



**I nostri modelli animali per la ricerca traslazionale sulla Glicogenosi 1:
analisi funzionali, monitoraggio delle complicanze a lungo termine e
possibili approcci terapeutici.**



ISTITUTO GIANNINA GASLINI
Istituto Pediatrico di Ricovero e Cura a carattere Scientifico



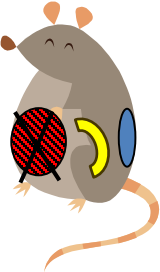
Laboratorio di Biologia Molecolare
Istituto Giannina Gaslini

Alessandra Eva Roberta Resaz
AIG Rimini 2019

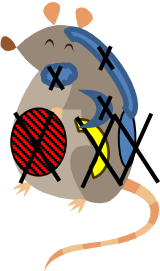


Abbiamo generato due modelli animali per la Glicogenosi 1

Glicogenosi 1a: topi che hanno la malattia solo nel fegato.



Glicogenosi 1b: topi che hanno tutte le caratteristiche della malattia nei pazienti ma in forma più leggera.



Modello di topo per la Glicogenosi 1b

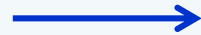
2015-2019

- Abbiamo sviluppato un modello di topo inducibile che riproduce la Glicogenosi 1b

Topo sano

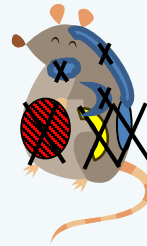


Nascita

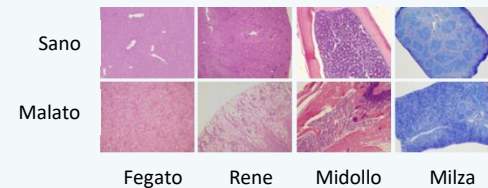


Trattamento
con Tamoxifen

Topo malato



2 mesi



- Abbiamo stabilito delle collaborazioni con laboratori italiani e americani per lo studio della Glicogenosi 1b utilizzando il nostro modello animale
- Gli studi sono rivolti al fegato, al rene, ai neutrofili e alle malattie autoimmuni, caratteristiche patologiche della glicogenosi 1b



Progetti in corso Glicogenosi 1b

COLLABORAZIONI

•Malattia epatica

J. Y. Chou, NIH, Bethesda, USA

- Lo studio prevede l'analisi delle differenze delle alterazioni del **fegato** tra questi animali (Glicogenosi 1b) e i topi malati di Glicogenosi 1a
- I risultati ottenuti potrebbero essere rilevanti in futuro per il trattamento delle diverse glicogenosi epatiche.

•Alterazioni funzionali dei neutrofili

D. Weinstein/Y. Lee, University of Connecticut School of Medicine, USA

- Lo studio prevede l'analisi approfondita della disfunzione dei **neutrofili** e lo sviluppo di possibili nuove terapie.



COLLABORAZIONI

•Malattia renale

F. Trepiccione/V. d'Acerno, Istituto di Ricerche Genetiche Gaetano Salvatore, Ariano Irpino.

- Lo studio delle caratteristiche della malattia **renale** nei topi.
- Trattamento dei nostri topi con un **farmaco** per valutarne l'efficacia nel prevenire il danno renale.

•Malattie autoimmuni

G. Matarese/F. Carbone, Istituto di Endocrinologia e Oncologia Sperimentale, CNR, Napoli.

- Meccanismi molecolari che determinano l'insorgere di **malattie autoimmuni** nella Glicogenosi 1b.

•Malattia infiammatoria intestinale

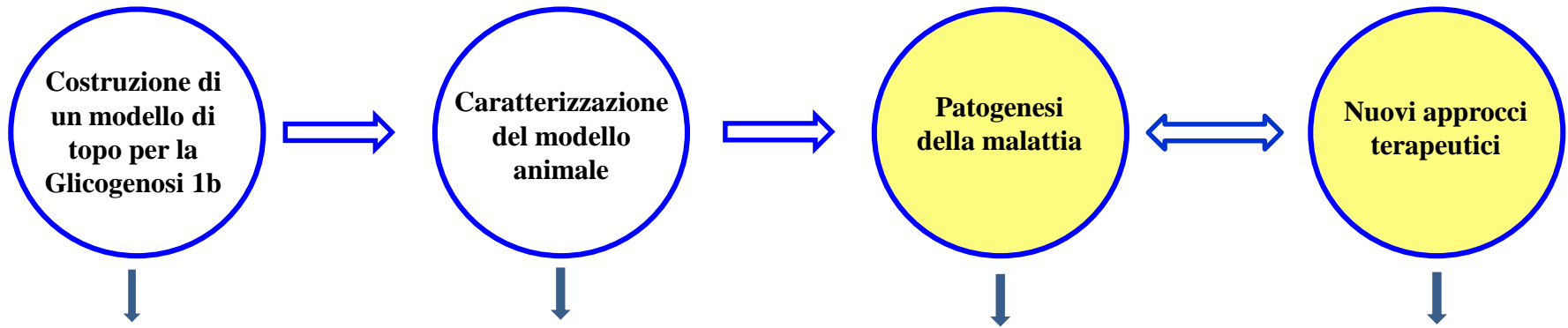
Mesis, D./Rossi, A./Parenti, G., Università Federico II, Napoli

Mastracci, L./Grillo, F., Anatomia Patologica, Ospedale S. Martino, Genova

- Lo studio della **malattia intestinale** con analisi istologiche, immunoistochimiche, molecolari e biochimiche



PROGETTI GLICOGENOSI 1b

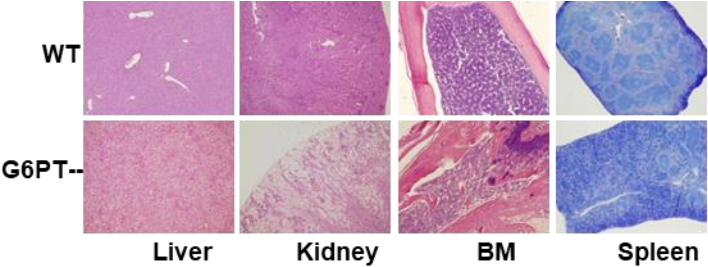


Completato

Completato
Manoscritto pubblicato
(Raggi F. et al. JIMD, 2018)

Studi in corso e futuri
Collaborazioni con

J. Chou	→	Fegato
D. Weinstein	→	Neutrofili
F. Trepiccione	→	Rene
G. Matarese	→	Malattie autoimmuni
D. Melis	→	Intestino



Collaboratori
F. Antonini, G. Del Zotto, Core Facility, IGG
A. Gamberucci, P. Marcolongo, Univ. Siena
F. Grillo, L. Mastracci. Anat. Patol., S. Martino

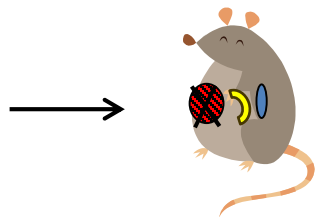


PROGETTI IN CORSO PER LA GLICOGENOSI 1a

1) ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ADENOMI DEL FEGATO

• Dove: **Modello animale**

• Come: Utilizzando **la risonanza magnetica (MRI)** con un mezzo di contrasto specifico per il fegato

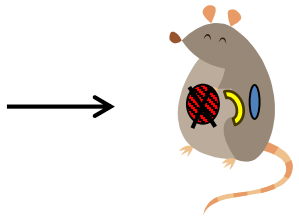


2) RICERCA DI **BIOMARCATORI** DEL FEGATO MALATO NELLA GLICOGENOSI 1a

I biomarcatori sono delle molecole, come p.e. **RNA** e **proteine**, presenti in un tessuto malato (fegato) in quantità diverse rispetto al tessuto sano.

• Dove: 1) **Modello animale**
2) **Pazienti**

• Come: Utilizzando il **tessuto** (fegato) (topi)
Utilizzando le **biopsie liquide** (topi e pazienti)

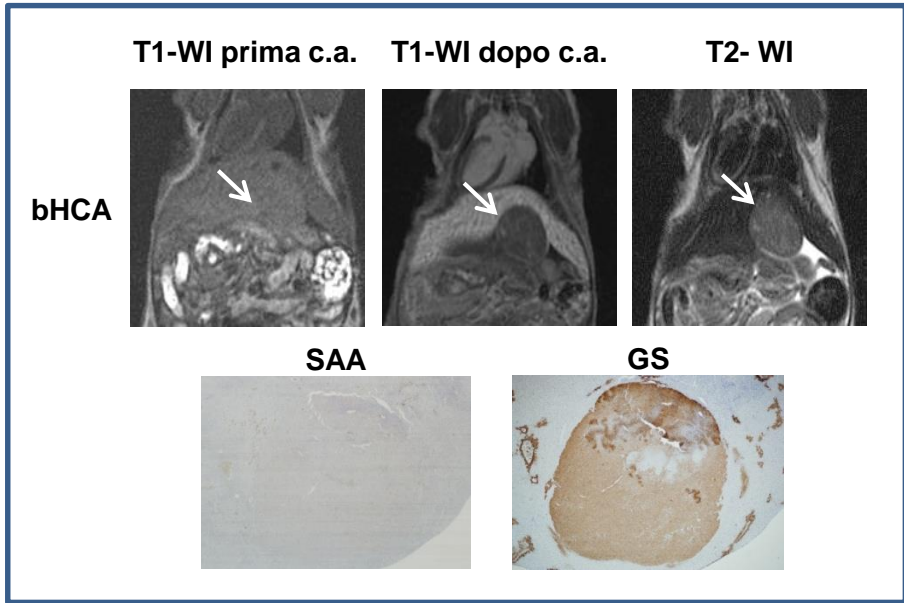
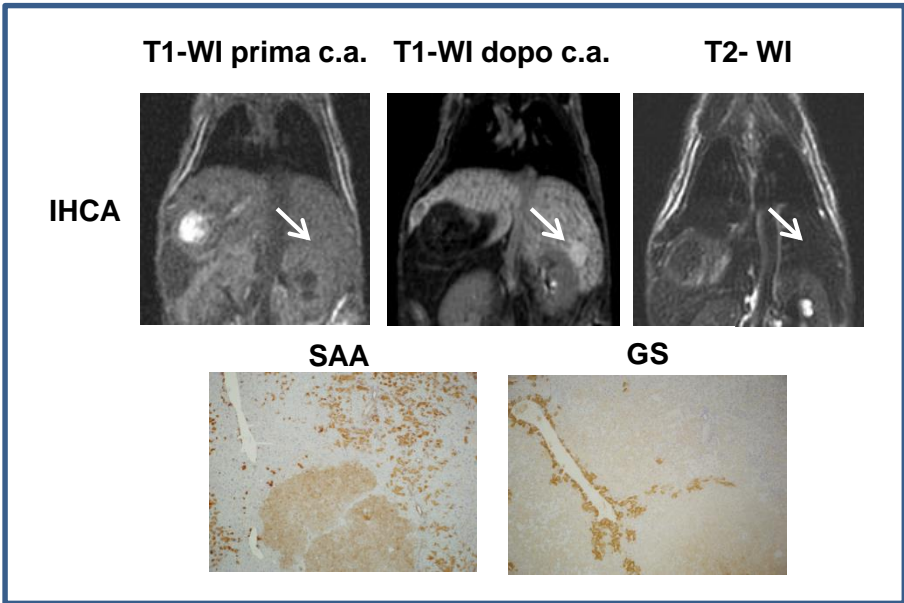


ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ADENOMI DEL FEGATO

Anno 2017-2018

Utilizzando un **agente di contrasto (c.a.)** specifico per il fegato abbiamo sviluppato un **protocollo** di Risonanza Magnetica (MRI) che permette di visualizzare **lesioni epatiche molto piccole** e di distinguere nei topi gli **adenomi a basso rischio** (infiammatori) da quelli **ad alto rischio** di trasformazione maligna (beta-catenina).

18 topi analizzati per un totale di 45 noduli

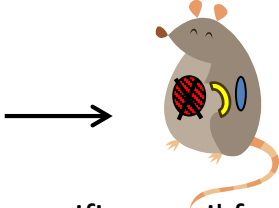




PROGETTI IN CORSO PER LA GLICOGENOSI 1a

1) ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ADENOMI DEL FEGATO

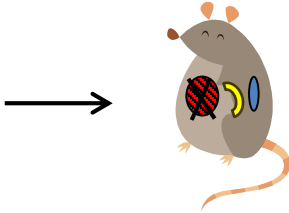
- Dove: **Modello animale**
- Come: Utilizzando la risonanza magnetica (MRI) con un mezzo di contrasto specifico per il fegato



2) RICERCA DI **BIOMARCATORI** DEL FEGATO MALATO NELLA GLICOGENOSI 1a

I biomarcatori sono delle molecole, come p.e. **RNA** e **proteine**, presenti in un tessuto malato (fegato) in quantità diverse rispetto al tessuto sano.

- Dove: 1) **Modello animale**
2) **Pazienti**
- Come: Utilizzando **il tessuto** (fegato) (topi)
Utilizzando le **biopsie liquide** (topi e pazienti)





Studio dell'espressione delle proteine nel fegato dei topi

Proteomica

2016-2017

2017-2018

ANIMALI ANALIZZATI		
Gruppo	Età (mesi)	Adenomi
1	1-3	-
2	4-6	-
3	7-9	-
4	10-12	-
5	13-15	-
6	16-18	-
7	15-18	+

Abbiamo determinato le differenze d'espressione delle **proteine nel fegato**:

- di topi malati rispetto ai topi sani.
- di topi con adenoma al fegato rispetto a topi senza adenoma

I risultati indicano che nel fegato esiste un **ambiente patologico favorevole allo sviluppo e alla progressione degli adenomi**.



RISULTATI

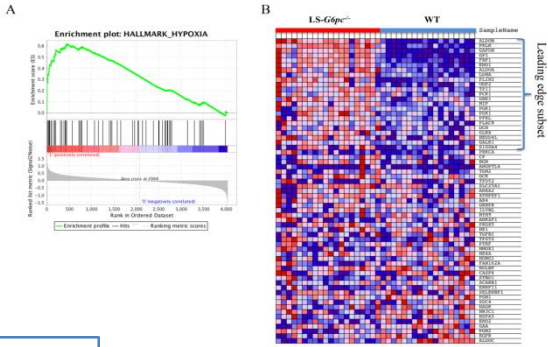
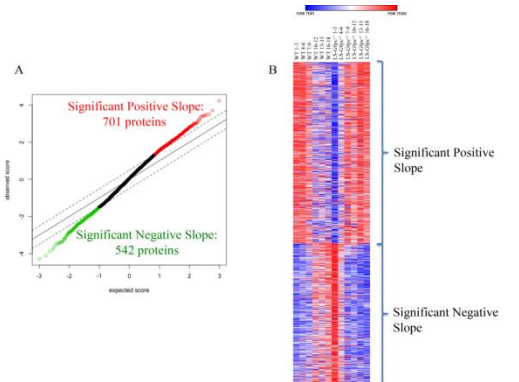
I topi malati rispetto ai topi sani esprimono delle proteine in modo **quantitativamente differente** rispetto ai topi sani.

Queste proteine sono coinvolte in processi biologici associati alla **malattia del fegato** e allo **sviluppo e alla progressione degli adenomi**.

Questa differenza si fa più evidente man mano che **i topi invecchiano e la malattia progredisce**.

I topi malati **con adenoma** hanno nel fegato una quantità di proteine coinvolte nell'infiammazione molto più alta di quella contenuta nei fegati dei topi malati **senza adenoma**.

PROCESSI BIOLOGICI PRINCIPALI	NUMERO DI PROTEINE
Steatosi epatica non alcolica (fegato grasso)	155
Mitocondri	60
Infiammazione	56
Risposta immunitaria	165
Metabolismo del glucosio e dei lipidi	55

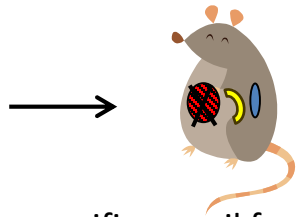




PROGETTI IN CORSO PER LA GLICOGENOSI 1a

1) ANALISI E CARATTERIZZAZIONE DEGLI ADENOMI DEL FEGATO

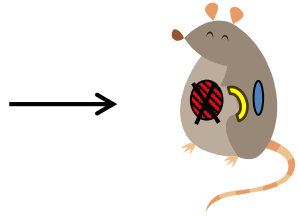
- **Dove:** **Modello animale**
- **Come:** Utilizzando la risonanza magnetica (MRI) con un mezzo di contrasto specifico per il fegato



2) RICERCA DI BIOMARCATORI DEL FEGATO MALATO NELLA GLICOGENOSI 1a

I biomarcatori sono delle molecole, come p.e. **RNA** e **proteine**, presenti in un tessuto malato (fegato) in quantità diverse rispetto al tessuto sano.

- **Dove:** 1) **Modello animale**
2) **Pazienti**
- **Come:** Utilizzando il **tessuto** (fegato) (topi)
Utilizzando le **biopsie liquide** (topi e pazienti)

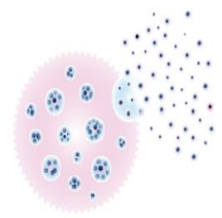




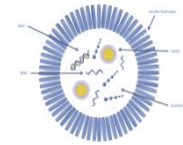
Cosa sono le biopsie liquide ?

La biopsia liquida consiste nel raccogliere sangue, urine, saliva, in generale liquidi biologici, e costituisce un'alternativa alla biopsia tradizionale che, invece, richiede il prelievo del tessuto malato.

Nelle biopsie liquide sono presenti gli **esosomi**, piccole vescicole rilasciate dalle cellule



Il contenuto degli **esosomi** riflette le caratteristiche delle cellule da cui vengono rilasciati e per questo motivo vengono chiamati tessuti surrogati



Si trovano nei liquidi biologici come sangue, saliva, urine etc...



Il vantaggio di utilizzare gli **esosomi** come fonte di biomarcatori è che possono essere prelevati in modo non invasivo e anche ripetutamente per caratterizzare la malattia o monitorare la sua progressione

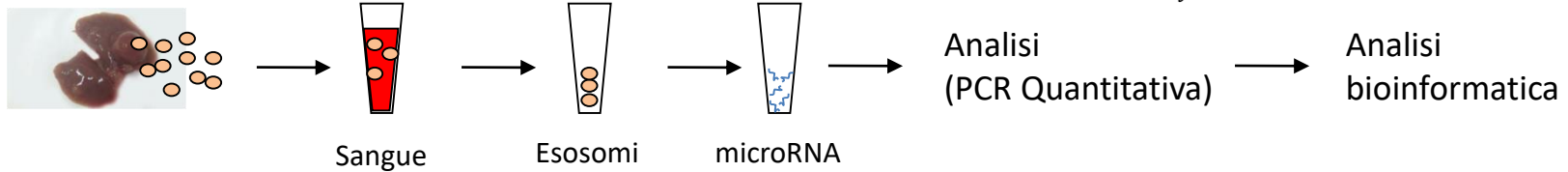
Valutazione dei biomarcatori **microRNA** presenti negli esosomi del sangue dei topi malati in confronto ai topi sani

I microRNA sono piccoli RNA che regolano in modo negativo l'espressione di geni specifici

I tipi di microRNA che si trovano negli esosomi varia a seconda dei tessuti da cui derivano e a seconda del tipo e dello stato di salute del tessuto stesso

2016-2017

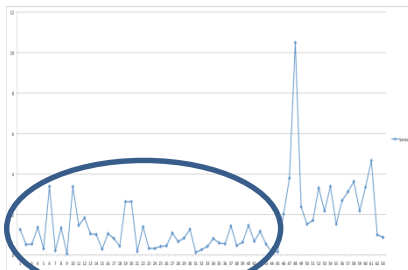
Purificazione degli esosomi dal sangue dei topi ed estrazione dei microRNA



2017-2018

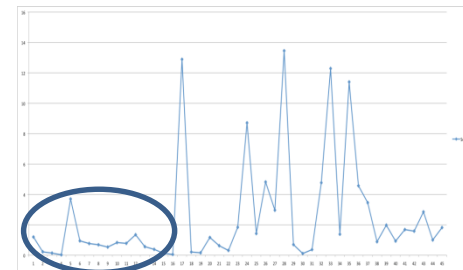
RISULTATI

miR-744



Topi malati vs topi sani

miR-145



Topi malati con adenoma vs topi malati senza adenoma

RISULTATI

miRNA	Topi malati vs topi sani	Topi malati con adenoma vs topi malati senza adenoma
139-3p	↑	
190b	↑	
380-5p	↑	
381-5p	↑	
434-5p	↑	
24	↓	
29a	↓	
145		↓
342		↓
409	↑	
486	↓	
744	↓	
192		↑
685		↓

miR-139-3p e **miR-409**, sono coinvolti nella formazione di **adenomi del fegato** e sono più abbondanti negli esosomi dei topi malati in confronto ai topi sani.

miR-29a e **miR-486**, sono coinvolti in alcune **malattie del fegato e nell'infiammazione** e sono meno abbondanti negli esosomi dei topi con glicogenosi in confronto ai topi sani.

miR-145 e **miR-342** sono coinvolti nella **formazione di adenomi** e sono meno abbondanti negli esosomi dei topi con adenoma rispetto ai topi malati ma senza adenoma

I miRNA esosomiali che abbiamo identificato:

- Rappresentano il contributo specifico del fegato associato allo sviluppo della malattia e degli adenomi epatici.
- Possono essere usati come biomarcatori prognostici/diagnostici
- Potrebbero permettere di predire anticipatamente l'insorgere di adenoma ed essere quindi usati per lo sviluppo di protocolli terapeutici che abbiano come bersaglio i micro RNA

Come passare dagli esperimenti sul modello animale ai pazienti?

Valutazione dei biomarcatori (**proteine**) presenti negli esosomi pazienti

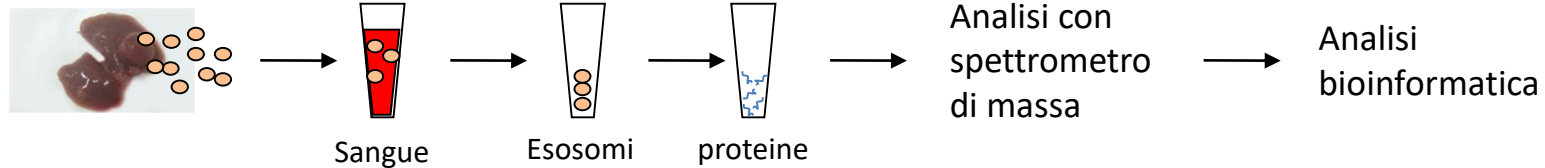
Non possiamo usare il tessuto (fegato) dei pazienti
Possiamo usare però le biopsie liquide (tessuto surrogato)

1) Purificazione degli esosomi dal sangue dei topi ed estrazione delle proteine



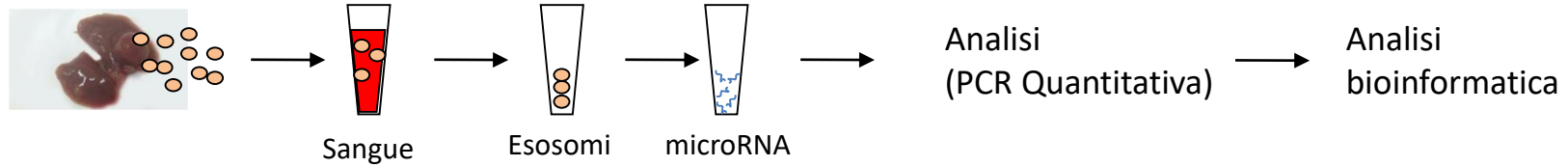
2) Purificazione degli esosomi dal sangue dei pazienti ed estrazione delle proteine

3) Confronto tra i risultati ottenuti nei topi con quelli dei pazienti



Valutazione dei biomarcatori (**microRNA**) presenti negli esosomi dei pazienti

- 1) Purificazione degli esosomi dal sangue dei pazienti ed estrazione dei microRNA
- 2) Confronto tra i risultati ottenuti nei topi con quelli dei pazienti



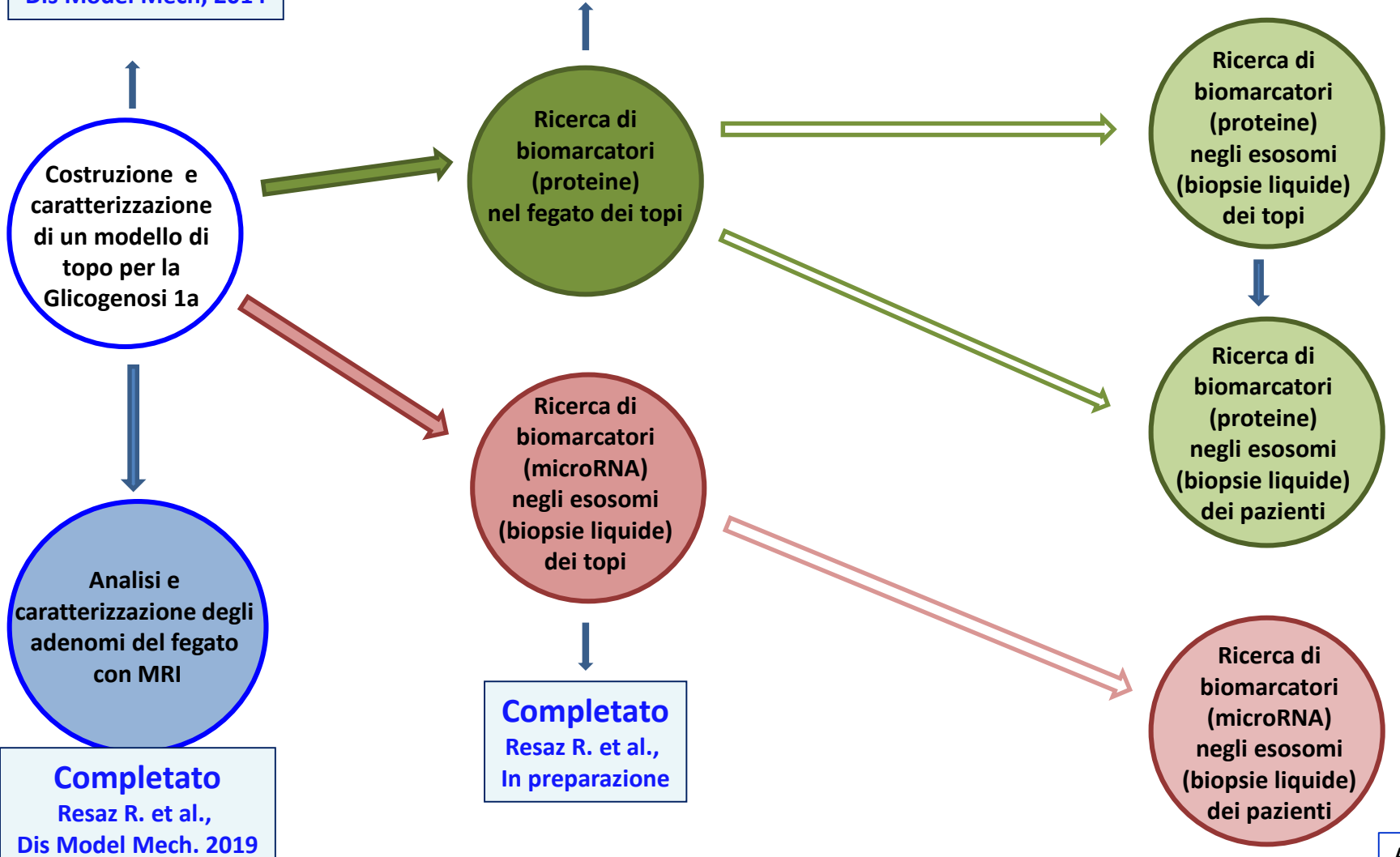


PROGETTI GLICOGENOSI 1a

Completato
Resaz et a.
Dis Model Mech, 2014

Completato
Cangelosi D. et al.,
J Proteome Res. In corso di pubblicazione

Studi in corso e futuri
Collaboratori
D. Weinstein/Melis/Paci/Sechi/Di Rocco → biomarcatori-microRNA
D. Melis/Rossi/Parenti /Petretto → biomarcatori-proteine





Possibili sviluppi di applicazioni pre-cliniche (nei topi)

microRNA : E' possibile trattare i topi con i microRNA identificati (mimics o antagonisti) per valutare il loro effetto preventivo/terapeutico

Proteine : Il riconoscimento di proteine con espressione alterata può facilitare l'individuazione di farmaci per analisi di trattamenti nei topi e valutazioni di validità terapeutica

Istituto G. Gaslini, Genova

- R. Resaz
- D. Segalerba
- M. Morini
- D. Cangelosi
- A. Eva
- L. Varesio

Istituto G. Gaslini, Genova

- A. Petretto
- M. Di Rocco

Università Federico II, Napoli

- D. Melis
- A. Rossi
- G. Parenti

Ospedale Policlinico San Martino, Genova

- F. Rosa
- L. Basso
- C. E. Neumaier

- F. Grillo
- L. Mastracci

Azienda Ospedaliero-Universitaria Santa Maria della Misericordia, Udine

- A. Sechi

Ospedale San Paolo, Milano

- S. Paci

University of Connecticut, USA

- D.A. Weinstein
- Y. Lee

NIH, Maryland, USA

- J.Y. Chou

BioGeM Ariano Irpino (Av)

- F. Trepiccione
- V. d'Acerno

Università di Torino

- S. Aime
- D.L. Longo

Università Federico II, Napoli

- G. Matarese
- F. Carbone

UN PALLONCINO PER SPERARE



**Associazione
Italiana
Glicogenosi**



ISTITUTO GIANNINA GASLINI
Istituto Pediatrico di Ricovero e Cura a carattere Scientifico



Ministero della Salute

