

Atassia-Teleangiectasia: programmi di ricerca

Responsabile scientifico: Prof. Claudio Pignata

Esecuzione di un cross-over trial controllato e randomizzato multicentrico per la validazione su larga scala dell'efficacia a lungo termine del betametasone a basse dosi in pazienti AT

Principal Investigators: Prof. C. Pignata, Prof. R. Gatti

Studi recenti hanno evidenziato l'efficacia del betametasone per via orale nel migliorare i sintomi neurologici dell'A-T. Tali studi consistono in analisi di tipo osservazionale su piccoli gruppi di pazienti e per brevi periodi di tempo, che non consentono di stabilire in maniera univoca e con sufficiente credibilità statistica l'efficacia di tale farmaco ed i suoi effetti a lungo termine in questo nuovo ambito.

Al fine di dimostrare l'efficacia del betametasone per via orale nel migliorare i sintomi neurologici dell'A-T, ed al fine di valutare i suoi effetti a lungo termine, è necessario effettuare un trial controllato e randomizzato multicentrico, che, grazie al coinvolgimento di diversi gruppi di pazienti in varie nazioni, consentirà di analizzare un numero consistente di casi sottoposti alla terapia in esame. Tale trial sarà suddiviso in tre periodi di tempo e sarà caratterizzato dalla tecnica del cross-over. Saranno cioè costituiti due gruppi di pazienti: dapprima un gruppo sarà sottoposto alla somministrazione di betametasone a dosaggio minimo (Tale dosaggio è già stato definito ed il dato è in corso di pubblicazione. Fino alla definitiva accettazione del lavoro l'informazione è sottoposta ad embargo) per 60 giorni, mentre l'altro gruppo sarà sottoposto alla somministrazione di un placebo per 60 giorni; quindi seguirà un periodo di wash-out di 60 giorni per entrambi i gruppi; infine il primo gruppo, sottoposto inizialmente al trattamento, sarà sottoposto alla somministrazione del placebo per 60 giorni, mentre il secondo gruppo, sottoposto inizialmente al placebo, sarà sottoposto alla somministrazione del trattamento con betametasone per 60 giorni.

Il reclutamento dei pazienti nei due gruppi avverrà secondo una metodica random, il cui razionale, per garantire la totale casualità dell'allocazione, non sarà conosciuto allo sperimentatore (allocation concealment); inoltre la somministrazione del farmaco avverrà secondo la tecnica del doppio cieco, vale a dire che né lo sperimentatore né il paziente saranno a conoscenza di quale delle due opzioni terapeutiche possibili, betametasone o placebo, è in corso di somministrazione.

Nel corso della sperimentazione il paziente sarà sottoposto ad una serie di valutazioni cliniche e laboratoristiche programmate, ad intervalli prestabiliti. Il parametro utilizzato per valutare l'efficacia sui sintomi neurologici sarà la misurazione mediante una scala innovativa in corso di validazione da parte di una commissione internazionale, ottenuta dalla implementazione delle variabili presenti nella scala SARA. L'efficacia del trattamento sarà quindi valutata a completamento del trial, mettendo a confronto i risultati ottenuti nei due gruppi mediante tecniche statistiche. Tra gli outcome secondari, data la durata prolungata della somministrazione, sarà possibile osservare la comparsa di effetti avversi del betametasone e la permanenza nel tempo del miglioramento neurologico.

Obiettivi: Stabilire l'efficacia del betametasone nel migliorare i sintomi neurologici dell'A-T su un grande gruppo di pazienti affetti per un periodo di tempo prolungato e con un dosaggio molto basso.

Valutare la comparsa di eventi avversi in corso di somministrazione prolungata di betametasone a basse dosi.

Valutare la durata nel tempo degli effetti neurologici del betametasone a basse dosi in pazienti A-T.

Tempi previsti di attuazione degli obiettivi: Circa 2 anni

End Point: Pubblicazione scientifica

Questo studio richiede un cospicuo finanziamento che è in fase di stanziamento grazie ad interventi multipli di associazioni ed istituzioni internazionali.

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

Principal Investigator: Prof Pignata, Dott. C. Casentino, Prof. V. Costanzo

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 betametasona 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: Comprendere meglio anche nell'uomo il ruolo di ATM sul controllo e sull'attivazione di G6PD.

Comprendere i meccanismi molecolari di azione del betametasona 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

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 betametasono durante la terapia con betametasono in pazienti A-T.

Obiettivi: Quantizzare l'espressione di GILZ e GR su linfociti di pazienti A-T durante terapia con betametasono al fine di individuare un potenziale biomarker di risposta clinica dell'attività del betametasono.

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 2 anni

End Point: Pubblicazione scientifica

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

Valutazione del danno neurologico mediante Risonanza Magnetica Nucleare strutturale

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

Centri partecipanti: Napoli, Roma (Prof Chessa), Roma (Dott Finocchi, Prof Rossi), Milano (Prof Pietrogrande, Dott Delle Piane), Torino (Dott Martino) ed eventuali altri disponibili.

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 si è evidenziato che l'atrofia cerebellare rappresenta un evento non precoce, che correla inversamente con la risposta clinica al betametasone. 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 1,5 anni

End Point: Pubblicazione scientifica

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. Cirillo, Prof Pignata), Roma (Dott Finocchi, Prof Rossi), Milano (Prof Pietrogrande, Dott Delle Piane).

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 2 anni

End Point: Pubblicazione scientifica

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

Principal Investigators: Dott. F. Santamaria; Dott. C. Mollica

Centri partecipanti: Napoli (Dott Aloj, Prof Pignata), Roma (Dott Finocchi, Prof Rossi), Milano (Prof Pietrogrande, Dott Delle Piane) 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: 1 anno

End Point: Pubblicazione scientifica

Necessità economiche

Spese per reagenti:	€ 25.000
Spese di coordinamento, invio campioni biologici, utilizzo di facilities per analisi molecolari:	€ 10.000
Spese congressuali:	€ 3.000
Spese varie:	€ 2.000
Totale:	€ 40.000

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 italiani come indicato nelle collaborazioni. Tali studi verranno eseguiti nel contesto dello studio multicentrico o indipendentemente da esso.