allantaz F, Arce E, Punaro M, Banchereau J. Role of interleukin-1 (IL-1) in the pathogenesis of systemic onset juvenile idiopathic arthritis and clinical response to IL-1 block-ade. *J Exp Med* 2005; 201: 1479-86.
 27. Goldbach-Mansky R, Dailey NJ, Canna SW, et al. Neonatal-onset multisystem inflammatory disease responsive to interleukin-1beta inhibition. *N Engl J Med* 2006; 355: 581-92.
 28. Gattorno M, Tassi S, Carta S, et al. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1

- mu- tations. *Arthritis Rheum* 2007; 56: 3138-48.
29. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol* 2000; 165: 4615- 23.
 30. Mezzaroma E, Toldo S, Farkas D, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 19725-30.
 31. Abbate A, Salloum FN, Van Tassell BW, et al. Alterations in the interleukin-1/interleukin-1 receptor antagonist balance modulate cardiac remodeling following myocardial infarction in the mouse. *PLoS One* 2011; 6: e27923.
 32. Toldo S, Mezzaroma E, Van Tassell BW, et al. Interleukin-1 β blockade improves cardiac remodelling after myocardial infarction without interrupting the inflammasome in the mouse. *Exp Physiol* 2013; 98: 734-45.
 33. Toldo S, Mezzaroma E, Bressi E, et al. Interleukin-1 β blockade improves left ventricular systolic/ diastolic function and restores contractility reserve in severe ischemic cardiomyopathy in the mouse. *J Cardiovasc Pharmacol* 2014; 64: 1-6.
 34. Abbate A, Kontos MC, Grizzard JD, et al. Interleukin-1 blockade with Anakinra to prevent adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction (Virginia Commonwealth University Anakinra Remodeling Trial [VCU-ART] pilot study). *Am J Cardiol* 2010; 105: 1371-7.
 35. Abbate A, Van Tassell BW, Biondi-Zoccai G, et al. Effects of interleukin-1 on adverse cardiac remodeling and heart failure after acute myocardial infarction [from the Virginia Commonwealth University-Anakinra Remodeling Trial (2) (VCU-ART2) pilot study]. *Am J Cardiol* 2013; 111: 1394-400.
 36. Abbate A, Kontos MC, Abouzaki NA, et al. Comparative safety of interleukin-1 blockade with Anakinra in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction (from the VCU-ART and VCU-ART2 pilot studies). *Am J Cardiol* 2014; 115: 288-92.
 37. Morton AC, Rothman AMK, Greenwood JP, et al. The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: the MRC-ILA Heart Study. *Eur Heart J* 2015; 36: 377-84.
 38. Patti G, Di Sciascio G, D'Ambrosio A, Dicuonzo G, Abbate A, Dobrina A. "Prognostic value of interleukin-1 receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention." *Am J Cardiol* 2002; 89: 372-6.
 39. Patti G, Mega S, Pasceri V, et al. Interleukin-1 receptor antagonist levels correlate with extent of myocardial loss in patients with acute myocardial infarction. *Clinical Cardiology* 2005; 4: 193-6.
 40. Kineret prescribing information. NP-5569 Kineret Referral E-Form.pdf (kineretrx.com).
 41. Buckley LF, Abbate A. Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. *Eur Heart J* 2018; 39: 2063-9.
 42. Abbate A, Salloum FN, Vecile E, et al. Anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, inhibits apoptosis in experimental acute myocardial infarction. *Circulation* 2008; 117: 2670-83.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 25 luglio 2019

Dott.ssa Lorenza Matrangolo, Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Germano Di Sciascio, Direttore U.O.C. Cardiologia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Antonio Abbate, Department of Internal Medicine, Virginia Commonwealth University, Richmond (USA)

Dott.ssa Annunziata Nusca, Ricercatore di Malattie dell'apparato cardiovascolare, Università Campus Bio-Medico di Roma

Per la corrispondenza:
lorenzamatrangolo@hotmail.it

Tesi di Laurea: “Fattori implicati nella regolazione epigenetica dell’espressione di Reelin nel colangiocarcinoma: analisi immunoistochimica” (Sintesi)

Autore: G. Mazzotta

Relatore: S. Morini

Correlatore: S. Carotti

Introduzione

Il colangiocarcinoma (CCA) è una delle neoplasie più aggressive con prognosi peggiore a livello mondiale. Attualmente il solo trattamento in grado di fornire un potenziale beneficio è dato dalla chirurgia, sebbene solo una minoranza dei pazienti sia operabile alla diagnosi¹. Data l’assenza di trattamenti efficaci, è necessario comprendere i meccanismi patogenetici della malattia, in modo da individuare nuovi potenziali targets terapeutici, identificabili tra i markers specifici espressi dal tessuto neoplastico.

Reelin è una glicoproteina secreta a livello extracellulare da una varietà di tessuti a livello embrionale e nell’adulto². Nel tessuto nervoso embrionale, è dimostrato essere necessaria per una migrazione cellulare regolata e per il mantenimento del corretto orientamento neuronale³. Topi *Reeler* knock-out per entrambi i recettori di Reelin sviluppano atassia, ipoplasia del cervelletto e disposizione erronea delle cellule nervose⁴; analogamente mutazioni nel gene umano di *Reelin* (*RELN*) sono associate alla lissencefalia autosomica recessiva con ipoplasia cerebellare⁵. Reelin agisce primariamente come segnale di stop nella migrazione delle cellule neuronali⁶: diversi studi riportano un suo ruolo nella modulazione dell’adesione intercellulare mediata da alpha3beta1 integrina⁷ e da N-caderina⁸; recenti evidenze suggeriscono un suo coinvolgimento nella stabilizzazione del citoscheletro nel processo di migrazione neuronale⁹. Nel cervello adulto, tale proteina rimane attiva, essendo coinvolta nei pathway di segnale che garantiscono la

neurotrasmissione, i processi di memorizzazione e la plasticità sinaptica¹⁰. Dati recenti hanno dimostrato che Reelin è espressa anche in tessuti adulti periferici, quali sistema nervoso periferico¹¹, fegato¹², rene, testicolo e ovaio murini¹³, retina, tube di Falloppio, mammella¹⁴, negli odontoblasti¹⁵, nonché a livello delle cellule cromaffini del surrene, delle cellule MSH-secernenti della pars intermedia dell’ipofisi¹⁶ e a livello del pancreas¹⁷. Per analogia con il tessuto nervoso, tale marcatore potrebbe svolgere un ruolo nel mantenimento strutturale degli organi periferici in cui è espresso.

Reelin è stata recentemente studiata in diverse patologie tumorali a livello di diversi organi, quali fegato¹⁸, esofago¹⁹, mammella²⁰, stomaco²¹, colon²² e pancreas¹⁷, nelle quali è soggetta ad una *down-regulation*. Per i tumori dello stomaco e della mammella, la ridotta espressione di *Reelin* è stata associata rispettivamente ad uno stadio più avanzato di malattia e a peggior prognosi. Non vi sono attualmente dati circa la sua espressione nel colangiocarcinoma.

Diversi studi hanno correlato la ridotta espressione di *Reelin* a meccanismi epigenetici legati all’ipermetilazione del suo promotore²⁰⁻²⁴. La regolazione epigenetica consiste in cambiamenti ereditabili nell’espressione genica che si verificano indipendentemente da cambiamenti nella sequenza primaria di DNA; tali modificazioni si verificano a livello del DNA e delle proteine istoniche, regolando l’accessibilità della cromatina e, conseguentemente, l’espressione genica.

Alterazioni in queste modificazioni sono un *hallmark* del cancro; terapie epigenetiche tentano di normalizzare i pattern di metilazione del DNA e le modificazioni post-traslazionali degli istoni che promuovono o mantengono un fenotipo tumorale²⁵.

Il fattore epigenetico che è stato maggiormente correlato con la regolazione di *Reelin* è DNMT1²⁶, il quale, interagendo con UHRF1 e EHMT2(G9a), media il mantenimento dei marcatori di silenziamento trascrizionale dopo la replicazione del DNA. La replicazione del DNA porta a due filamenti di DNA figli emi-metilati. UHRF1 riconosce il DNA emi-metilato e recluta DNMT1 per ristabilire il pattern di metilazione sul DNA di nuova sintesi²⁷. L'interazione di DNMT1 con EHMT2 ristabilisce le modificazioni post-traslazionali degli istoni nuovamente depositati.

Obiettivi

Si tratta di uno studio preliminare il cui scopo è quello di indagare, tramite immunoistochimica (IHC), l'espressione di *Reelin* nel colangiocarcinoma intra- ed extraepatico rispetto al tessuto sano e di analizzare l'espressione di marcatori epigenetici implicati nel mantenimento della metilazione del DNA e degli istoni durante la replicazione, quali DNMT1, EHMT2 e UHRF1, nel tessuto tumorale e nel tessuto sano. Infine ci si è proposti di valutare la presenza di una eventuale correlazione tra i marcatori epigenetici analizzati e *Reelin*.

Materiali e metodi

Abbiamo effettuato un'indagine immunoistochimica su 31 campioni di CCA, di cui 9 intraepatici e 22 extraepatici.

Sono stati impiegati i seguenti anticorpi: mouse monoclonal anti-*Reelin* antibody (MAB5366, Merck Millipore Darmstadt, Germany); rabbit monoclonal anti-DNMT1

antibody (ab188453, Abcam Cambridge, MA); rabbit monoclonal anti-EHMT2/G9a antibody (ab185050, Abcam Cambridge, MA); rabbit monoclonal anti-UHRF1 antibody (ab194236, Abcam Cambridge, MA).

L'immunoreattività è stata valutata mediante analisi semi-quantitativa da due operatori in maniera indipendente. Sono state valutate l'intensità di espressione di ciascun marcatore e la percentuale di cellule che mostrano immunoreattività, attribuendo uno Score da 0 a 3 per entrambi i parametri. Tali dati sono stati utilizzati per elaborare un IHC Score, dato dal prodotto tra il punteggio attribuito all'intensità del segnale e quello assegnato sulla base della percentuale di cellule positive.

L'analisi è stata effettuata in 3 campi di regioni corrispondenti ad ingrandimento a 10X per ciascun marcatore. Uno Score complessivo per ogni singolo campione è stato anche derivato come media dei valori.

Risultati

Abbiamo osservato una riduzione dell'espressione immunoistochimica di *Reelin* nel tumore rispetto al tessuto non tumorale ($p < 0,01$). L'analisi dei marcatori epigenetici implicati nel mantenimento della metilazione del DNA ed istoni ha mostrato che l'espressione di DNMT1, EHMT2 e UHRF1 risulta significativamente aumentata nel tumore rispetto al tessuto sano ($p < 0,01$) (Fig. 1).

L'IHC Score di *Reelin* risulta inversamente correlato con l'IHC Score di DNMT1 ($R = -0,301$; $p < 0,01$) e quello di UHRF1 ($R = -0,31$; $p = 0,041$). Al contrario non si individua una correlazione staticamente significativa tra *Reelin* e EHMT2 (Tab. 1).

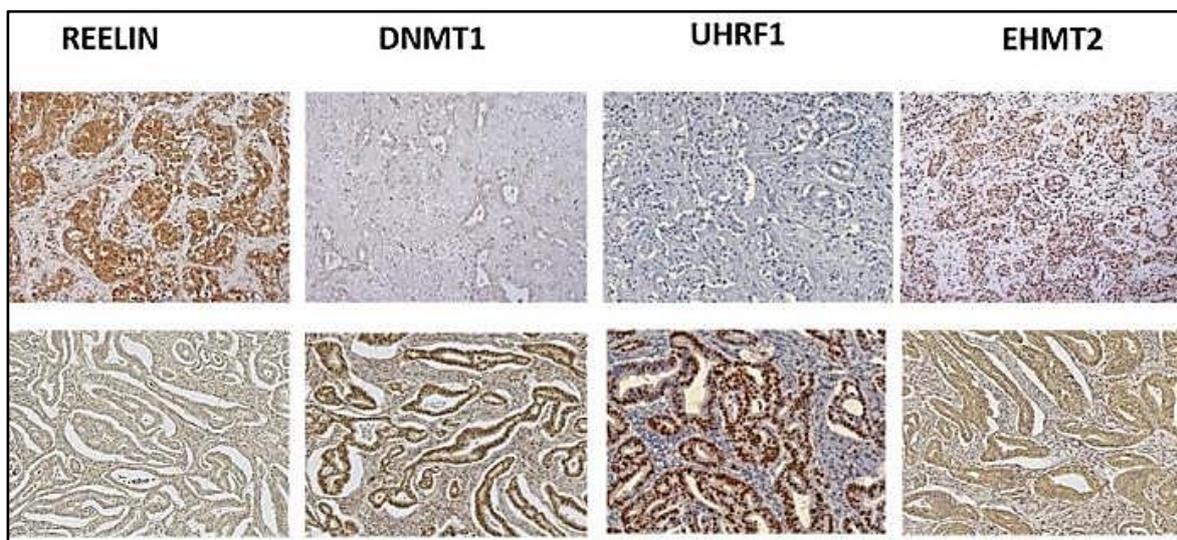


Fig. 1: Immunoistochimica per Reelin (prima colonna da sinistra), DNMT1 (seconda colonna), UHRF1 (terza colonna) e EHMT2 (quarta colonna): analisi per campi corrispondenti. Nelle immagini disposte nella riga inferiore si nota come, analizzando campi corrispondenti, l'immunoreattività citoplasmatica di Reelin risulti lieve o assente, mentre la positività nucleare di DNMT1, UHRF1 e EHMT2 sia intensa; nella riga superiore, viceversa, l'intensa positività citoplasmatica di Reelin correla inversamente con la positività lieve o nulla di DNMT1, UHRF1 e EHMT2.

	Mediana IHC score nel tumore	Mediana IHC score nel tessuto sano.
Reelin	5 (5)	7,5 (3)
DNMT1	1,5 (1,5)	0 (0)
UHRF1	6 (1,25)	0 (2,25)
EHMT2	7,5 (5)	1,5 (1,75)

Tab. 1: Sono indicati i valori di mediana tra gli IHC score dei marcatori analizzati. Tra parentesi sono riportati i rispettivi range interquartili 25-75%.

Nella valutazione campo per campo, l'IHC Score di Reelin risulta inversamente correlato con l'IHC Score di DNMT1 (Test di Spearman, $R=-0,301$; $p<0,01$) e quello di UHRF1 (Test di

Spearman, $R=-0,31$; $p=0,041$). Al contrario non si individua una correlazione staticamente significativa tra Reelin e EHMT2 (Test di Spearman, $R=-0,088$; $p=0,49$) (Fig. 2).

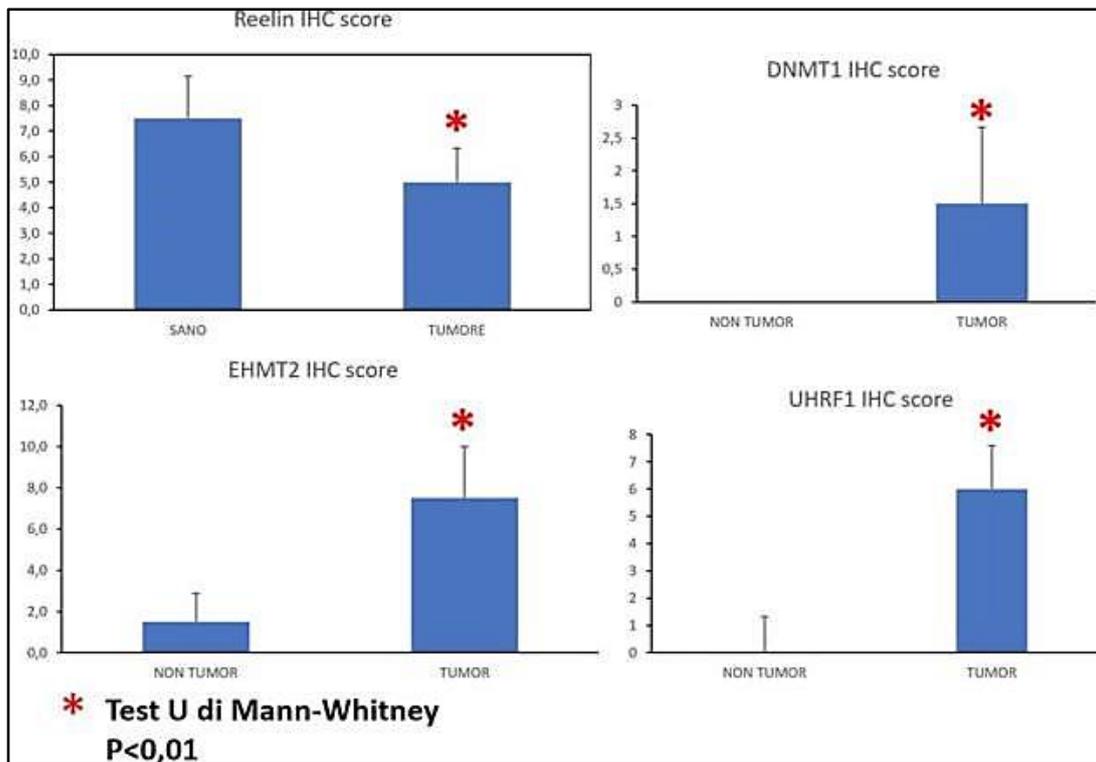


Fig. 2: Confronto (test U di Mann-Whitney) dell'espressione di Reelin, DMT1, EHMT2 e UHRF1 nel tessuto sano e nel colangiocarcinoma.

Discussione

Nel tessuto nervoso l'espressione di Reelin è dimostrato essere necessaria per il normale posizionamento dei neuroni; per analogia tale marcatore potrebbe svolgere una funzione analoga nei tessuti nei quali è stato riportato essere espresso.

Nella patologia tumorale, in cui si assiste a una disregolazione dei normali meccanismi di omeostasi cellulare e tissutale, la diminuzione dell'espressione di *Reelin* potrebbe essere associata ad un'alterazione dei meccanismi di proliferazione e migrazione, associati allo sviluppo neoplastico.

Sebbene siano necessari ulteriori studi che confermino tali dati, la ridotta espressione di Reelin osservata nel colangiocarcinoma rispetto al tessuto sano fa supporre un possibile coinvolgimento della proteina nei meccanismi tumorali del colangiocarcinoma.

L'osservazione di una correlazione inversa tra l'IHC Score di Reelin e l'IHC Score di DNMT1-UHRF1 suggerisce che il gene *RELN*

possa essere regolato mediante variazioni del grado di metilazione del DNA, processo al quale DNMT1 e UHRF1 prendono attivamente parte. La possibile regolazione epigenetica del gene *RELN* potrebbe, se confermata, aprire nuovi scenari sul piano terapeutico, tenendo conto del carattere potenzialmente reversibile delle modificazioni epigenetiche e della disponibilità già attualmente di molecole in grado di inibire DNMT1 (Azacitabina, Decitabina)²⁷, UHRF1²⁸ o il complesso DNMT1-EHMT2 (CM-272)^{29, 30}.

BIBLIOGRAFIA

1. Banales JM, Cardinale V, Carpino G, et al. Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA). *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2016; 5: 261-80.

2. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, et al. *Reelin* and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002; 277: 39944-52.
3. Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X. Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 148.
4. Howell BW, Hawkes R, Soriano P, Cooper JA. Neuronal position in the developing brain is regulated by mouse disabled-1. *Nature* 1997; 389: 733-7.
5. Hong TS, Wo JY, Yeap BY, et al. Multi-Institutional Phase II Study of High-Dose Hypofractionated Proton Beam Therapy in Patients With Localized, Unresectable Hepatocellular Carcinoma and Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *J Clin Oncol* 2016; 34: 460-8.
6. Castellano E, Molina-Arcas M, Krygowska AA, et al. RAS signalling through PI3-Kinase controls cell migration via modulation of Reelin expression. *Nat Commun* 2016; 7: 11245.
7. Dulabon L, Olson EC, Taglienti MG, et al. Reelin binds alpha3beta1 integrin and inhibits neuronal migration. *Neuron* 2000;27: 33-44.
8. Matsunaga Y, Mariko N, Murakawa H, et al. Reelin transiently promotes N-cadherin-dependent neuronal adhesion during mouse cortical development. *Proc Natl Acad Sci* 2017; 114: 2048-53.
9. Frotscher M, Zhao S, Wang S, Chai X. Reelin Signaling Inactivates Cofilin to Stabilize the Cytoskeleton of Migrating Cortical Neurons. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 148.
10. Weeber EJ, Beffert U, Jones C, et al. Reelin and ApoE receptors cooperate to enhance hippocampal synaptic plasticity and learning. *J Biol Chem* 2002; 277(42): 39944-52.
11. Panteri R, Mey J, Zhelyaznik N, et al. Reelin is transiently expressed in the peripheral nerve during development and is upregulated following nerve crush. *Mol Cell Neurosci* 2006; 32: 133-42.
12. Carotti S, Perrone G, Amato M, et al. Reelin expression in human liver of patients with chronic hepatitis C infection. *Eur J Histochem* 2017; 61: 2745.
13. Ikeda Y, Terashima T. Expression of reelin, the gene responsible for the reeler mutation, in embryonic development and adulthood in the mouse. *Dev Dyn* 1997; 210: 157-72.
14. Mikulska-Ruminska K, Strzelecki J, Nowak W. Dynamics, nanomechanics and signal transduction in reelin repeats. *Sci Rep* 2019; 9: 18974.
15. Maurin JC, Couble ML, Didier-Bazes M, Brisson C, Magloire H, Bleicher F. Expression and localization of reelin in human odontoblasts. *Matrix Biol* 2004; 23: 277-85.
16. Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, et al. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 1281-6.
17. Sato N, Fukushima N, Chang R, Matsubayashi H, Goggins M. Differential and epigenetic gene expression profiling identifies frequent disruption of the RELN pathway in pancreatic cancers. *Gastroenterology* 2006; 130: 548-65.
18. Luo Y, Huang K, Zheng J, Zhang J, Zhang L. TGF- β 1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing reelin expression. *Gene* 2019; 688: 19-25.
19. Yuan Y, Chen H, Ma G, Cao X, Liu Z. Reelin is involved in transforming growth factor- β 1-induced cell migration in esophageal carcinoma cells. *PLoS One* 2012; 7: e31802.
20. Stein T, Cosimo E, Yu X, et al. Loss of reelin expression in breast cancer is epigenetically controlled and associated with poor prognosis. *Am J Pathol* 2010; 177: 2323-33.
21. Dohi O, Takada H, Wakabayashi N. Epigenetic silencing of RELN in gastric cancer. *Int J Oncol* 2010; 36: 85-92.
22. Serrano-Morales JM, Vázquez-Carretero MD, Peral MJ, Ilundáin AA, García-Miranda P. Reelin-Dab1 signaling system in human colorectal cancer. *Mol Carcinog* 2017; 56: 712-21.
23. Tremolizzo L, Carboni G, Ruzicka WB, et al. An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 17095-100.
24. Abdolmaleky HM, Cheng KH, Russo A, et al. Hypermethylation of the Reelin (RELN) promoter in the brain of schizophrenic patients: a preliminary report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005; 134B: 60-6.

25. Bates SE. Epigenetic Therapies for Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 650-63.
26. Veldic M, Caruncho HJ, Liu WS, et al. DNA-methyltransferase 1 mRNA is selectively overexpressed in telencephalic GABAergic interneurons of schizophrenia brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 348-53.
27. Liu X, Gao Q, Li P, et al. UHRF1 targets DNMT1 for DNA methylation through cooperative binding of hemi-methylated DNA and methylated H3K9. *Nat Commun* 2013; 4: 1563.
28. Li J, Hao D, Wang L. Epigenetic targeting drugs potentiate chemotherapeutic effects in solid tumor therapy. *Sci Rep* 2017; 7: 4035.
29. Xue B, Zhao J, Feng P, Xing J, Wu H, Li Y. Epigenetic mechanism and target therapy of UHRF1 protein complex in malignancies. *Oncotargets Ther* 2019; 12: 549-59.
30. Bárcena-Varela M, Caruso S, Llerena S, et al. Dual Targeting of Histone Methyltransferase G9a and DNA-Methyltransferase 1 for the Treatment of Experimental Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2019; 69: 587-603.

Sintesi della Tesi di Laurea discussa il 25 luglio 2019

Dott. Giorgio Mazzotta, Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Sergio Morini, Ordinario Anatomia Umana, Dip. Anatomia Microscopica e Ultrastrutturale, Università Campus Bio-Medico di Roma

Prof. Simone Carotti, Dip. Anatomia Microscopica e Ultrastrutturale, Università Campus Bio-Medico di Roma

Per la corrispondenza:
giorgiomazzotta94@gmail.com

Norme da rispettare per la pubblicazione delle Relazioni sugli "Atti della Accademia Lancisiana".

Gli "Atti" costituiscono il documento dell'attività scientifica dell'Accademia Lancisiana. Al tempo stesso sono un titolo di prestigio tale da promuovere riconoscimenti morali e contributi economici, indispensabili per la vita dell'Accademia, da parte degli Enti. È quindi impegno di tutti gli Accademici e i Soci che gli "Atti" riportino sempre il resoconto completo dell'attività scientifica svolta.

L'Accademia Lancisiana pubblica sugli "Atti" i testi delle relazioni dei Simposi, Conferenze e Comunicazioni tenute nel corso di ogni anno accademico. A norma dello Statuto dell'Accademia (Regolamento per la pubblicazione degli Atti, art. 5) «Chiunque svolga una relazione, una conferenza, una comunicazione è tenuto a pubblicarne il testo negli "Atti"».

I testi dovranno essere inediti, non consegnati contemporaneamente ad altre riviste scientifiche, ed il loro contenuto conforme alla legislazione vigente in materia etica della ricerca.

La responsabilità dell'osservanza di quanto sopra e quella del contenuto scientifico è esclusivamente degli Autori.

Testi. I lavori redatti in formato elettronico dovranno pervenire alla Segreteria dell'Accademia Lancisiana (e-mail: lancisi@aruba.it) entro il giorno della Seduta e dovranno riportare: titolo, Autore/i, Istituzione presso cui il lavoro è stato svolto, indirizzo e-mail dell'Autore che si impegna a tenere la corrispondenza con la Rivista.

I Moderatori dei Simposi sono invitati a garantire che ogni Relatore si attenga alle presenti norme e a sollecitarli affinché inviino i testi delle rispettive relazioni entro i termini indicati.

La redazione si riserva il diritto di apportare al testo eventuali necessarie modifiche.

Abbreviazioni e simboli. Eccetto che per quelle standard (unità di misura, simboli chimici, matematici, statistici ecc.), l'uso delle abbreviazioni deve essere evitato. I termini ricorrenti nel testo possono essere abbreviati riportandoli una prima volta per intero e facendoli seguire

dall'abbreviazione.

Bibliografia. Le voci bibliografiche devono essere numerate in ordine di citazione e riportate nel testo con *numero ad esponente*. Per gli acronimi delle riviste si faccia riferimento all'Index Medicus, indicandone, invece, il nome per intero ove non siano tra quelle citate. In caso di *bibliografia essenziale* seguire rigorosamente l'ordine alfabetico delle citazioni, senza alcuna numerazione.

Si usi lo stile più sotto esemplificato:

Citazioni da riviste: 1) Articoli standard (elencare tutti gli Autori quando siano sei o meno; se sono sette o più elencare solo i primi tre ed aggiungere et al.):

You CH, Lee KY, Chey RY, Menguy R. Electrogastrographic study of patients with unexplained nausea, bloating and vomiting. *Gastroenterology* 1980; 79: 311-4.

2) Autore non riportato: Coffee drinking and cancer of the pancreas [editoriale]. *BMJ* 1981; 283: 628.

Citazioni da libri ed altre monografie: 1) Capitoli di libri: Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganism. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanism of disease*. Philadelphia: Saunders, 1974; 457-72.

2) Atti di congressi: Harley NH. Comparing random daughter dosimetric and risk models. In: Gammage RB, Kaye SV, eds. *Indoor air and human health. Proceedings of the Seventh Life Sciences Symposium, 1984* OcL 29-31; Knoxville (TN). Chelsea (MI): Lewis, 1985; 69-78.

Tabelle e figure. Le tabelle devono avere un breve titolo. Tabelle e figure non devono essere inserite nel testo di Word, ma allegate a parte come file grafici con le relative didascalie.

Per quanto non espressamente specificato nelle presenti norme si rimanda alle indicazioni fornite dall'*International Committee of Medical Journal Editors*, pubblicate su: *N Engl J Med* 1991; 324: 424-8 e *BMJ* 1991; 302: 338-41.

