

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

Dipartimento Universitario di Pediatria  
Struttura Complessa di Immunologia Pediatrica  
Direttore Prof. Claudio Pignata  
Tel.081-7464340- fax. 081-5451278- e-mail:pignata@unina.it

## **Atassia-Teleangiectasia: programmi di ricerca**

*Responsabile scientifico: Prof. Claudio Pignata*

### **Anno 2011-2012**

#### **Tecniche avanzate di neuroimaging quale strumento di valutazione degli effetti del betametasone**

*Principal Investigators: Dott. M. Quarantelli; Dott. E. Salvatore, Prof C. Pignata*

*Centri partecipanti: Napoli (Dott. Aloj, Prof Pignata)*

Negli ultimi anni l'avanzamento in ambito radiologico ha portato allo sviluppo di tecniche di neuroimaging innovative quali la RM di diffusione, la RM di perfusione, la spettroscopia RM, e la RM funzionale. L'utilizzo di tali tecniche nei pazienti affetti da A-T potrebbe permettere di ottenere informazioni complementari alla RMN strutturale, soprattutto nell'ambito dello studio dei meccanismi patogenetici alla base del danno cerebellare. Questa tecnica è in grado di visualizzare la risposta emodinamica (cambiamenti nel contenuto di ossigeno del parenchima e dei capillari) correlata all'attività neuronale del cervello.

In particolare mediante la RM funzionale è possibile analizzare le variazioni di attività di specifiche zone del SNC in risposta ad alcuni stimoli esterni, come ad esempio alcune prove neurologiche quali la diadococinesia. Ciò potrebbe contribuire all'identificazione delle aree encefaliche che subiscono maggiori modifiche di attività sia prima che durante la terapia con betametasone ed eventualmente, di correlare tali modifiche con il miglioramento della sintomatologia neurologica.

**Obiettivi:** Migliorare le conoscenze sulla patogenesi del danno neurologico funzionale mediante neuroimaging nei pazienti A-T.

Approfondire le conoscenze del meccanismo di azione del betametasone sui sintomi neurologici nei pazienti A-T.

Tempi previsti di completamento degli obiettivi: Circa 12 mesi

End Point: Pubblicazione scientifica

#### **Valutazione del danno neurologico mediante Risonanza Magnetica Nucleare strutturale**

*Principal Investigators: Dott. M. Quarantelli; Dott. E. Salvatore, Prof C. Pignata*

La Risonanza Magnetica Nucleare (RMN) strutturale è una tecnica di diagnostica per immagini utilizzata per la diagnosi e monitoraggio del danno morfologico a carico dell'encefalo nei pazienti affetti da patologie a carico del sistema nervoso centrale (SNC). In particolare le principali alterazioni osservabili nei pazienti affetti da AT sono l'atrofia del cervelletto, le anomalie vascolari quali angiomi o teleangiectasie capillari, ed alcune alterazioni della sostanza bianca cerebrale. Tali anomalie tendono a presentare una progressiva evoluzione con l'avanzare dell'età, e la variabilità nella identificazione e valutazione risulta troppo spesso dipendente dagli operatori e dai macchinari utilizzati. Va sottolineato che in uno studio recente del gruppo di Napoli è stato evidenziato che

l'atrofia cerebellare rappresenta un evento non precoce, che correla inversamente con la risposta clinica al betametassone. Si sottolinea che a tutt'oggi non esiste uno Score validato che consenta di dare una valutazione obiettiva dell'entità del danno.

**Obiettivi:** Creazione di una rete integrata tra vari centri di diagnostica per immagini al fine di omogeneizzare le tecniche di acquisizione e l'interpretazione delle immagini.

Definizione e quantificazione del danno cerebellare nei pazienti affetti da AT ed elaborazione di uno Score di gravità di atrofia cerebellare mediante metodiche di neuroimaging, che non prevedono l'utilizzo di radiazioni ionizzanti.

Tempi previsti di completamento degli obiettivi: Circa 1 anno

End Point: Pubblicazione scientifica

### **Validazione dell'uso della Risonanza Magnetica Toracica per valutare il danno polmonare nei pazienti A-T**

*Principal Investigators: Prof C. Pignata, Dott. F. Santamaria, Dott. C. Mollica*

*Centri partecipanti: Napoli (Dott Aloj,), Roma (Dott Finocchi, Prof Rossi), ed eventuali altri Centri disponibili.*

Sulla base di risultati preliminari del nostro gruppo di Napoli ottenuti studiando un gruppo eterogeneo di pazienti di età pediatrica con problemi polmonari cronici, e comprendente anche un gruppo di pazienti con Immunodeficienze congenite, abbiamo osservato che la RMN può fornire utili informazioni sul parenchima polmonare in corso di infezione. Tale tecnica ha l'evidente vantaggio di non utilizzare radiazioni a differenza della TAC e quindi risultati in tale ambito avrebbero una considerevole rilevanza nelle cure a pazienti A-T.

**Obiettivi:** Collazionare immagini di RMN toracica, già acquisite o acquisibili entro 3 mesi, valutarle applicando e validando un sistema di Score radiologico.

Tempi previsti di completamento degli obiettivi: studio in fase di completamento

End Point: Pubblicazione scientifica

### **Definizione di biomarker di responsività ai glucocorticoidi**

*Principal Investigator: Prof. C. Riccardi*

I glucocorticoidi (GC) sono coinvolti nella regolazione fisiologica di una varietà di processi, tra cui la risposta immune, la crescita cellulare, il metabolismo e lo sviluppo. La loro attività terapeutica riflette gli effetti fisiologici degli steroidi endogeni, sebbene con una maggiore potenza ed efficacia. I GC, inoltre, mediano l'inibizione della proliferazione cellulare e la modulazione dell'apoptosi. Il meccanismo di azione degli steroidi consiste nella regolazione della trascrizione di geni target attivata dal legame del loro recettore (GR) ad elementi di risposta sul DNA (GRE). Mediante tale meccanismo i GC inducono l'espressione di molti geni incluso GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper), gene appartenente alla famiglia delle leucine-zipper con una putativa attività trascrizionale soppressoria. La quantizzazione dell'espressione di GILZ indotta dai GC può essere un utile strumento di valutazione e un potenziale biomarker di risposta clinica dell'attività del betametassone durante la terapia con betametassone in pazienti A-T.

**Obiettivi:** Quantizzare l'espressione di GILZ e GR su linfociti di pazienti A-T durante terapia con

betametasone al fine di individuare un potenziale biomarker di risposta clinica dell'attività del betametasone.

Approfondire il ruolo di GILZ nella regolazione della proliferazione e dell'apoptosi linfocitaria su linfociti del sangue periferico di pazienti A-T, al fine di chiarire alcuni dei meccanismi molecolari che contribuiscono agli effetti dei GC. Va sottolineato che a differenza di altre forme di atassia, la A-T offre l'opportunità di utilizzare i linfociti del sangue periferico, facilmente isolabili, per studi di patogenesi, a differenza delle cellule del Purkinje che non sono isolabili. Il nostro laboratorio da oltre 30 anni è impegnato in studi su linfociti umani.

Tempi previsti di completamento/attuazione degli obiettivi: Circa 1 anno

End Point: Pubblicazione scientifica

### **Anno 2012-2013**

#### **Studio dei meccanismi molecolari biochimici potenzialmente coinvolti negli effetti del betametasone: studio dello stato redox e dei sistemi di protezione antiossidante della cellula.**

*Principal Investigator: Prof. C. Pignata*

*International collaborations: Dott. C. Casentino, Prof. V. Costanzo, London Research Institute Clare Hall Laboratories, London*

L'A-T si associa alla perdita di funzione della proteina ATM, che fisiologicamente provvede alla riparazione delle rotture del doppio filamento del DNA (DSB) che si generano durante il ciclo cellulare. Tale perdita è causa di alcune caratteristiche fenotipiche dell'A-T, come la predisposizione tumorale e la radiosensibilità, ma non spiega la patogenesi delle manifestazioni neurologiche. Queste ultime, ed in particolar modo la degenerazione cerebellare, tipica dei pazienti affetti da A-T, sono state invece associate allo stress ossidativo da accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), evidente nelle cellule del Purkinje del cervelletto. A conferma di ciò, recenti studi *in vitro* su modelli animali hanno dimostrato un ruolo aggiuntivo di ATM anche nel controllo dello stato redox intracellulare, mediante l'attivazione dell'enzima glucosio-6-fosfato deidrogenasi (G6PD) e la conseguente sintesi di NADPH, fisiologicamente coinvolto nella protezione dalla tossicità indotta da ROS, e mediante l'inibizione della glicolisi, attiva fonte di produzione di ROS intracellulari. Da tali studi è inoltre emerso che la scarsa attivazione di G6PD interferisce anche con l'efficienza del processo di riparo del DNA. Infine, parallelamente alle osservazioni cliniche di efficacia del betametasone nel miglioramento della sintomatologia neurologica in pazienti A-T, è stato possibile osservare un ruolo attivo di tale farmaco nel ridurre lo stress ossidativo in cellule ATM -/-. Quest'ultimo dato va tuttavia confermato ed ulteriormente approfondito prima di giungere a conclusioni univoche.

Obiettivi: Valutare nell'uomo il ruolo di ATM sul controllo e sull'attivazione di G6PD.

Comprendere i meccanismi molecolari di azione del betametasone sui sintomi neurologici dell'A-T.

Individuare sistemi di intervento volti a ridurre la produzione di ROS e a migliorare i meccanismi antiossidanti di difesa dei neuroni in pazienti A-T.

Tempi previsti di completamento degli obiettivi: Circa 2 anni

End Point: Pubblicazione scientifica

## **Valutazione del danno neurologico mediante scale**

*Principal Investigators: Prof. E. Del Giudice*

Le scale di valutazione neurologica sono degli strumenti finalizzati alla diagnosi ed alla quantificazione del danno funzionale in patologie del sistema nervoso. Le scale più usate nell'ambito delle patologie atassiche sono la scala SARA e la scala ICARS, utilizzate comunemente per la valutazione neurologica dell'Atassia di origine cerebellare. Tali scale presentano, però, alcune limitazioni nella valutazione dell'A-T: la scala SARA, infatti, è stata costruita sulla base dell'esame neurologico dell'adulto, e quindi non tiene conto della variabilità di alcune funzioni neurologiche del bambino, specie nei primi sei anni di vita; la scala ICARS, d'altra parte, spesso non consente il riconoscimento di segni precoci ed aspecifici di atassia, ed inoltre non tiene conto di alcune peculiarità dell'atassia riscontrata nell'A-T né dei meccanismi di compenso messi in atto dal singolo individuo.

In entrambi i casi quindi vi è una buona affidabilità nella quantificazione del danno neurologico in età giovanile, ma vi è una limitazione nella quantificazione del danno nella prima e seconda infanzia e nella diagnosi precoce di A-T, cui si associa una scarsa adeguatezza nel valutare la progressione di malattia nel tempo.

**Obiettivi:** Creazione e validazione di uno strumento di valutazione neurologica che tenga conto delle peculiarità dell'A-T, consentendo un maggior numero di diagnosi precoci e un'adeguata quantificazione della progressione della malattia soprattutto in età pediatrica.

**Tempi previsti di attuazione degli obiettivi:** Circa 2 anni

**End Point:** Pubblicazione scientifica

## **Anno 2013-2014**

### **Analisi di proteine ubiquitinate in Cellule Mononucleate del sangue periferico**

Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è un meccanismo cellulare di degradazione proteica, che prevede il direzionamento di proteine citoplasmatiche poliubiquitinate all'interno del proteasoma, struttura deputata alla loro degradazione. L'inibizione di questo sistema causa l'accumulo di proteine danneggiate nella cellula, ed inoltre sembra essere correlato ad un aumento della produzione intracellulare di ROS ed ad una parallela riduzione dei meccanismi di difesa antiossidante della cellula, che conducono infine all'apoptosi cellulare. Tali fenomeni da inibizione del UPS sono stati riscontrati in diversi tipi cellulari, tra cui i neuroni, e si associano ad alcune patologie neurodegenerative caratterizzate da accumulo intra-neuronale di proteine anomale, tra cui la malattia di Alzheimer, la malattia di Parkinson e la malattia di Huntington. La neurodegenerazione che si osserva in tali patologie sembra essere associata ad una disregolazione del sistema UPS cui consegue, oltre all'accumulo proteico, anche un aumento dello stress ossidativo e un danno mitocondriale che promuovono la morte cellulare.

**Obiettivi:** Individuare, mediante l'analisi di PBMC, il ruolo del UPS nella patogenesi dell'A-T.

**Tempi previsti di attuazione degli obiettivi:** Circa 2-3 anni

**End Point:** Pubblicazione scientifica

### **Necessità economiche**

Spese per reagenti:	€ 30.000,00
Spese per utilizzo di facilities per analisi molecolari:	€ 7.000,00
Spese per materiale inventariabile	€ 3.000,00
Partecipazione ad 1 congresso internazionale sulle Immunodeficienze:	€ 2.000,00
Spese varie:	€ 3.000,00
Totale:	<b>€ 45.000,00</b>

### **Ripartizione delle necessità economiche: € 15.000,00/anno**

Tale budget servirà a finanziare in parte le attività sperimentali per studi clinici, funzionali e biochimico-molecolari connessi con la sindrome Atassia Teleangiectasia del gruppo dell'Immunologia Pediatrica di Napoli, coordinato dal Prof Claudio Pignata, in un ambito più ampio di collaborazione tra differenti gruppi di ricerca nazionali ed internazionali.

Il Responsabile scientifico si riserva di modulare il capitolato di spesa in relazione alle esigenze lavorative, mantenendo il vincolo della finalità scientifica per la sindrome Atassia Teleangiectasia.