



L'attività della ricerca biologica di base relativa ai gruppi ancora ubicati presso il CRS, verterà progressivamente ri-orientata verso una maggiore integrazione con l'attività clinica per assumere più direttamente le caratteristiche di "ricerca traslazionale preclinica" mantenendo i consueti obiettivi generali

I temi di attività scientifica saranno quindi contestualizzati nell'ambito delle nuove iniziative di ricerca traslazionale in corso presso l'istituto, finalizzati alla caratterizzazione molecolare dei tumori a scopo diagnostico, terapeutico-prognostico e per la implementazione di studi preclinici nella preparazione dei clinical trials di fase 1 e 2.

Nel merito i programmi nel prossimo futuro di questa direzione prevedono nuovi incontri selettivi con i singoli gruppi di ricercatori ubicati al CRS al fine di attualizzare nel più breve tempo possibile nuovi programmi di ricerca adeguati alle funzioni istituzionali dell'ente.

ATTIVITA' DI RICERCA

ISTITUTO SAN GALLICANO IRCCS

ANNO 2009

1. INTRODUZIONE

L'attività del San Gallicano si è svolta anche nel 2009 seguendo le due linee principali dell'attività clinico-assistenziale e della ricerca, nel rispetto degli obiettivi strategici della Direzione Generale e del Consiglio di Indirizzo e Verifica. Una particolare attenzione è stata posta alle linee strategiche generali dell'Ente, quali la centralità della persona, il rispetto del codice etico, l'implementazione degli studi traslazionali in particolare della medicina molecolare, il rispetto delle condizioni della buona pratica clinica e della ricerca, volte a favorire in maniera sinergica la massima traslationalità delle attività dell'Istituto. Inoltre il Comitato Tecnico Scientifico, organo tecnico di consulenza, è stato regolarmente interessato in ogni decisione riguardante la ricerca, la promozione di nuovi gruppi di studio, come i Centri Psocare e il Melanoma Unit e la valutazione delle nuove Linee di Ricerca corrente e finalizzata. Tra gli obiettivi prefissati sono in corso di attuazione nel 2009 il miglioramento delle pratiche gestionali, dei processi e sistemi di comunicazione, analitici e di budget, l'utilizzo ottimale dell'informatica a livello sanitario (scheda clinica informatica). E' stato poi sottolineato in più riunioni e seminari l'importanza dei collegamenti con il territorio sia in termini di municipi comunali che di Province e Regione. In maniera specifica l'Istituto, in accordo con l'Amministrazione, ha implementato gli aspetti istitutivi della biobanca e del consorzio laziale di medicina rigenerativa, mentre è in corso di riattivazione l'Azienda farmaceutica San Gallicano. Come anche, l'istituzione nel corso del 2009 del Melanoma Unit con il compito istitutivo di migliorare gli interventi a livello diagnostico preventivo e terapeutico, e del moderno laboratorio di metabolomica, diretto alla valutazione delle dermopatie dismetaboliche (come la psoriasi) infiammatorie (acne), o autoimmuni (la vitiligine). L'Istituto in particolare è referente nazionale dei centri Psocare e collabora con l'AIFA al fine di svolgere sul territorio in collegamento con gli altri centri il controllo epidemiologico, diagnostico e terapeutico a livello nazionale e a breve anche europeo dei quadri di psoriasi grave e di artropatia psoriasica.

Per quanto riguarda l'attività clinica, l'Istituto ha mantenuto gli standard numerici assistenziali già elevati nel 2008 in particolare per quanto riguarda le prestazioni ambulatoriali. Sono state inserite innovative metodiche diagnostiche non invasive come la teletermografia, la microscopia confocale, l' Artoscan-RMN mentre il Servizio

di Fotodermatologia è stato dotato di aggiornate strumentazioni, (simulatore solare, laser ad eccimeri). In campo chirurgico la tecnica del linfonodo sentinella è divenuta una metodica di routine mentre il week-hospital, tra i primi nella Regione Lazio, ha consentito una razionale distribuzione dei tempi di degenza ed un notevole risparmio economico. L'Istituto è centro di riferimento nazionale e regionale per le malattie sessualmente trasmesse (ASP, ISS), per il Melanoma, per le Porfirie, le dermatosi infiammatorie, in particolare la Psoriasi. Notevole successo ha avuto nel 2009 il II corso di Dermatopatologia, promosso dalla Regione Lazio, tenuto dai nostri specialisti e da relatori esterni. Nell'ambito delle Convenzioni è stata riconfermata con l'Istituto Superiore di Sanità la piattaforma congiunta dedicata alla sperimentazione clinica, nell'ambito di vaccini innovativi contro l'HIV/AIDS per l'allestimento e lo sviluppo di studi preparatori di ordine immunologico e virologico ed alla conduzione di sperimentazioni cliniche in Europa (AVIP) e nei Paesi in via di sviluppo.

Per quanto riguarda l'attività formativa sono state svolte numerose riunioni periodiche clinico-istologiche e tenute letture magistrali da specialisti di varie discipline con la partecipazione di medici, ricercatori e operatori sanitari dell'Istituto e di personale medico generico e specialistico del territorio.

E' stata rinnovata per ulteriori tre anni la Certificazione di Qualità ISO 9001 rilasciato da BVQI Italia in data 16.12.2009, riguardante tra l'altro la "Progettazione, gestione e conduzione di ricerca scientifica, Progettazione e erogazione di attività formative in qualità di Provider ECM".

Linee guida. Sono stati aggiornati in collaborazione con la Direzione Sanitaria Aziendale le linee guida e i percorsi diagnostico terapeutici ISG.

Autorità garante. E' continuata l'attività di referaggio dell'Istituto per l' Autorità garante riguardo i prodotti cosmetici.

Attività scientifica. Per quanto riguarda l'attività scientifica notevole è stato il contributo della pubblicistica scientifica con il riscontro di un aumento del 20% del numero di pubblicazioni che dell'IFN rispetto al 2008 nel campo delle dermopatie infettive, dei tumori cutanei, della dermatologia, delle dermatosi allergiche

L'attività scientifica è anche dimostrata dalla partecipazione attiva a Congressi, seminari e letture magistrali.

In definitiva l'andamento delle ricerche e degli studi nel corso del 2009, nonostante le difficoltà dovute a carenza di personale a causa del pensionamento di specialisti dermatologi e di fondi, è proseguito, con il valido supporto del personale sanitario e amministrativo dell'Ente, lungo le quattro linee istituzionali concordate con il Ministero della Salute, nel rispetto dei parametri ministeriali e delle direttive della Direzione Generale e del CIV.

2. RICERCA CORRENTE. RELAZIONE SCIENTIFICA ED ECONOMICA

RELAZIONE SCIENTIFICA.

L'attività di Ricerca corrente è stata svolta seguendo le linee di ricerca programmatiche approvate nel 2009 dal Ministero della Salute.

1. Malattie sessualmente trasmesse e HIV.

a) Sottotipi HIV non-B. I risultati hanno evidenziato che la prevalenza dei ceppi non-B è scesa tra i pazienti italiani al 15% (29% 2008) mentre tra i non italiani è risalita al 58% (53% nel 2008).

b) Test di resistenza genotipica. Sono stati eseguiti Test di resistenza genotipica in 50 soggetti naive e 48 test in soggetti con pluri-fallimento alla terapia HAART. I risultati dello studio sono stati pubblicati su due riviste con IF.

c) Studio SCM. In collaborazione con l'Istituto Spallanzani. Durante il 2009 sono stati segnalati 18 nuovi casi e completati i follow-up di 20 già arruolati in passato. Lo studio ha mostrato che soggetti con caduta più lenta delle cellule CD4+ prima dell'inizio della HAART mostravano un recupero più lento immunologico dopo terapia.

d) Marcatori di rischio cardiovascolare e HAART. Lo studio di coorte ha riguardato 26 individui di cui sono in corso di valutazione i dosaggi di IL-6 ICAM1 e-selectina, VEGF.

e) Studio SENDIH. Lo studio riguardante individui con comportamento a rischio ha interessato 40 soggetti con test HIV positivo. Le diagnosi tardive hanno rappresentato un terzo delle totali contro solo un 17% di tempestive (entro 6 mesi). Il restante 50% di diagnosi risulterebbero comunque "ritardate" considerando la necessità di cura e di prevenzione della trasmissione dell'infezione. La diagnosi tardiva si associerebbe al non avere test HIV nel passato (OR=4,6), essere eterosessuale (OR=1,6), avere un'età alla diagnosi maggiore di 30 anni (con picchi oltre i 49 anni), al non avere avuto MST, fatto sesso a rischio o aver usato droghe nell'ultimo anno. La casistica raccolta ha confermato l'osservazione dell'aumento del numero delle nuove diagnosi tra gli omosessuali e negli eterosessuali con più di 50 anni

f) Trials clinici vaccinali HIV. Sono proseguiti nel 2009 gli studi diretti alla caratterizzazione della risposta immune nei confronti di antigeni presenti nella formulazione di candidati vaccinali di nuova generazione inseriti nella linea di sviluppo di un vaccino contro lo HIV/AIDS. Di concerto, sono stati sviluppati studi diretti alla valutazione di nuovi sistemi di "delivery" di antigeni vaccinali, in cooperazione con partners europei afferenti al programma europeo AVIP per lo sviluppo di un vaccino contro lo HIV-1.

g) MST. Sifilide-gonorrea. Nel 2009 è continuato il monitoraggio annuale dei casi di sifilide primaria e secondaria diagnosticati presso il Centro IST dell'Istituto. In particolare dal 1 gennaio 1991 al 31 dicembre 2009, sono stati diagnosticati presso il Centro un totale di 925 casi di sifilide infettiva dei quali circa 700 (77%) dal 2004 al 2009. Lo studio degli andamenti mostra che dopo il 2000 il numero di casi è aumentato ogni anno fino al 2005, da 40 a 155 casi (+287%). Dal 2006 al 2009 l'andamento appare stabile con una leggera tendenza alla diminuzione dei casi dal 2006. Anche quest'anno ha contribuito alla casistica dei casi di sifilide il programma di screening della popolazione omosessuale denominato COROH. Nel corso dell'anno 2009 sono stati isolati 38 ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* da 36 pazienti afferenti la SC di Dermatologia Infettiva. I pazienti esaminati erano 35 maschi e 1 femmina. Dei 35 pazienti maschi, 9 erano eterosessuali e 20 omosessuali e 6 bisessuali. *Neisseria gonorrhoeae* veniva isolata da 28 tamponi uretrali (il 74% sul totale degli isolati), 4 rettali (10%), 4 faringei (10%), 1 da liquido seminale (3%), 1 da secreto cervico-vaginale (3%). In 2 pazienti maschi omosessuali abbiamo isolato *Neisseria gonorrhoeae* da tampone faringeo e da tampone rettale. In 1 pz maschio omosessuale *Neisseria gonorrhoeae* veniva isolata da tampone uretrale e da liquido seminale. I ceppi isolati, conservati a -80°C, vengono mensilmente inviati in terreno idoneo di trasporto (BHI con glicerolo) dal nostro Laboratorio alla Dott.ssa Paola Stefanelli del Dipartimento di Malattie Infettive dell'Istituto Superiore di Sanità, che prosegue lo studio fenotipico, di caratterizzazione genotipica e di resistenza agli antimicrobici maggiormente utilizzati in terapia sui nostri ceppi di *Neisseria gonorrhoeae*.

h) Morbo di Kaposi. Nel corso del 2009 abbiamo posto diagnosi di AIDS-Kaposi in 8 pazienti, 6 naive per trattamento anti-retrovirale e 2 pazienti già in trattamento antiretrovirale. Delle nuove diagnosi di infezione da HIV nel corso del 2009 (50 pazienti) 6 pazienti si presentavano alla nostra osservazione già con diagnosi di AIDS-Kaposi (12%). Di questi "advanced naive" 3 pazienti presentavano un peggioramento delle lesioni di Sarcoma di Kaposi a seguito dell'inizio della HAART (nel contesto di una sindrome da immuno-ricostituzione) e pertanto venivano sottoposti a terapia antiretrovirale associata a chemioterapia sistemica con doxorubicina liposomiale e successiva HAART di mantenimento. In tali pazienti si otteneva un tasso di remissione completa all'incirca del 66% in accordo ai dati della letteratura. Diversamente per gli altri 3 pazienti era possibile gestire le lesioni di Sarcoma di Kaposi solo con i farmaci antiretrovirali altamente efficaci (50%), sempre in accordo con i dati della letteratura internazionale. Nel 2009 in collaborazione con la UOC di Chirurgia Plastica ISG sono state eseguite 20 sedute totali di elettrochemioterapia (1,2), così distribuite: 11 pazienti sono stati trattati con un'unica seduta di ECT, su 7 pazienti l'elettroporazione è stata ripetuta, in sedute dedicate, su aree cutanee distinte, a causa della numerosità delle lesioni nodulari o a placca e

dell'estensione delle regioni cutanee interessate dalla malattia. Infine su 2 pazienti, che hanno presentato una risposta parziale ad un primo trattamento, è stato necessario eseguire una seconda applicazione di elettrochemioterapia. I nostri risultati hanno mostrato una risposta completa nell'80% dei casi (16/20) e una risposta parziale nel 20% (4/20) dei pazienti trattati con tale metodica. Tali percentuali di risposta sono in accordo con i dati della letteratura. Il farmaco chemioterapico usato è stata la bleomicina in tutti i casi (15 U.I. in bolo 15 minuti prima dell'elettroporazione), i pazienti sono stati sottoposti ad anestesia generale. La tollerabilità all'elettrochemioterapia è nel complesso buona. Per tutti i pazienti è stata eseguita una biopsia cutanea delle lesione papulo-nodulari prima e dopo ogni seduta di trattamento che ha permesso di definire il tipo di risposta. La maggior parte dei pazienti è stata sottoposta a valutazione su sangue periferico dell'HHV8 plasmaviremia e del titolo anticorpale HHV8-Ab.

i) MST. HPV. Da agosto 2009 a gennaio 2010 sono stati arruolati 70 pazienti (età mediana 30 anni, 94.3% di etnia Caucasica), sui quali è stato effettuato lo studio di correlazione HPV cancro anale in particolare in soggetti omobisessuali sia HIV positivi che immunocompetenti. In tutti è stato effettuato un prelievo anale per la valutazione citologica e per la ricerca e determinazione del DNA di HPV e mRNA per le oncoproteine E6/E7 dei tipi ad alto rischio a maggiore prevalenza nel carcinoma anale. La prevalenza dell'infezione anale da HPV è risultata del 77.1%. L'81.5% dei pazienti HPV-positivi è risultato infetto da genotipi a basso rischio, mentre tipi ad alto rischio sono stati rilevati nel 72.2% dei casi. Le infezioni multiple (>1 tipo di HPV) hanno riguardato il 72.2% dei pazienti. Sul sottogruppo di 27 pazienti analizzati per l'mRNA, la prevalenza assoluta dell'mRNA è risultata del 70.4%. Tra i 58 pazienti di cui è stato valutato il campione citologico, sono state evidenziate anomalie cellulari in 33 casi (56.9%). In particolare, sono stati individuati 22 casi di ASCUS (37.9%) e 11 di LSIL (18.9%). La presenza di alterazioni citologiche è risultata significativamente associata ad infezione anale da HPV ad alto rischio (COR=7.67; 95% IC: 1.47-50.22). I pazienti con LSIL sono risultati più vecchi e con numero di partners sessuali maggiore, nei precedenti 6 mesi, rispetto ai pazienti con citologia normale o ASCUS.

2. Dermatologia Oncologica

a) Melanoma primitivo multiplo e melanoma familiare. Nel corso del 2009 abbiamo arruolato 12 pazienti affetti da Melanoma Primitivo multiplo ed 8 pazienti affetti da Melanoma familiare. Nel gruppo del Melanoma Primitivo Multiplo sono stati inclusi i pazienti con almeno due melanomi istologicamente accertati. Dei 12 pazienti con MPM 8 sono sincroni e 4 metacroni. L'età è compresa tra i 25 ed i 68 anni, 8 sono femmine e 4 maschi. Tutti i pazienti presentano fototipo chiaro, tendenza alle ustioni solari e presenza di più di 25 nevi distribuiti su tutto l'ambito cutaneo. Nel gruppo del melanoma familiare, sono inclusi pazienti con almeno un altro

caso di melanoma nella stessa famiglia, con parentela di 1° grado: genitori, figli, fratelli. Degli 8 pazienti con MF (3 maschi, 5 femmine), l'età è compresa tra i 19 e 62 anni. Anche in quest'altro gruppo di pazienti, come per MPM, prevalgono fenotipo e fototipo chiari e presenza di numerosi nevi. In tutti i casi è stata effettuata una consulenza genetica, l'elaborazione dell'albero genealogico con particolare attenzione anche alla eventuale presenza di altre neoplasie manifestatesi nell'ambito familiare. Ricordiamo, infatti, che la mutazione CDKN2A predispone oltre che al melanoma anche al carcinoma del pancreas e del laringe, in tutti i casi, previo , consenso informato è stato effettuato prelievo di sangue periferico. Quando il test genetico sul malato non porta all'identificazione di alcuna mutazione, il test viene considerato non conclusivo per l'interpretazione della storia di quella famiglia in cui non è possibile escludere la presenza di una mutazione genetica non identificata dall'analisi attualmente disponibile (test non informativo). Quando, invece, una mutazione viene identificata in un familiare affetto è possibile mettere a disposizione dei parenti consanguinei un test specifico di mutazione che valuta la presenza o meno nei singoli membri della famiglia di quel preciso difetto genetico. Ci proponiamo di arruolare un totale nello studio di circa 50 pazienti affetti da melanoma primitivo multiplo sporadico e/ familiare allo scopo di valutare meglio l'incidenza delle mutazioni dei geni suddescritti nella nostra casistica per poter delineare linee guida più aggiornate nel follow up dei pazienti affetti da melanoma cutaneo familiare e multiplo.

b) Proliferazione e differenziamento dei melanociti. Abbiamo quindi analizzato in colture primarie di melanociti l'attivazione del PPAR- γ in risposta a stimolo di MC1R da parte dell' α -MSH, riscontrando la sua induzione genica con un incremento dell' mRNA. Abbiamo riconfermato lo stesso risultato anche in cellule B16-F10 di melanoma murino, utilizzato come modello elettivo negli studi di pigmentazione, per la ampia conoscenza che si ha dei meccanismi di trasduzione che vengono attivati in seguito a stimolo di MC1R. In queste cellule l'induzione del PPAR- γ in risposta ad α -MSH è associata alla sua traslocazione nel nucleo, l'attivazione del fattore di trascrizione promuove caratteristiche di differenziamento, che includono l'induzione della melanogenesi e il controllo del tasso di proliferazione. L'induzione del PPAR- γ , in risposta all' α -MSH, sembra essere solo in minima parte dipendente dalla via di trasduzione del segnale classicamente descritta per l' α -MSH che coinvolge l'attivazione dell'adenilato ciclasi, l'aumento dell' AMP ciclico e la conseguente attivazione della PKA e successivamente del fattore di trascrizione MITF. L'induzione del PPAR- γ è invece principalmente connessa all'attivazione della via di trasduzione innescata dall'attivazione della fosfolipasi C.

c) Linfonodo sentinella. Nel corso del 2009 sono stati analizzati 38 sezioni in paraffina di linfonodo sentinella relative a 25 pazienti operati tra il 1997 ed il 2000 e da allora in follow-up presso il nostro Istituto. In ogni sezione è stata ricercata la presenza di mRNA che codifica per l'enzima tirosinasi con

metodiche di biologia molecolare (RT PCR). L'esame immunoistochimico è risultato negativo per 35 campioni relativi a 20 pazienti e positivo per 3 campioni relativi a 3 pazienti. La ricerca dell'mRNA della tirosinasi è risultata positiva, oltre che nei 3 campioni già identificati dall'immunoistochimica, anche in 4 campioni relativi a due pazienti con immunoistochimica negativa. L'analisi del follow-up ha evidenziato che uno dei due pazienti ha sviluppato successivamente metastasi ai linfonodi regionali. E' da segnalare che 3 campioni, relativi a due pazienti, sono risultati negativi ad entrambe le metodiche mentre durante il follow-up i pazienti hanno sviluppato metastasi ai linfonodi regionali. I dati in nostro possesso mettono in evidenza una migliore sensibilità della metodica molecolare rispetto all'immunoistochimica, sono tuttavia necessari ulteriori studi su un maggior numero di campioni per poter trarre le definitive considerazioni.

d) Elettrochemioterapia e tumori cutanei. Durante l'anno 2009 abbiamo sottoposto ad Elettrochemioterapia: 21 pazienti per un totale di 33 trattamenti. Di questi 20 riguardavano il trattamento di metastasi in transito da Melanoma, 8 il trattamento di Sarcoma di Kaposi e 5 il trattamento di linfangiti neoplastiche da Carcinoma della mammella. Rapportando questi dati alla nostra casistica generale (che dal marzo del 2007 è di 81 ECT) si estrapola un dato relativo alla valutazione della risposta sulle "lesioni target" secondo i criteri RECIST del tutto in linea con i dati pubblicati in letteratura e del tutto incoraggianti a continuare l'applicazione della metodica.

e) HPV i tumori cutanei. La casistica della Dermatologia oncologica riguarda 15 casi di tumori cutanei: 5 carcinomi spinocellulari, 5 carcinomi bowenoidi e 5 carcinomi basocellulari. La casistica raccolta dalla Dermatologia oncologica è di: 5 Carcinomi spino cellulari, 5 Carcinomi basocellulari, 5 Morbo di Bowen Che riguardano 15 pazienti di cui: 11 maschi di età compresa tra 41 e 81 anni (età media 56anni) con 4 Carcinomi Spinocellulari (2testa-collo; 2 tronco) 4 Carcinomi basocellulare (1testa-collo; 2 arti; 1 tronco) 3 Carcinomi Bowenoide (1 testa-collo; 1 arti; 1 tronco) 4 femmine di età compresa tra 45 e 78 anni (età media 62 anni) con 1 Carcinoma spinocellulare (tronco) 1 Carcinoma basocellulare (tronco) 2 Carcinomi Bowenoide (1testa-collo; 1 Tronco). In questi pazienti sono in corso le indagini di biologia molecolare volte ad identificare, tipizzare e caratterizzare l'eventuale infezione da HPV. Nei casi in cui il virus verrà identificato, al fine di valutarne il potenziale oncogeno, si procederà quindi all'analisi molecolare per l'identificazione dell'mRNA degli oncogeni E6 ed E7 la cui espressione si associa significativamente alla gravità delle lesioni.

3) Patologie infiammatorie croniche e degenerative

a) Studio delle cellule regolatorie nella psoriasi e in altre dermatosi. Alla data attuale (04-03-2010) sono stati raccolti campioni ematici e cutanei in 12

pazienti (9 maschi e 3 femmine; età mediana 48 aa range 32-66). Di questi 2 sono affetti da psoriasi artropatica e 10 da psoriasi volgare. Sono state somministrate le seguenti terapie: etanercept 50 0 100 mg a settimana sottocute (7 pazienti), adalimumab 40 mg ogni 2 settimane sottocute (2 pazienti), ustekinumab 45 mg sottocute (1 paziente), methotrexate 10 mg I.M. 1 volta a settimana. In uno dei 2 pazienti trattati con adalimumab è stata effettuata una induzione con 80 mg sottocute. Il soggetto in terapia con ustekinumab ha effettuato attualmente solo la prima somministrazione del farmaco (25-02-2010). E' prevista, come da scheda tecnica, una ulteriore somministrazione a distanza di 4 settimane dalla prima e successivamente ogni 12 settimane. Attualmente 4 pazienti hanno completato lo studio (T24), 8 sono ancora in fase di valutazione (4 a T12, 4 a T0). Si continua l'arruolamento dei pazienti e la raccolta dei campioni ematici e cutanei. La loro abilità di inibire la risposta immunitaria rende le cellule T regolatorie un target interessante per la possibilità di intervenire nel controllo della reattività autoimmune e il ripristino della condizione di self-tolerance in pazienti con patologie autoimmuni. Infatti, le T reg agiscono sulle cellule dendritiche limitando l'attivazione di cloni T autoreattivi. Nell'ambito dello studio dell'andamento delle Treg circolanti in associazione con pattern citochinici Th1, Th2, Th17 in pazienti affetti da psoriasi in corso di terapia, abbiamo studiato l'espressione del fenotipo T reg (CD4+/CD25+/FoxP3+) in condizioni basali, dopo 12 e dopo 24 settimane di trattamento con farmaci biologici (Etanercept, Infliximab, Humira). Sono stati analizzati 14 pazienti prima dell'inizio della terapia, 9 pazienti dopo 12 settimane e 4 pazienti dopo 24 settimane. I risultati preliminari indicano un lieve aumento dei linfociti CD4 (T0: 855 ± 289 , T1: 895 ± 282 , T2: 1171 ± 230), e una lieve diminuzione della quota di CD4 con marcatori di T reg (T0: 2.07 ± 1.52 , T1: 2.07 ± 1.3 , T2: 1.8 ± 0.99); per una attendibile analisi statistica dei dati dobbiamo disporre dei dati relativi a tutti i tempi.

b) Terapia rotazionale della psoriasi. E' stato effettuato l'arruolamento di 10 pazienti affetti da psoriasi volgare di grado moderato-severo, che in base ai parametri clinico-laboratoristici sono stati sottoposti a somministrazione di farmaci sistemici, (in particolare biologici). 5 pazienti si inquadrano attualmente in fase 1 (induzione della risposta terapeutica). 5 pazienti si inquadrano attualmente in fase 2 (mantenimento della risposta terapeutica). Pazienti in fase 1: 3 pazienti in trattamento con l'infliximab, 2 pazienti in trattamento con ciclosporina. Pazienti in fase 2: 2 pazienti in trattamento con infliximab, 3 pazienti con methotrexate. I pazienti arruolati sono sottoposti periodicamente alla valutazione dei seguenti indici oggettivi: (PASI-BSA) e soggettivi: (DLQI-POMS-TEPS). Al completamento del protocollo rotazionale saranno valutati i risultati ottenuti nel confronto con un gruppo di controllo di 10 pazienti trattati in monosomministrazione.

c) Dermatite atopica. Ad oggi (2009) abbiamo conservato il siero, il plasma, il sangue intero e PBMC, vitali criopreservati, da un totale di 70 bambini con

dermatite atopica medio-grave di età compresa tra 0 ed 1 anno. Ogni bambino arruolato nello studio è stato sottoposto ad una visita dermatologica ed allergologica, sono state inoltre compilate delle schede con tutti i dati anagrafici e clinici, descrivendo con particolare attenzione se presente una storia familiare di atopia e lo SCORAD valutato il giorno dell'arruolamento. Ogni scheda è stata informatizzata al computer e completata da un file contenente delle immagini fotografiche. Ogni bambino è stato sottoposto a Skin Prick test per alimenti e aeroallergeni, RAST per allergeni alimentari e acari della polvere (latte, uovo, grano, pesce, *Dermatophagoides pteronyssinus* e *farinae*) e PRIST. Dopo aver condotto esperimenti preliminari, utilizzando le cellule criopreservate di 5 bambini, utili per stabilire le condizioni sperimentali ottimali per lo studio in vitro (concentrazione delle tossine, tempi di incubazione, numero di cellule da coltivare); nel corso del 2009 abbiamo effettuato la parte sperimentale in vitro riguardante la stimolazione in vitro dei PBMC isolati dal sangue periferico di 40 bambini con i principali antigeni commerciali purificati del *D. pteronyssinus* (Derp-1 e 2). Brevemente, 5×10^5 cellule sono state mantenute in coltura in presenza con due concentrazioni diverse di antigene (2 e 10 $\mu\text{g/ml}$ di Derp1 e Derp2, o PHA 1 $\mu\text{g/ml}$) per 96 ore. Il terreno di coltura è stato quindi prelevato e centrifugato, per eliminare eventuali residui di cellule, e conservato a -80°C . Tali Surnatanti di coltura saranno utilizzati per misurare, mediante saggi quantitativi immunoenzimatici, il rilascio di citochine (Treg: TGF- β 1, Th17: IL-23, IL-9, TH1 e 2: IL-2, 4, 5, 8, 10, 12, 13, IFN- γ , TNF- α). Da una prima analisi dei dati clinico-allergologici risulta che il PRIST è significativamente aumentato in 15 bambini (valore mediano 260 U/ml, range 150-770). I Prick test per alimenti e aeroallergeni sono risultati negativi in tutti i 70 bambini. I RAST per antigeni alimentari quali la caseina sono risultati positivi con un indice di 2 e 3 in 7 bambini, 4 dei quali con PRIST positivo, e in 2 bambini con PRIST negativo con un indice di 1; il RAST per la alpha-lattoglobulina è risultato positivo, con un indice basso di 1, in 4 bambini positivi anche alla caseina, e per la betalattoalbumina, con indice di 2, in 3 bambini che mostravano un PRIST nella norma (0-120 U/ml). Solo un bambino ha presentato un RAST all'uovo con indice di 3 associato ad un PRIST di 180 U/ml e un altro al grano con indice di 3 ma PRIST negativo. Nessun bambino ha mostrato positività al pesce. Abbiamo misurato la percentuale di linfociti T con marcatore di *homing* cutaneo (CD3+CLA+) nel sangue periferico di tutti i bambini e stiamo elaborando i dati in associazione con lo SCORAD su base statistica. Ad oggi sono in corso gli esperimenti di analisi del rilascio delle citochine. Inoltre è in corso la valutazione clinico-allergologica di tutti i bambini arruolati nello studio, ad un anno dalla prima. Nei bambini che si presenteranno alla visita di controllo verrà considerata la eventuale comparsa di manifestazioni di tipo allergico, quali asma bronchiale e rinocongiuntivite, e verranno rivalutati parametri di laboratorio per monitorare l'andamento di IgE specifiche e totali, e ripetuti i prick test ad alimenti ed aeroallergeni.

d) MRSA e atopia. Nel corso del 2009 sono stati arruolati 48 pazienti afferenti gli Ambulatori Dermatologici dell'Istituto, di entrambi i sessi con dermatite atopica in età compresa tra 1 mese e 11 anni (mean 4 aa). I bambini sono stati sottoposti a prelievo microbiologico da lesione cutanea, da cute sana e da fosse nasali. Abbiamo eseguito il tampone da fosse nasali ad un gruppo di controllo (43 bambini) esente da patologie (controlli sani). La ricerca in corso è stata estesa ai conviventi dei pazienti, attraverso prelievo microbiologico da fosse nasali, per determinare l'eventuale trasmissione dell'infezione stafilococcica all'interno del gruppo familiare. I tamponi effettuati sono stati seminati su terreni di coltura arricchiti (Agar sangue), selettivi (MSA Agar), e cromogeni (ChromID MRSA Agar- BioMérieux, France) ed incubati a 37°C per 24-48 h. Le colonie isolate erano sottoposte a colorazione di Gram per verificare la presenza di cocci Gram-positivi, test per la produzione della catalasi, test di agglutinazione per l'individuazione del "clumping factor" ed infine identificazione della specie ed allestimento delle prove di sensibilità agli antibiotici con determinazione delle minime concentrazioni inibenti (M.I.C.) mediante sistema semi-automatico VitekC (BioMérieux, France). La conferma dei ceppi resistenti alla oxacillina (OXA-R) veniva eseguita mediante test di conferma per la proteina PBP2 per l'identificazione di MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*). Al fine di valutare la trasmissione tra colonizzazione nasale sia del paziente che del convivente e l'infezione sui siti lesionali, i ceppi di *S. aureus* sono stati sottoposti ad identificazione fenotipica attraverso test di emo-agglutinazione passiva inversa (Oxoid, UK) per la determinazione delle tossine SEA, SEB, SEC, SED e della tossina da shock tossico (TSST-1). Dei 48 pazienti studiati, 22 (46%) sono risultati colonizzati da *S. aureus*. Nella cute lesionale dei pazienti affetti da dermatite atopica (DA), abbiamo riscontrato il 35% di prevalenza (17 pazienti), mentre, nelle fosse nasali, *S. aureus* è stato isolato nel 31 % dei pazienti (15). Nel 21% dei bambini atopici, abbiamo isolato SA contemporaneamente nella cute lesionale e nelle fosse nasali. Nella cute sana dei soggetti atopici abbiamo ritrovato SA solo in 2 dei 48 pazienti esaminati (4%). I ceppi oxacillino-resistenti (MRSA) rappresentava l'8% (4 pz) sul totale degli isolati dai pazienti atopici. Nei 43 bambini considerati "controlli sani", la positività a SA scendeva all' 11% (5 pz). Abbiamo analizzato tutte le famiglie dei pazienti atopici: 14 familiari avevano una colonizzazione nasale da *S. aureus*. Il 65% dei ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da pazienti affetti da DA rilasciavano 1 o più tossine; interessante osservare che vi era una coincidenza del 98% fra i tipi di tossina prodotta dai ceppi isolati dai diversi siti di prelievo nello stesso paziente. I ceppi produttori di tossine rappresentano il 70% degli isolati. I ceppi di *S. aureus*, conservati a -80°, vengono successivamente inviati al Prof. C. Passariello (Docente di "Microbiologia Generale con biotecnologie microbiche" presso l'Università "La Sapienza" di Roma) al fine di valutare l'epidemiologia molecolare dei ceppi isolati.

e) Acne. Con tecnica moderna TOF (time of flight) sono state filtrate le specie con composizione elementare propria delle singole classi lipidiche. L'accuratezza di massa è stata determinata su alcuni composti standard di riferimento per ciascuna classe lipidica. Con questo approccio, tra gli analiti eluiti dal sistema cromatografico sono state selezionate più di 90 specie riconducibili ai triacilgliceroli (TAG), più di 60 specie appartenenti ai diacilgliceroli (DAG), 6 esteri del colesterolo, più di 90 esteri delle cere (WE), e circa 50 acidi grassi liberi (FFA). Dall'analisi generale del sebo risulta che i lipidi complessi sono formati per esterificazione di acidi a lunga catena tra cui l'acido sapienico/palmitoleico, palmitico, e oleico risultano quelli più abbondanti. I risultati di questa caratterizzazione sono in linea con quanto dimostrato attraverso l'analisi GC-MS degli acidi grassi metilati ottenuti dall'idrolisi dei lipidi complessi componenti, indicando che l'approccio analitico è dotato di una buona affidabilità per l'identificazione delle caratteristiche maggiori. Il vantaggio aggiuntivo offerto da questo metodo è quello legato alla possibilità di analizzare i lipidi nella loro forma intatta e di delinearne contemporaneamente la struttura nel sebo in toto senza ricorrere a laboriosi processi di decomposizione chimica. Tra gli acidi grassi liberi si sono potute evidenziare il tipo di caratteristiche strutturali che sono state precedentemente descritte, cioè la presenza di ramificazioni iso e anteiso e l'isomeria "sebacea" dei doppi legami. Lo squalene è l'unica specie sinora identificata che abbia una struttura univoca. Il metodo ha consentito di rilevare sia lo squalene in forma nativa che i suoi prodotti di ossigenazione. I risultati dello studio e la descrizione del metodo analitico sono oggetto di un lavoro in preparazione. I dati che emergono rendono conto della complessità del sebo e pongono le basi per l'indagine del ruolo delle alterazioni sebacee nella patogenesi dell'acne.

f) Ulcere croniche. PRP. Nel corso del 2009 sono stati da noi selezionati 10 casi di lesioni croniche già trattate con medicazioni avanzate, ma con scarsi risultati da più di un anno. Tra questi abbiamo reclutato ulcere di diversa eziopatogenesi come ulcere da decubito, ulcere vascolari degli arti inferiori e ulcere diabetiche. Queste lesioni sono state misurate e fotografate prima di iniziare il trattamento. Sulle stesse è stato eseguito un tampone per studio microscopico colturale delle secrezioni e ove positivo è stato fatto un antibiogramma. Nei casi di positività è stata approntata idonea terapia antibiotica. Su questi pazienti è prevista l'applicazione di gel piastrinico e PRP autologo ottenuto tramite un prelievo di sangue venoso del paziente stesso e sottoposto a centrifugazione per ottenere la separazione del plasma ricco di piastrine (PRP). Abbiamo selezionato 8 pazienti con radiodermiti di vari distretti soprattutto a livello delle zone di maggiore limitazione funzionale articolare a causa di forti retrazioni cicatriziali ad esempio pilastro ascellare, piega del gomito. In questi pazienti abbiamo effettuato un autotrapianto di grasso autologo prelevato dalla regione addominale e centrifugato per ottenere la separazione della componente ematica e oleosa. La reiniezione con

micro cannule ha consentito di ottenere un miglioramento della sintomatologia algica e di quella funzionale in tutti i casi, oltre ad un miglioramento del trofismo e dell'elasticità della pelle.

g) Malattie rare. Nel corso degli ultimi 2 anni, e' stata messa a punto una nuova metodica in HPLC per la separazione e il dosaggio della Protoporfirina IX della Zn-Protoporfirina negli eritrociti. Le metodiche estrattive non separavano la Protoporfirina IX dalla Zn-Protoporfirina. I risultati evidenziano come vi sia un'ottima separazione dei picchi specifici di ogni metabolita e come la nuova metodica consenta di avere risposte in tempi molto più brevi e con un'accuratezza e sensibilità di molto superiori ai precedenti metodi estrattivi. Casi di intossicazione da Pb (aumento della sola frazione di Zn Proto negli eritrociti) possono essere diagnosticati senza dovere ricorrere al dosaggio dell'attività enzimatica specifica (ALA Deidras). E' stato testato un numero statisticamente significativo di soggetti sani (circa 200) al fine di stabilire i valori normali dei due metaboliti. Successivamente il metodo è stato utilizzato per l'individuazione e il dosaggio dei due metaboliti in soggetti affetti da porfirie eritropoietiche (60 casi), o con sospetto di porfiria eritropoietica (79 casi) e in tutti i casi con sospetto di intossicazione da piombo (5 casi).

4. Fotodermatologia e Allergologia

a) Vitiligine. Nell'ambito degli studi sui meccanismi patogenetici della vitiligine sono proseguite le ricerche sull'identificazione delle alterazioni biochimiche alla base della maggiore suscettibilità dei melanociti di soggetti con vitiligine a agenti pro-ossidanti. Nel corso di questa prima fase del progetto di ricerca, si è provveduto altresì all'isolamento e alla messa in coltura di melanociti epidermici da aree normo-pigmentate non lesionali di soggetti vitiligoidei e da soggetti adulti sani di controllo. La valutazione in vitro della capacità dei melanociti epidermici da cute di soggetti con vitiligine di rispondere agli specifici fattori di crescita (aMSH) è stata effettuata mediante una analisi quali-quantitativa citofluorimetrico dei pathway intracellulari attivati. A tale scopo è stato condotto uno studio cinetico del pattern di fosforilazione di alcune chinasi membrana-dipendenti e dei fattori di trascrizione da esse dipendenti in seguito al trattamento in vitro con aMSH. I melanociti vitiligoidei sono caratterizzati da una maggiore fosforilazione nei siti inibitori (serina 910) (mediana di fluorescenza 643 verso 287) e non attivatori (tirosina 397) (mediana di fluorescenza 155 verso 420) della chinasi FAK, da un aumento dell'attività di CREB (mediana di fluorescenza 280 verso 200) e da una ridotta (mediana di fluorescenza 345 verso 534) fosforilazione di ERK1/2. I risultati ottenuti evidenziano una risposta alterata ai fattori di crescita fisiologici. La alterata trasduzione del segnale di membrana, come indicato dal differente pattern di fosforilazione delle chinasi valutate, potrebbe compromettere i meccanismi di sopravvivenza sia in condizioni normali sia in seguito ad esposizione a stimoli nocivi (fisici,

frizione, e chimici). Per valutare se le alterazioni della costituzione di membrana sono specifiche dei melanociti o presenti anche in altre cellule è stato condotto uno studio sui linfomonociti del sangue periferico. La valutazione, mediante un approccio citofluorimetrico multiparametrico, ha permesso di sottolineare la presenza di un ridotto contenuto in cardioplipina delle membrane e la conseguente alterata espressione di proteine transmembrana. Per poter effettuare queste valutazioni, i linfomonociti del sangue periferico, sono stati fissati con paraformaldeide immediatamente dopo il prelievo e l'isolamento. Come riportato in letteratura, l'intensità di fluorescenza di nonyl acridine orange (NAO), utilizzata a concentrazioni scalari in un range micromM, fornisce una misura del contenuto e della distribuzione trans membrana della cardioplipina, essendo il rapporto stechiometrico pari a 2:1. L'immediata analisi citofluorimetrica e la successiva rielaborazione statistica del valore di fluorescenza, ha permesso di evidenziare un ridotto livello di cardioplipina non ossidata nei linfomonociti di soggetti con vitiligine (75% verso 92% di saturazione della specifica probe fluorescente), non correlato al livello di specie reattive dell'ossigeno (ROS) generate all'interno delle cellule e quindi non dipendente da un processo di ossidazione ma piuttosto da un difetto intrinseco di produzione. Gli stessi linfomonociti presentavano inoltre un aumentato livello di colesterolo di membrana (25 ug/mg proteina verso 10 ug/mg proteina). I dati ottenuti sui due modelli supportano ulteriormente l'ipotesi di lavoro che una alterazione del metabolismo lipidico possa essere la base biochimica di molte delle alterazioni riscontrabili nelle cellule di soggetti con vitiligine e che possa essere il fattore principale dello sviluppo di uno stress ossidativo in corso di vitiligine.

b) Invecchiamento cutaneo. Sono stati approntati modelli in vitro di senescenza foto-indotta che prevede l'irraggiamento di fibroblasti umani primari con una singola dose di UVA in presenza di 8-metossipsoralene (8-MOP). Risultati: a) il modello di senescenza foto-accelerato utilizzato determina nei fibroblasti una condizione di persistente stress ossidativo direttamente coinvolta sia nell'induzione, sia nel mantenimento del fenotipo senescente; b) nei fibroblasti foto-irradiati l'elevata produzione di ROS e lo sbilanciamento degli antiossidanti endogeni sono coinvolti attraverso l'attivazione di p53 e p21 nell'arresto del ciclo cellulare; c) il trattamento con la parrotina determina dei cambiamenti nel sistema redox cellulare come dimostrato dall'aumento della capacità antiossidante totale, dell'attività catalasica basale, e dei livelli di alfa-tocoferolo nelle membrane cellulari. La parrotina è in grado di contrastare, almeno in parte, il fenomeno di senescenza nei fibroblasti foto-irradiati, determinando i seguenti effetti: a) protegge dalle alterazioni del sistema antiossidante cellulare; b) protegge la membrana cellulare da fenomeni di perossidazione e da alterazioni nella composizione lipidica correlate con l'attivazione della senescenza cellulare

indotta dall'esposizione alla PUVA; c) contrasta la comparsa della morfologia tipica della senescenza cellulare; d) riduce l'espressione della β -galattosidasi associata alla senescenza; e) diminuisce l'attivazione di proteine regolatorie del ciclo cellulare (in particolare p21). Questi risultati indicano come il KGF svolga un'efficiente difesa contro i danni da fotoesposizione. Nel complesso i risultati indicano che i meccanismi di protezione adottati dalla cute nei confronti delle radiazioni UV coinvolgono tutte le popolazioni cellulari della cute attraverso l'attivazione di un network paracrino che ha come finalità la riduzione del danno sui target cellulari specifici attraverso l'induzione di una risposta pigmentaria e l'incremento delle attività antiossidanti.

c) Dermatiti allergiche ed alimentari. Sono stati arruolati nello studio 232 pazienti (136 donne e 96 uomini di età compresa tra 2 e 63 anni) affetti da orticaria o da dermatite atopica. Tutti i pazienti hanno effettuato prick test sia con estratti del commercio di alimenti della dieta mediterranea che con allergeni inalanti. I risultati hanno confermato i dati degli anni precedenti, in particolare gli allergeni responsabili della maggior parte delle reazioni positive al prick test sono stati : arachidi, nocciola, noce , pomodoro, grano, pesca e proteine del latte. Inoltre, in accordo con il piano dello studio, sono state prese in esame 1 varietà di grano tenero recentemente ottenuta per incrocio varietale (Bolero) e 2 di grano duro, di cui una (Senatore Cappelli) è una varietà antica ottenuta per selezione, l'altra moderna (Colosseo) derivante da ibridi varietali. I risultati hanno dimostrato che la varietà Senatore Cappelli ha un potere allergizzante significativamente meno elevato delle altre due varietà. Studi sono in corso per identificare mediante immunoblotting le ragioni del minore potere allergizzante della varietà Senatore Cappelli . Abbiamo anche iniziato uno studio per valutare se la lievitazione con pasta madre riduce il potere allergizzante della farina in maniera più accentuata della lievitazione con lievito di birra. A tale scopo abbiamo estratto le proteine solubili e insolubili dai due tipi di pane ottenuto con la varietà Bolero ed abbiamo saggiato per Prick sugli stessi pazienti il potere allergizzante. I risultati hanno indicato che il potere allergizzante del pane lievitato con pasta madre è significativamente più basso di quello del pane lievitato con lievito di birra. Studi sono in corso mediante immunoblotting per chiarire le ragioni di queste differenze.

d) Test in vitro. Il lavoro svolto durante il 2008 ci ha permesso di definire una procedura standardizzata per l'analisi delle risposte cellulo-mediate specifiche verso diversi antigeni ed allergeni nella diagnosi di DAC da associare al patch test. Per analizzare la risposta immunologica ai metalli, ed in particolare al Pd, nei pazienti affetti da DAC associata o meno a sintomi clinici quali cheilite, stomatite, bruciore della bocca, che potevano essere correlati con la presenza della protesi dentaria, abbiamo utilizzato il nuovo protocollo in vitro. Questa nuova procedura ha previsto l'utilizzo del test Quantiferon TB-Gold modificato. Questo test viene generalmente utilizzato

per la diagnosi di reattività immunologica verso antigeni specifici del Micobatterio tubercolare, risulta molto più semplice e veloce dell'ELISpot, ed è capace di evidenziare le risposte cellulo-mediate specifiche dirette contro diversi antigeni. Per avere una ulteriore conferma della validità di questa procedura anche in pazienti sensibilizzati a metalli diversi dal nichel, abbiamo arruolato 20 soggetti, di cui 10 monosensibilizzati al Pd e 10 soggetti sani di controllo, e misurato nel plasma il rilascio di IFN- γ da parte dei linfociti attivati. Questa misurazione è stata eseguita mettendo ad incubare a 37°C per 24 ore, nell'incubatore, il sangue intero (1ml) del soggetto allergico in presenza di una concentrazione sub-tossica dello ione metallico da testare. I dati hanno chiaramente dimostrato che i pazienti allergici al Pd rilasciano una quantità di IFN- γ sensibilmente molto più alta rispetto ai controlli sani. Possiamo quindi affermare che la sensibilità al Pd può essere testata in vitro mediante ELISpot, ma anche evidenziata mediante la suddetta procedura. I dati sulla messa a punto di un nuovo test in vitro per la diagnosi di DAC da associare al patch test sembrano incoraggianti.

e) Dermatosi professionali. Il D.Lgs 626/94, nel quadro dell'istituzione di un sistema di gestione organico della tutela della salute e della sicurezza dei lavoratori, prevede esplicitamente la necessità della individuazione e valutazione dei fattori di rischio presenti negli ambienti di lavoro e l'eliminazione o la riduzione dei rischi stessi in base alle conoscenze tecnologiche disponibili, privilegiando la riduzione alla fonte. Questo è possibile fornendo al lavoratore informazioni sulle corrette modalità di manipolazione ed uso delle sostanze allergizzanti e sulla necessità dell'uso di dispositivi individuali di prevenzione (D.P.I: guanti, maschere, ecc.). Scopi della ricerca sono stati quelli di: valutare il rischio allergologico relativo all'esposizione a sostanze chimiche presenti negli ambienti di lavoro dei parrucchieri attraverso lo studio di diversi ambienti e delle modalità di esposizione; individuare le caratteristiche delle manifestazioni cliniche osservate (localizzazione, morfologia, tempo di comparsa dall'inizio dell'attività lavorativa); analizzare le possibili sorgenti di sensibilizzazione; identificare gli allergeni che più frequentemente sono responsabili di dermatiti allergiche da contatto. L'attività delle parrucchiere comprende innanzitutto il lavaggio dei capelli con shampoo, la cui base lavante è costituito da tensioattivi (anionici, anfoteri, non ionici), talora sono presenti estratti vegetali (ortica, camomilla, ecc.), sono inoltre utilizzati rinforzanti per capelli, dopo shampoo e balsami. Le preparazioni più frequentemente impiegate per la cosiddetta "permanente" sono: l'ammoniotioglicolato, ed il glicerilmonotioglicolato. La colorazione dei capelli è ottenuta con l'impiego di tinture di vario tipo: vegetali (camomilla, henna), metalliche, organiche temporanee (coloranti azoici), organiche semipermanenti (o-nitro-p-fenilendiamina), organici permanenti (p-fenilendiamina, p-toluilendiamina, p-aminofenolo). Sono stati arruolati nello studio 38 parrucchieri di età compresa tra 18 e 59 anni (15 uomini e 44 donne). 16 erano apprendisti