**C-01**

**APOPTOSI E CHEMIOTERAPIA**

**S. Avalle, C. Alpini, A. Papalia, V. Rizzo**
Dipartimento di Biochimica, Sez. Analisi Chimico Cliniche, IRCCS Policlinico S. Matteo, 27100 Pavia

*Scopo del lavoro* Cisplatino, etoposide, ciclofosfamide, citosina arabinoside sono agenti antitumorali che esplicano la loro citotossicità mediante induzione di apoptosi (morte cellulare programmata). Scopo dello studio è la valutazione dei livelli di apoptosi in cellule mononucleate di sangue periferico di pazienti oncologici.

*Materiali e Metodi* Lo studio comprende 9 pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin's trattati con citosina arabinoside (Ara-C) 3.0 mg/ $m^2$/12h x 2 e 6 pazienti affetti da mieloma multiplo trattati con desametazone 40mg/die x 4, ciclofosfamide 400 mg/$m^2$/die x 4, etoposide 40 mg/$m^2$/die x 4 e cisplatino 10 mg/$m^2$/die x 4 (D-CEP). Il gruppo di controllo (n=10, donatori sani) e tutti i pazienti ricevono 5ug/kg/die di granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) fino ad una mobilizzazione di progenitori emopoietici, CD34+, vicina a $4x10^6$/kg. L'evoluzione del processo apoptotico è caratterizzato dalla presenza sulla superficie esterna della membrana cellulare di fosfatidilserina, specificamente fagocitata dai macrofagi. La fosfatidilserina viene determinata, in presenza di fluoresceina, mediante coniugazione con Annessina V, fosfolipide Ca-dipendente. La successsiva incubazione con ioduro di propidio, permette di differenziare la cellula in apoptosi dalla cellula in necrosi. L'analisi della fluorescenza viene effettuata mediante microscopio a fluorescenza (Ex=450-500 mn, Em=515-565 nm, verde). *Risultati* La percentuale di cellule in apoptosi dopo mobilizzazione con D-CEP è significativamente elevata (133±38.7%) sia rispetto alle cellule in apoptosi dopo mobilizzazione con Ara-C (30.8±6.87%; p=0.041) sia rispetto alle cellule in apoptosi del gruppo di controllo (19±7.9%; p=0.032). I livelli di cellule in apoptosi dopo mobilizzazione con Ara-C non sono significativamente diversi dai livelli di cellule in apoptosi osservati nel gruppo di controllo.

*Discussione e Conclusione* I risultati ottenuti dimostrano che l'azione combinata di più agenti antitumorali costituenti il D-CEP consente maggior impatto nell'induzione e mediazione del processo apoptotico rispetto al singolo agente Ara-C

*Bibliografia* Fadeel B, Hassan Z, Hellstrom-Lindberg E, et al. (1999a). Cleavage of Bcl-2 is an early event in chemotherapy-induced apoptosis of human myeloid leukemia cells. *Leukemia,* 13, 719-728

**C-02**

**QUANTIFICAZIONE ASSOLUTA DI CELLULE LEUCEMICHE CON L'IMPIEGO DELLA *REAL TIME PCR* AD ELEVATA SENSIBILITÀ IN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA E LEUCEMIA PROMIELOCITICA ACUTA.**

E. Rimini, L. Simula, G. Maddau, L. Rubattu, P. Tolu*, A. Pirna, F. Mannu*, F. Turrini*, G.B. Cherchi.
Laboratorio di Analisi, Ospedale Civile SS.ma Annunziata, Sassari. Nurex Bioresearch, Sassari*

Alla base di numerose leucemie vi è una traslocazione cromosomica che determina una giustapposizione di due geni, che possono dare origine ad un nuovo gene di fusione. Questo gene viene trascritto in un mRNA chimerico che può essere individuato con l'uso della *Quantitative Real Time PCR.*

*Scopo del lavoro.* Valutare la malattia minima residua (MRD) in pazienti affetti da leucemia mieloide cronica e leucemia promielocitica acuta mediante nuove tecniche di *Quantitative Real Time PCR* che mostrano una sensibilità 2-3 ordini di grandezza superiore alle metodiche attualmente in uso e quantificazione assoluta del numero di cellule.

*Materiali e metodi.* La metodica Real Time PCR messa a punto utilizza delle sonde di ibridazione con doppia marcatura fluorescente. La quantificazione assoluta è stata ottenuta allestendo una curva standard con diluizioni seriali di cellule positive per la traslocazione BCR/ABL (linea cellulare MHG 01) e PML/RARA (linea cellulare NB4). La sensibilità della metodica è stata incrementata mediante un ciclo di pre-amplificazione che non interferisce con la successiva quantificazione

*Risultati.* Le metodiche di quantificazione con la Real Time PCR convenzionale hanno mostrato una sensibilità pari a 1000-10000 cellule/ml di sangue. Mediante l'utilizzo di una metodologia basata su un ciclo di pre-amplificazione è stata raggiunta una sensibilità di 1-10 cellule/ml di sangue. Il range dinamico è compreso tra 10 e 100.000 cellule/ml. La specificità della metodica risulta incrementata dall'utilizzo di una copia di primers esterni

*Discussione e conclusioni.* La metodica Real Time PCR eseguita secondo i protocolli convenzionali risulta relativamente poco sensibile per ricercare cellule leucemiche presenti nel sangue. La metodica utilizzata permette un incremento della sensibilità sino ai limiti di una cellula / ml di sangue. La quantificazione è stata eseguita in termini assoluti ed espressa in cellule leucemiche per ml di sangue. Ulteriori studi sono richiesti per valutare il significato clinico e prognostico della *Quantitative Real Time PCR* ad elevata sensibilità.

Bibliografia. 1. JJMV van Dongen et al.. Leukemia 1999; 13: 1901-1928 - 2. W.-J. Lee et al. Annals of Oncology 13: 781-788, 2002.

**C-03**

## EFFETTO DEL POLIMORFISMO 4G/5G SUI LIVELLI DI PAI-1 DOPO SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA E IN SOGGETTI DIABETICI DI TIPO 2

**R. Testa[a], A.R. Bonfigli[a], C. Sirolla[a], M. Marra[a], M. Boemi[a], S. Manfrini[a], D. Mari[b], I. Testa[c], E. Sacchi[d], C. Franceschi[a]**

[a]INRCA, Ancona, [b]IRCCS Ospedale Maggiore, Università di Milano [c]Istituto di Clinica Medica, Università de L'Aquila, [d]Ospedale L. Sacco, Dip. di Immunoematologia e Trasfusionale, Milano.

*Scopo del lavoro.* L'inibitore dell'attivatore del plasminogeno di tipo 1 (PAI-1) è un fattore indipendente di rischio cardiovascolare ed è aumentato nei pazienti con diabete di tipo 2. Il polimorfismo genetico del PAI-1 4G/5G è stato riportato essere coinvolto nell'incidenza di malattia cardiovascolare attraverso la regolazione dei livelli di PAI-1, ma questa relazione è ancora in discussione. Scopo dello studio è stato quello di verificare l'effetto del polimorfismo 4G/5G sull'abbassamento dei livelli del PAI-1 in soggetti diabetici di tipo 2 durante somministrazione di vitamina E.

*Materiali e Metodi.* Sono stati studiati 93 pazienti con diabete mellito di tipo 2 (61 uomini; 32 donne; età media±DS:62.8±4.2 anni) selezionati secondo i seguenti criteri: stretto range di età, terapia dietetica, buon compenso glicometabolico e trattati con 500 UI/die di vitamina E per 10 settimane. Il polimorfismo 4G/5G e il PAI-1 attività sono stati determinati al baseline, durante (5° e 10° settimana) e dopo (30° settimana) supplementazione con vitamina E.

*Risultati.* Nessuna differenza significativa di PAI-1 è stata trovata tra i tre genotipi al tempo zero. Nell'intero gruppo di soggetti sono state evidenziate diminuzioni significative di PAI-1 alla 5° e alla 10° settimana seguite da un ripristino dei valori basali al wash-out ($p<0.001$) I pazienti con genotipo 4G/4G e 4G/5G mostravano trend significativamente diversi rispetto a quelli con genotipo 5G/5G ($p<0.01$). In particolare si è evidenziata una diminuzione dei livelli del PAI-1 per i soggetti 4G/4G e 4G/5G solo a partire dalla 10° settimana, mentre per i soggetti 5G/5G la diminuzione del PAI-1 è stata osservata già a partire dalla 5° settimana ($p<0.01$).

*Discussione e Conclusioni.* La ritardata diminuzione trovata nei pazienti con almeno un allele 4G rispetto ai soggetti con genotipo 5G/5G evidenzia che la risposta del PAI-1 alla vitamina E è genotipo dipendente. Questi dati suggeriscono che l'aumentato rischio legato all'allele 4G potrebbe essere correlato alla diversa velocità di risposta agli stimoli più che all'entità della variazione stessa.

**C-04**

## INDIVIDUAZIONE GENOTIPI E MUTAZIONI PRECORE DI HBV CON METODO LiPA

**R.A. Leone, P. Minchella, S. Nisticò, G. I. Potente, D. Caruso, M. Camerino, A. Nicolazzo, C. Cosentino**

U.O. di Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

***Scopo del lavoro.*** Valutare in un gruppo di pazienti con Epatite B cronica, monitorati presso la nostra Unità Operativa, la distribuzione dei genotipi HBV ed individuare eventuali mutazioni nelle regioni genomiche precore/promoter precore, che possono selezionarsi durante l'eliminazione virale immunomediata spontanea o indotta dalla terapia. Sono stati finora definiti 7 genotipi HBV, indicati con lettera alfabetica da A a G, classificati in base alla individuazione di una divergenza nucleotidica maggiore dell'8% sull'intero genoma; tali genotipi virali hanno una prevalenza caratteristica per area geografica. L'importanza clinica della variabilità genomica di HBV, comunque peculiare per un virus a DNA, non è invece ancora ben chiara.

***Materiali e metodi.*** Abbiamo considerato n. 40 pazienti, 24 maschi e 16 femmine, età media 44 anni circa. Sono stati utilizzati i seguenti metodi: A) markers sierologici: Meia (Axsym, Abbott); B) HBV-DNA: PCR quantitativa (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche Diagnostics); C) Genotipo HBV: ibridazione inversa, dopo amplificazione del gene S, su strips di nitrocellulosa con specifiche sonde per la determinazione dei genotipi A-G (INNO-LiPA HBV Genotyping, Innogenetics); D) Mutanti precore/promoter precore: ibridazione inversa, dopo amplificazione della regione precore e promoter/precore, mediante sonde specifiche per identificare polimorfismi nel codone 28 della regione precore e nei nucleotidi 1762 e 1764 della regione promoter/precore (INNO-LiPA HBV PreCore, Innogenetics).

***Risultati.*** Per quanto riguarda il genotipo, determinato sui 40 pazienti, 37 sono risultati D, 1 A, 1 C ed 1 Indeterminato. Le mutazioni nella regione precore sono state ricercate in 20 pazienti, dei quali 18 presentavano HBeAb e solo 2 HBeAg; in questi 2 ultimi pazienti è stata rilevata presenza del ceppo virale selvaggio, ma in uno è stato anche trovato un mutante nel codone 28, quindi una popolazione virale mista.

***Discussione e Conclusioni.*** Dai risultati ottenuti si rileva una marcata presenza del genotipo D, mentre l'unico genotipo C è stato trovato in un paziente di origine asiatica, in accordo a quanto riportato negli studi sulla distribuzione per area geografica, da cui risulta che il genotipo D è quello prevalente nell'area mediterranea. Le mutazioni precore, rilevate frequentemente nel genotipo D, sono risultate tutte associate a persistenza virale nei pazienti HBeAb positivi. Un metodo rapido e semplice, come quello da noi utilizzato per la determinazione del genotipo e dei mutanti precore, può non solo permettere uno studio dell'epidemiologia, ma diventare anche un prezioso mezzo di approfondimento diagnostico.

**C-05**

**MUTAZIONI A1298C e C677T DI MTHFR MATERNO ASSOCIATE A PATOLOGIE DELLA GRAVIDANZA E INFLUENZA SUL PESO NEONATALE NORMALIZZATO. RISULTATI PRELIMINARI .**

**M. Rongioletti (1),G. Larciprete (2),S. Draghi, (2), N. Toni (2),G. Di Pierro (2),S. Di Gregorio (1),G.Barbati (2), MG Frigo (2), PA. Angelucci (2), M. Baldassini (1), E. Forastiere (1), E. Cirese (2), F. Ameglio (1).**
1) S.C.Lab. Patologia Clinica, Osp. S. Giovanni Calibita e 2) S.C. Ginecologia e Ostetricia, Osp. S. Giovanni Calibita, FBF/AFAR, Isola Tiberina 9, Roma.

*Scopo del lavoro*: Analizzare l'associazione delle due mutazioni MTHFR materne con alcune patologie della gravidanza e con il peso del neonato.

*Materiali e Metodi*. Sono entrate nel protocollo 44 pazienti gravide di cui 22 con differenti patologie (5 con emorragia, 11 con Pre-eclampsia, 1 con trombosi, 5 con HEELP e 22 pazienti normali). Da queste si sono avuti 31 neonati normali, 11 IUGR e 2 morti intrauterine. Su campioni di sangue materno sono state valutate le mutazioni MTHFR (metil-tetra-idrofolato reduttasi) mediante amplificazione genica con metodi commerciali (Nuclear Laser). Il peso dei neonati e' stato normalizzato dividendo per il numero di settimane di gravidanza. L'analisi statistica dei risultati e' stata ottenuta mediante tabelle di contingenza o test non parametrici sui livelli di peso normalizzato.

*Risultati*: I dati analizzati sulle mutazioni MTHFR relative alle 44 pazienti hanno mostrato una significativa associazione tra pazienti con patologie della gravidanza e soggetti omozigoti per una delle due mutazioni MTHFR ($p=0.01$). In particolare, si e' rilevato che anche le eterozigosi doppie per le due mutazioni sono significativamente correlate alle patologie analizzate. Al contrario, le singole mutazioni eterozigoti si distribuiscono indifferentemente tra pazienti con patologie e controlli. L'analisi della distribuzione del peso normalizzato dei neonati in relazione alle mutazioni (omozigoti singole, eterozigoti doppie, eterozigoti singole e assenti) ha rilevato una ridotta mediana del peso nelle doppie eterozigosi, sia su tutte le pazienti ($n=44$, $p=0.004$) che su quelle con neonati ponderalmente normali rispetto alle settimane di gravidanza ($p=0.01$).

*Discussione*: Le patologie della gravidanza, analizzate nel loro complesso sulle 44 pazienti, hanno mostrato una associazione significativa con le mutazioni MTHFR confermando l' importanza di rilevare tali mutazioni per stabilirne la eventuale omozigosi o la doppia eterozigosi. Inoltre, probabilmente a causa della influenza sul feto di tali mutazioni, si e' potuto rilevare che le pazienti con doppia eterozigosi presentavano un ridotto peso normalizzato nei neonati. I dati riscontrati dovranno essere confermati su un maggior numero di soggetti e corretti per possibili fattori neonatali, dipendenti dall'assetto genetico paterno.

**C-06**

**POLIMORFISMO DEL PROMOTER DEL GENE PS2 E MALATTIA DI ALZHEIMER IN UNA POPOLAZIONE ITALIANA.**

**R.G. Maletta[a], M. Di Natale[a], M. Perri[a], T. Kawarai[b], C. Tomaino[a], L. Bernardi[a], B. Naemias[c], S. Sorbi[c], P.St G.-Hyslop[b], E. Rogaeva[b], A.C.Bruni[a].**
a. Centro Regionale di Neurogenetica AS 6, Lamezia Terme (CZ), Italia.
b. Centre for Research in Neurodegenerative Diseases, Tanz Neuroscience Building, Universita di Toronto, Toronto, Ontario, Canada e Department of Medicine (Neurology), Universita Health Network, Toronto Western Hospital, Toronto, Ontario, Canada.
c. Dipartimento di Neurologia, Università di Firenze, Italia.

***Scopo del lavoro***. Recenti studi suggeriscono che un polimorfismo nella regione 5'-promoter del gene PS2 (delezione di adenosina al sito 24914) rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza di Malattia di Alzheimer (MA) nella popolazione Russa. Scopo del nostro lavoro e' analizzare questo polimorfismo in un campione di soggetti italiani e trovare un' eventuale associazione con MA ad esordio precoce o tardivo.

***Materiali e Metodi***. E' stato effettuato uno studio caso-controllo utilizzando 200 soggetti affetti da MA sporadica (100 ad esordio precoce, eta' <65 anni e 100 ad esordio tardivo, eta' >65 anni) e 160 soggetti normali, comparati per eta', sesso e provenienza geografica.
La regione 5'-promoter del gene PS2 e'stata amplificata in tutti i campioni, e i prodotti di PCR digeriti con protocollo di RFLP utilizzando l'enzima DdeI. E' stato analizzato, inoltre, il genotipo delle ApoE (kit ApoE Diatech). La frequenza allelica e genotipica fra malati e controlli e' stata statisticamente valutata mediante test chi quadrato.

***Risultati***. La frequenza genotipica per PS2 e' risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg in entrambi i gruppi (malati e controlli). I nostri risultati non hanno evidenziato alcuna associazione allelica ($p>0.38$) o genotipica ($p>0.5$). La stratificazione dei dati in gruppi positivi o negativi per APOE ε4 non ha mostrato alcuna evidente associazione ($p>0.1$). E' stata individuata, invece, una sovraespressione dell'allele ε4 nei soggetti malati ($p< 0.005$) a conferma dei dati della letteratura internazionale.

***Discussione e Conclusioni***. Lo studio corrente non supporta l'ipotesi che il polimorfismo nel gene PS2 costituisca un fattore di rischio per la forma sporadica (precoce o tardiva) della MA, mentre sembra che altri fattori di rischio possano essere chiamati in causa nello sviluppo della MA nella popolazione italiana.

**C-07**

## PRIMA EVIDENZA DI ASSOCIAZIONE FRA ISOFORME A BASSO PESO MOLECOLARE DI APOLIPOPROTEINE(a) E DEMENZA FRONTOTEMPORALE

R. Maletta[b], E. Emanuele[a], E. Peros[a], A. D'Angelo[a], L. Montagna[a], M. Carabela[a], M.N Piccinni[a], C. Tomaino[b], L. Bernardi[b], A C.Bruni[b] and D. Geroldi[a]
a Dipartimento di Medicina Interna e Terapia medica Universita' di Pavia, Italia
b Centro Regionale di Neurogenetica, AS6, Lamezia Terme (CZ), Italia.

***Scopo del lavoro:*** Precedenti studi sul ruolo delle apolipoproteine E (ApoE) nella demenza frontotemporale (DFT) hanno prodotto risultati discordanti, mentre non e' mai stato preso in considerazione il ruolo delle apolipoproteine a [Lp(a)] come fattore di rischio per l'insorgenza e la progressione di questa patologia. Le Lp(a) infatti presentano caratteristiche simili alle ApoE e il loro ruolo nel SNC non e' ancora chiaro.
Nel nostro lavoro abbiamo studiato le possibili differenze nella distribuzione delle isoforme di Lp(a) in pazienti con DFT comparati con soggetti di controllo.
***Materiali e Metodi:*** sono stati reclutati 39 pazienti affetti da DFT (20 casi sporadici e 19 familiari, (eta' media 71.89 ± 8.22 anni) diagnosticati secondo i criteri di Lund Manchester e 60 controlli (eta' media 72.11 ± 8.93 anni). In tutti i soggetti e' stata determinata la concentrazione delle Lp(a) con metodo sandwich-ELISA utilizzando il kit MacraLp(a) (SDI, USA). Per determinare le isoforme apo(a) e' stato utilizzato un immunoblotting a doppio anticorpo. A causa dell'alto grado di polimorfismo delle apo(a) abbiamo diviso le isoforme in due sottogruppi, in accordo con un cut-off, precedentemente identificato, basato sul numero di ripetizioni Kringle-IV (K-IV). Per l'analisi statistica i livelli nel plasma di Lpa sono stati confrontati con test Mann-Withney U e le frequenze delle isoforme Apoa con test chi quadrato.
***Risultati:*** Utilizzando il cut-off precedentemente identificato, per dividere le isoforme apo(a) a basso peso da quelle ad alto peso molecolare, abbiamo trovato una prevalenza (56.4%) di isoforme apo(a) a basso peso molecolare nei pazienti con DFT. Al contrario fra i controlli sono risultate prevalenti (68.3%) le isoforme apo(a) ad alto peso molecolare.La differenza fra i due gruppi e' statisticamente significativa (p=0.0146).
***Discussione e Conclusioni:*** I livelli di Lp(a) possono variare con trattamenti medici, malattie quali epatopatia, disturbi renali. Tuttavia le isoforme apo(a) non sono influenzate da fattori ambientali. L'associazione statisticamente significativa di apo(a) a basso peso molecolare con la DFT e' interessante, suggerendo che questo parametro possa essere considerato un fattore di rischio. Studi ulteriori su piu' ampie casistiche sono tuttavia indispensabili.

**C-08**

## IL POLIMORFISMO 4G/5G INFLUENZA LA RELAZIONE TRA ETA' E LIVELLI PLASMATICI DI PAI-1

**A.R. Bonfigli[a], C. Sirolla[a], S. Cenerelli[a], M. Marra[a], M. Boemi[a], D. Fumelli[a], D. Mari[b], I. Testa[c], E. Sacchi[d], I. Maccaroni[e], R. Testa[a]**
[a]INRCA, Ancona; [b]IRCCS Ospedale Maggiore, Università di Milano; [c]Istituto di Clinica Medica, Università de L'Aquila; [d]Ospedale L. Sacco, Dip. di Immunoematologia e Trasfusionale, Milano; [e]Patologia Clinica, Ospedale di Recanati.

*Scopo del lavoro.* Aumentati livelli di PAI-1 sono riportati essere un importante fattore di rischio aterosclerotico. Tali livelli sono stati correlati soprattutto a fattori legati all'insulino resistenza e al suo polimorfismo 4G/5G. Tuttavia l'influenza dell'età sui livelli di PAI-1 non è ancora del tutto chiara. Scopo del nostro studio è quello di verificare se, indipendentemente da altri fattori, esiste una relazione tra PAI-1 ed età nei tre genotipi 4G/5G.
*Materiali e metodi.* Sono stati studiati 238 soggetti con un ampio range di età (da 20 a 83 anni, 84 maschi e 154 femmine). In tali pazienti sono stati determinati i livelli di PAI-1 antigene, l'insulino sensibilità tramite l'indice K del test di tolleranza all'insulina ($K_{ITT}$) e il genotipo 4G/5G.
*Risultati.* Dividendo i soggetti per classi di età, i livelli medi di PAI-1 aumentano all'aumentare dell'età ($p$ 0.026). Differenze statisticamente significative sono state evidenziate tra le classi di età anche per glicemia ($p$<0.001), fruttosamine ($p$=0.002), HbA1c ($p$<0.001), $K_{ITT}$ ($p$<0.001), colesterolo ($p$<0.001) e HDL ($p$=0.003). Dall'esame del polimorfismo 4G/5G è risultato che 57 soggetti (23.9%) presentavano il genotipo 4G/4G, 113 (47.5%) il 4G/5G e 68 (28.6%) il 5G/5G. Nessuna differenza significativa di PAI-1 e degli altri parametri metabolici valutati è stata trovata tra i tre genotipi. L'analisi multivariata ha dimostrato che i livelli di PAI-1 mostrano una correlazione statisticamente significativa con l'età sia nell'intero gruppo di soggetti ($R^2$%=17.1, partial $r$=0.164, partial $p$=0.028) che in quelli 4G/4G ($R^2$%=66.8, partial $r$=0.406, partial $p$=0.023) e 4G/5G ($R^2$%=27.3, partial $r$=0.330, partial $p$=0.003), mentre nessuna relazione è presente nel gruppo 5G/5G dopo correzione per sesso, BMI, diabete mellito, ipertensione, trigliceridi, $K_{ITT}$, colesterolo, HDL e glicemia.
*Discussione e conclusioni.* Il PAI-1 aumenta con l'età in maniera significativa nei soggetti con genotipo 4G/4G e 4G/5G. Tali risultati suggeriscono l'ipotesi che con l'aumentare dell'età aumenti il rischio cardiovascolare legato all'allele 4G.

**C-09**

## METODO RAPIDO PER LA RICERCA DI MUTAZIONI NEL GENE HBV POLIMERASI ASSOCIATE A RESISTENZA ALLA LAMIVUDINA

**P. Minchella, R.A. Leone, S. Nisticò, G. I. Potente, D. Caruso, M. Camerino, A. Nicolazzo, C. Cosentino**

U.O. di Microbiologia e Virologia, Azienda Sanitaria N. 6, Via Perugini, 88046 Lamezia Terme (CZ)

***Scopo del lavoro.*** Valutare l'utilizzazione di un metodo rapido per la ricerca, nel gene che codifica la polimerasi HBV, di mutazioni associate a resistenza alla terapia con lamivudina. I mutanti HBV nella regione polimerasi possono selezionarsi durante il trattamento a lungo termine con analoghi nucleosidici come la lamivudina e sfuggire le strategie antivirali, con conseguente persistenza di viremia e cronicizzazione dell'infezione.

***Materiali e metodi.*** Abbiamo considerato n. 20 pazienti con Epatite B cronica monitorati presso la nostra Unità Operativa. 10 maschi e 10 femmine, età media circa 43 anni, 16 dei quali in trattamento con lamivudina da più di sei mesi, tutti con carica virale persistentemente elevata. Sono stati utilizzati i seguenti metodi: A) HBV-DNA: PCR quantitativa (Cobas Amplicor HBV Monitor, Roche Diagnostics); B) Mutanti polimerasi: ibridazione inversa su strips di nitrocellulosa (LiPA), dopo amplificazione del domain B e C della regione HBV polimerasi, con sonde specifiche che rivelano mutazioni di resistenza genotipica nei codoni 528, 552 e 555 (INNO-LiPA HBV DR, Innogenetics).

***Risultati.*** Sono state individuate mutazioni soltanto in 2 dei 16 pazienti in terapia con lamivudina, in particolare sono state rilevate popolazioni miste di ceppi selvaggio e mutanti: a) in un paziente mutanti M552V/M552I e b) nell'altro mutanti L528M/M552I. Entrambi i pazienti presentavano alta carica di HBV-DNA, circa 8 milioni di copie/ml, nonostante il lungo trattamento farmacologico.

***Discussione e Conclusioni.*** Un metodo rapido come il LiPA, che si è dimostrato di semplice utilizzo per la determinazione di mutanti nella regione HBV polimerasi, può essere molto utile nel monitoraggio dei pazienti in terapia farmacologica con analoghi nucleosidici: tale metodo ha inoltre il vantaggio di mettere in evidenza la presenza di popolazioni virali miste, dando anche un'indicazione semiquantitativa. La precoce determinazione di mutazioni associate a resistenza farmacologica è di grande interesse clinico, soprattutto con l'introduzione nel prossimo futuro di nuovi farmaci alternativi alla lamivudina. L'uso di un metodo rapido per la rivelazione di queste mutazioni anche in laboratori che ancora non dispongono di strumento per analisi di sequenza, potrà dare utili e soprattutto tempestive indicazioni sul regime terapeutico ottimale, in funzione dello stato virologico del paziente.

**C-10**

## IMPIEGO DELLA PFGE NELLA SORVEGLIANZA DI I.O. CAUSATE DA P. aeruginosa MULTIRESISTENTI

Labonia M. Li Bergoli M. Casparrini G.

Dip. di Patologia Clinica - Sett.Microbiologico - IRCCS "Casa Sollievo della Sofferenza" S.Giovanni Rotondo (FG)

**Scopo del lavoro**

I soli metodi fenotipici sono, oramai, insufficienti a condurre indagini epidemiologiche. La sorveglianza e la diffusione di organismi multiresistenti richiedono l'impiego di tecniche molecolari in grado di distinguere i microrganismi a livello genetico.Le tecniche che consentono la tipizzazione genica sono: 1) la PFGE (pulsed field gel elettrophoresis) consistente in una digestione del DNA con enzimi di restrizione seguita da elettroforesi in campo pulsato e consente di comparare i diversi pattern: 2) la RAPD (random amplified polymorphic DNA); 3) la ribotipizzazione; 4) la ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis); 5) la REP-PCR. Attualmente, la PFGE è considerata il metodo di riferimento per le indagini epidemiologiche molecolari, però è molto indaginosa, richiede alcuni giorni di lavoro (4 -5) e apparecchiature che normalmente non sono presenti nei laboratori ospedalieri.Nel nostro ospedale è stata iniziata un'indagine per differenziare i ceppi di PA (Pseudomonas aeruginosa) multiresistenti, imipenem compreso, mediante PFGE.

**Materiali e metodi**

I ceppi finora tipizzati sono 20, isolati nel mese di marzo e aprile, da materiali respiratori di pazienti ricoverati nel reparto di Rianimazione.La sensibilità degli isolati è stata eseguita con sistema automatico (VITEK2) e confermata con E-test. I ceppi sono stati sottoposti a tipizzazione genica mediante PFGE, utilizzando l'enzima di restrizione Spe I. l'interpretazione dei risultati è stata eseguita secondo i criteri di Tenover (1995) che permettono un'analisi corretta delle dimensioni e del numero delle bande ottenute e la suddivisione a scopo epidemiologico degli isolati.

**Risultati e Conclusioni**

Dall'esame preliminare risulta che le infezioni di PA sono spesso associate a contemporanea colonizzazione con genotipi multipli (potrebbe essere un singolo ceppo che subisce variazioni).Gli studi sono in corso e, il nostro obiettivo è cercare di capire se un singolo genotipo batterico da luogo ad una colonizzazione cronica oppure se un singolo paziente è colonizzato da genotipi multipli. Non si può, infatti, escludere una colonizzazione crociata fra pz o una colonizzazione ambientale nello stesso pz che può portare alla presenza di più varianti clonali della stessa specie batterica.La PFGE consente di stabilire la presenza, in un reparto, di un ceppo endemico o epidemico ed investigare sulle vie di trasmissione. Permette di programmare in maniera mirata un sistema attivo di sorveglianza e di intervento. Inoltre la eventuale persistenza nel tempo di tali ceppi consente di valutare l'efficacia delle misure di controllo messe in atto per limitarne la diffusione.

**C-11**

## MODIFICAZIONI CELLULARI E MOLECOLARI NEL TRATTAMENTO CON CISPLATINO E/O RADIAZIONI IN LINEE CELLULARI MURINE

**Ungari S.; Arnolfo E.; Comino A°.; Crook T.**; Fruttero A.°; Gasco M.*; Lo Nigro C.; Russi E.G.°°;Taricco E.; Merlano M.*.**
Laboratorio di Biologia Molecolare, ASO S.Croce e Carle,Cuneo; ° S.C. Anatomia Patologica, ASO S.Croce e Carle,Cuneo; * S.C.Oncologia, ASO S.Croce e Carle,Cuneo;°° S.C. Radioterapia, ASO S.Croce e Carle,Cuneo
** Ludwig Institute for Cancer Research, London, UK.

*Scopo del lavoro.* Analizzare le basi molecolari ed i meccanismi cellulari di interazione tra radio e chemioterapia nei tumori in seguito al trattamento con cisplatino e/o radiazioni.

*Materiali e Metodi.* Gli effetti del trattamento sono stati analizzati mediante test di sopravvivenza cellulare, test clonogenici, analisi del ciclo cellulare e dell' apoptosi. Abbiamo utilizzato due differenti linee cellulari murine, la linea F9 di teratocarcinoma e la linea MG1361 di adenocarcinoma mammario. Le cellule sono state coltivate in mezzo di coltura dopo essere state seminate alla densita' di $1X10^6$ e trattate con cisplatino 1 microg./ml per 1 ora a 37°C e/o radiazioni alla dose di 2Gy/die per 5 giorni. Le valutazioni sono state effettuate a 24,48,72,96,120 ore dopo il trattamento. La sopravvivenza cellulare è stata analizzata mediante il dye exclusion assay, mentre la formazione di colonie è stata valutata mediante il clonogenic assay. La distribuzione delle cellule nelle fasi del ciclo è stata determinata attraverso l'analisi citofluorimetrica biparametrica basata sull'incorporazione di BrdUrd e il contenuto di DNA con P.I; l'apoptosi è stata analizzata in citofluorimetria con anticorpi anti-annessina V-Fitc e mediante la visualizzazione dei ladders nucleosomici in gel elettroforesi. Abbiamo anche iniziato una analisi molecolare per definire i livelli di p53 e le sue forme fosforilate indotte da cisplatino e/o radiazioni

*Risultati e Discussione.* Sia il cisplatino che le radiazioni inducono morte cellulare. La sopravvivenza è più bassa quando le cellule sono esposte al trattamento combinato (PSC 40% versus 60%). Il numero di colonie è ridotto dopo entrambi i trattamenti; l'associazione induce una inibizione dipendente dalle modalità di somministrazione dei due agenti. Le radiazioni da sole inducono accumulo in fase G2M; effetto analogo ma più evidente si osserva con cisplatino con qualche diffferenza tra le due linee cellulari. L'effetto più evidente dell'associazione è un calo della frazione S incorporante. I ladders nucleosomici aumentano ai diversi intervalli di tempo. Le cellule irradiate mostrano un modesto incremento dei livelli di p53, mentre il cisplatino induce un incremento maggiore della proteina p53. L'analisi tramite array del gene p53 ha identificato alcuni geni target indotti dall'apoptosi sovraespressi nelle cellule F9 .

**C-12**

## IDENTIFICAZIONE DEI PARTNERS MOLECOLARI DI SGK

**M. Menniti, R.Iuliano, R. Boito, M. Corea, I. Le Pera, R. Amato, N. Perrotti**
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica "G. Salvatore", Università Magna Græcia di Catanzaro

*Scopo del lavoro.* Sgk (Serum Glucocorticoid Kinase) è coinvolta nella regolazione del trasporto tubulare del sodio indotto da mineralcorticoidi, insulina e vasopressina. Essa regola gli effetti antiapoptotici degli steroidi ed è necessaria per i processi della memorizzazione spaziale. Questi diversi effetti sono presumibilmente realizzati attraverso l'interazione con partners molecolari tessuto specifici. Il nostro progetto di ricerca prevede l'identificazione e caratterizzazione di nuove interazioni molecolari mediante la tecnica del doppio ibrido in lievito.

*Materiali e metodi.* Il gene che codifica per Sgk "wild type" è stato clonato in un vettore (pBRIDGE) contenente sequenze codificanti per un dominio che si lega al DNA, in corrispondenza di elementi regolatori di opportuni geni "reporters". Il costrutto si esprime in *S. cerevisiae* ed il lievito, così trasformato, è stato usato per esperimenti di "mating " con lieviti trasformati da vettori contenenti sequenze di DNA codificanti per il dominio di attivazione (pACT2), opportunamente fuse con cDNA tratto da una "library" di rene umano. L'interazione fra "preda" ed "esca", è stata individuata grazie all'espressione di geni reporters e successiva selezione ed identificazione di quei lieviti nei quali Sgk ha interagito con proteine espresse dalla "library".

*Risultati.* In precedenza, dal nostro gruppo è stata dimostrata l'interazione specifica fra Sgk e fosfomannomutasi di tipo 2 (pmm2). Si tratta di un enzima che catalizza la reazione di isomerizzazione del mannosio-1-fosfato a mannosio-6-fosfato, tappa limitante nella mannosilazione delle glicoproteine. Sulla base di questi risultati, cellule renali COS7 sono state cotrasfettate con Sgk-Myc tagged e pMM2-Ha tagged. Mediante microscopia confocale, utilizzando anticorpi diretti contro l'epitopo Myc di Sgk e contro l'epitopo Ha di pMM2, abbiamo dimostrato la co-localizzazione di entrambi gli enzimi nella membrana plasmatica.

*Discussione.* Un deficit di pMM2 è responsabile della sindrome di Jaeken, malattia autosomica recessiva caratterizzata da un difetto nella glicosilazione delle proteine, encefalopatia, ritardo psicomotorio, neuropatia periferica ed ipoplasia cerebellare. La glicosilazione delle proteine è una tappa necessaria per l'espressione delle proteine di membrana ed ha un ruolo centrale nei processi di riconoscimento cellulare, adesione e memorizzazione. I nostri risultati suggeriscono un ruolo di Sgk e degli ormoni che ne modulano l'attività, nella regolazione di questi processi.

**C-13**

## SINDROMI MIELODISPLASTICHE:CARATTERIZZAZIONE CON TECNICHE DI CITOGENETICA MOLECOLARE E CITOFLUORIMETRIA

**O. Privitera[a], S. Stioui [a], R. Chianese[b], B. Rota[a], D. Noto[a], F. Malvestiti[a], M. Lotzniker[a]**
[a] Laboratori Analisi A.O. Legnano (MI) – Sezione di Citogenetica
[b] Centro Immuno Trasfusionale A.O. Legnano (MI)

*Scopo del lavoro.* Le sindromi mielodisplastiche (MDS) sono disordini clonali della cellula staminale emopoietica caratterizzate da emopoiesi inefficace e citopenia periferica a carico di una o più linee cellulari. Scopo del lavoro è approfondire con metodiche di citogenetica molecolare ed immunofenotipizzazione 50 casi di MDS per aggiungere informazioni importanti a scopo prognostico e terapeutico.

*Materiali e metodi* Sono stati analizzati 50 campioni di midollo osseo con indicazione di MDS o sospetta MDS. In tutti i casi è stata eseguito il cariotipo standard. Con tecniche di citogenetica molecolare (FISH) è stata eseguita la ricerca della delezione del gene EGR1 (5q31-fattore prognostico favorevole) su tutti i campioni, della monosomia/delezione del cromosoma 7 (7q31-fattore prognostico sfavorevole) su 11 pazienti candidati al trapianto e della trisomia del cromosoma 8 (fattore prognostico intermedio) sugli 8 campioni analizzati con tecnica citofluorimetrica con quadro compatibile con MDS e negativi per la delezione di EGR1.

*Risultati.* Nel 34% dei casi analizzati con la citogenetica classica sono state riscontrate anomalie cromosomiche caratteristiche delle MDS. La FISH ha permesso di identificare un caso con la delezione del cromosoma 5 ed un caso in cui è stato caratterizzato un clone monosomico per il cromosoma 5 non evidenziati con la citogenetica classica. La monosomia del cromosoma 7 non è stata osservata in nessuno dei casi indagati per questa anomalia. Gli 8 casi con caratterizzazione immunofenotipica compatibile con MDS sono risultati negativi all'indagine FISH per la trisomia del cromosoma 8. Tra questi un caso è risultato particolarmente interessante per la presenza di un quadro immunofenotipico assimilabile ad una LAM-M1 con espressione di CD7. Questo dato, contrastante con il risultato della citogenetica classica (del(5)(q31)) è invece in accordo col dato ricavato dall'approfondimeneto FISH che ha evidenziato la presenza di un clone monosomico per il cromosoma 5 (prognosi sfavorevole).

*Discussione e Conclusioni.* I risultati ottenuti suggeriscono di eseguire l'approfondimento molecolare esclusivamente sui casi che pervengono all'analisi con indicazione certa di MDS che non dovrebbe prescindere dalla caratterizzazione immunofenotipica perché questa può guidare la scelta della sonda da impiegare nella FISH. L'uso sincrono delle metodiche permette di definire un profilo prognostico più accurato sebbene il metodo citofluorimetrico per le MDS non sia ancora standardizzato.

**C-14**

## MODULAZIONE ETA'-SPECIFICA DEI FATTORI GENETICI DI RISCHIO

**S. Garasto[a,b], M. Berardelli[a,b], V. Mari[a], E. Feraco[a], G. De Benedictis[b]**
[a]INRCA, Cosenza; [b]Dip. Biologia Cellulare, Università della Calabria, Rende (CS)

*Scopo del lavoro.* L'analisi della variazione età-correlata del pool genotipico relativo al polimorfismo 3'VNTR-APOB (alleli S [<35 repeats], M [35-37 repeats], L [>37 repeats]) ha mostrato che la frequenza del genotipo omozigote SS declina, con una traiettoria di tipo convesso, nel segmento di popolazione ultra-ottantenne, suggerendo che gli alleli S agiscano con effetti pleiotropici età-specifici (1). Scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare l'effetto medio degli alleli S, M, L ($\alpha_S$; $\alpha_M$; $\alpha_L$) sui principali parametri lipidemici, al fine di fornire una interpretazione funzionale del fenomeno osservato.

*Materiali e Metodi.* La concentrazione sierica di colesterolo totale (TC), HDL-colesterolo (HDL-C), Trigliceridi (TG), colesterolo LDL (LDL-C), calcolato mediante (2), era misurata in un campione di 489 soggetti costituito da 409 soggetti (169 maschi e 240 femmine) privi di patologie clinicamente manifeste, e 80 soggetti maschi con patologia cardiovascolare (40 con alto LDL-C, pazienti CDL; 40 con basso HDL-C, pazienti CDH). L'intero campione è stato quindi tipizzato per il polimorfismo 3'VNTR-APOB (1). L'effetto allelico medio $\alpha$ sui parametri lipidemici era calcolato mediante (3).

*Risultati.* Gli alleli S abbassano il valore medio di LDL-C ($\alpha_S$ = -4.42 mg/dL, [-9.23; -0.10] mg/dL i.c. al 95%) nonché di TC, mentre gli alleli M ed L non hanno significativi effetti sul fenotipo lipidemico. In accordo con questo risultato, gli alleli S sono risultati protettivi nei confronti della patologia CDL ( O.R. – 0.55, [0.26; 0.95] i.c. al 95%) ma neutrali nella patologia CDH (O.R. = 0.70, [0.30; 1.44] i.c. al 95%).

*Discussione e Conclusioni.* L'effetto medio $\alpha_S$ sul livello sierico di LDL-C spiega il ruolo protettivo esercitato dagli alleli S nei confronti della patologia CDL e rende altresì conto della funzione non lineare che descrive la variazione età-correlata del pool genotipico nella popolazione sana, dove il genotipo SS raggiunge un massimo nel segmento adulto ed un minimo nel segmento ultra-ottantenne (1). In questa categoria, il decremento dei livelli sierici di TC ed LDL-C esercitato dagli alleli S andrebbe a sommarsi alla diminuzione fisiologica età-correlata di tali parametri, facendone scendere i valori al di sotto della soglia ottimale. Questo risultato conferma il concetto di modulazione età-specifica dei fattori genetici di rischio.

*Bibliografia.* (1) De Benedictis G. et al., 1998. *Ann. Hum. Genet.*62: 115; (2) Friedewald W.T. et al., 1972. *Clin. Chem.* 18: 499; (3) Christiansen F.B. & Feldman M.W.: 1986. *Population Genetics*, Blackwell Sc. Publ., pp.130-134

**C-15**

## EMOCROMATOSI: IDENTIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI H63D E C282Y IN UN CAMPIONE DI PAZIENTI AFFERENTI ALL'AMBULATORIO DI EPATOLOGIA.

**P. Siciliani, R. Argento, B. Russo, C. Cristofaro, A, Santelli, P. Malatesta, N. Perrotti**
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi "Magna Graecia" Catanzaro

*Scopo del lavoro.* L'emocromatosi ereditaria (HFE), la più comune causa di accumulo di ferro intracellulare nella popolazione caucasica, in Italia ha una prevalenza di 1/4000. Si manifesta principalmente nei maschi con vari segni clinici (splenomegalia, cirrosi, ca. epatico e aritmie) ed elevati livelli di Transferrina e di Ferritina. Il gene HFE presenta diverse mutazioni: le più importanti e frequenti sono la 845G/A (C282Y) e la 187C/G (H63D). In questo studio ci siamo proposti di valutare la frequenza delle mutazioni del gene HFE in soggetti provenienti dal nostro territorio con presunta diagnosi clinica di HFE.

*Materiali e metodi.* L'indagine è stata eseguita su un gruppo di 33 pazienti (23 maschi e 10 femmine) di età compresa tra 30 e 70 anni, selezionati in base alla presenza di epatopatia ed alterazioni dei parametri ematochimici (AST, ALT, Ferritina, Transferrina), afferenti all'Ambulatorio di Epatologia dell'A.O. di Paola (CS). L'analisi di prodotti di amplificazione (PCR) di frammenti di DNA corrispondenti agli esoni 2-3-4 del gene HFE, è stata condotta mediante SSCP e sequenziamento automatico con ABI PRISM 3100

*Risultati e discussione.* I 33 pazienti esaminati, tutti con sovraccarico di Ferro, sono stati così classificati: 2 risultavano doppi eterozigoti (H63D/C282Y); 9 presentavano eterozigosi solo per la mutazione H63D e 2 solo per C282Y; 20 risultavano negativi per le mutazioni studiate. La frequenza dell'allele H63D era del 22.7 % e quella dell'allele C282Y era del 6 %, non molto diverse da quelle riportate dalla letteratura. In base a questi primi risultati ci proponiamo di ricercare nei soggetti eterozigoti la presenza di differenti e nuove mutazioni in altri esoni del gene HFE o in altri geni candidati per l'emocromatosi. Inoltre ci proponiamo di valutare come condizioni ambientali, quali infezioni virali, malattie intercorrenti, abitudini di vita, possano costituire fattori di rischio per la comparsa della malattia.

**C-16**

## VALUTAZIONE DELL'ANSIA E DELLA SODDISFAZIONE DELLE GESTANTI SOTTOPOSTE A TRITEST

**M.P.Montesi, L.Fanelli, C.Persico, C.Firorelli**
U.O. Laboratorio Analisi, Azienda Sanitaria 6, Lamezia Terme

*Scopo del lavoro* Il Laboratorio Analisi esegue da circa 10 anni l'esame del Tritest, Screening della Sindrome di Down, della Trisomia 18 e dei Difetti del Tubo Neurale, nel secondo trimestre di gravidanza. Il Tritest ha un aspetto particolare, rispetto ai comuni esami di laboratorio: il risultato è espresso in termini probabilistici. E' stato notato, nel corso degli anni, che spesso le gestanti sono all'oscuro del significato del test e, soprattutto, hanno seri problemi nella accettazione e nella gestione del risultato, specialmente se indicativo per l'amniocentesi. Per tale motivo il laboratorio ha elaborato, per l'anno 2002, un progetto di miglioramento qualità, volto a fornire una consulenza genetica alle gestanti contestualmente al prelievo (ed eventualmente anche in seguito, se richiesta).

*Materiali e metodi.* I prelievi del tritest sono stati raggruppati in un unico giorno a settimana. Al momento del prelievo è stato consegnato ad ogni gestante un depliant informativo, appositamente ideato. Uno specialista in genetica medica ha quindi fornito alle gestanti le necessarie spiegazioni e ha raccolto i dati necessari per l'elaborazione del test. Le gestanti hanno espresso il loro consenso informato. L'esecuzione delle analisi è avvenuta nei due giorni successivi al prelievo e le gestanti sono state avvisate telefonicamente per il ritiro del referto.

Allo scopo di valutare la soddisfazione delle gestanti e soprattutto l'ansia legata agli aspetti particolari del test, è stato elaborato un apposito questionario, somministrato telefonicamente alle pazienti almeno due mesi dopo la comunicazione del risultato[1]. Le risposte fornite sono state valutate statisticamente con appositi softwares.

*Discussione e conclusioni.* I dati raccolti dimostrano come le gestanti abbiano gradito il colloquio con il genetista, che è servito a chiarire il significato del test, anche quando già informate da altre figure professionali. Non sembra tuttavia che il colloquio abbia ridotto l'ansia nell'attesa del risultato e per tale motivo riteniamo di dover apportare specifiche azioni correttive alla fase della consulenza.

La maggioranza delle gestanti ritengono che il test sia utile, nonostante l'incertezza legata a un risultato probabilistico. I requisiti più richiesti sono il miglioramento della detection rate ("sicurezza del risultato") e la velocità nella consegna. Per tale motivo ci apprestiamo a fornire alle gestanti il duo-test.

Il progettó ha dimostrato come il laboratorio possa migliorare il servizio offerto agli utenti, curando anche l'aspetto informativo e la qualità percepita dall'utente.

*Bibliografia.* 1) Salonen R, Kurki L, Lappalainen M. Experiences of Mothers Participating in Maternal Serum Screening for Down's Syndrome. Eur J Hum genet 1996; 4:113-119

**C-17**

## ESPERIENZA NELLO SCREENING DELLA SINDROME DI DOWN CON IL TEST COMBINATO

M. Carta[a], P. Catapano[b], A. Fortunato[a], M. Marchesini[b], R. Sposetti[b], G. Soffiati[a]
[a] Laboratorio di Chimica clinica ed Ematologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza
[b] Unità Operativa di Ostetricia e Ginecologia, Ospedale "S. Bortolo", Vicenza

*Introduzione*: Recentemente è stato proposto l'impiego del test combinato nello screening della sindrome di Down. Tale test ha dimostrato in più casistiche una buona accuratezza diagnostica (89%) e un ridotto numero di falsi positivi (5%). Nell'ottobre del 2001 abbiamo allora deciso di sostituire nell'Ospedale di Vicenza, il triplo test con il test combinato.

*Materiali e metodi*: Il test combinato si basa sulla misurazione della translucenza nucale eseguita esclusivamente da ecografisti accreditati presso la Fetal Medicine Foundation di Londra (FMF) e sulla determinazione nel siero materno di free β-hCG e PAPP-A (Immulite 2000 Euro/DPC, Los Angeles, CA). L'indagine viene eseguita su pazienti comprese tra la 11½ e la 13 ½ settimana di gestazione. I dati ottenuti vengono inseriti in un apposito programma fornito dalla FMF.

*Risultati*: Sono state sottoposte a screening 1266 pazienti di età media 31,5 anni. I dati del follow up a termine sono disponibili per ore su circa 800 pazienti. Non vi sono state segnalazioni di falsi negativi del test. Sono risultate positive allo screening (cut off 1:300) 48 pazienti (3,79%) (età media=34). Di queste 48 pazienti 34 (70.8 %) hanno eseguito un accertamento di diagnosi prenatale invasivo (villocentesi o amniocentesi), mentre 14 pazienti hanno scelto di proseguire la gravidanza. Tra le 34 pazienti che si sono sottoposte ad esami di approfondimento invasivi, 23 hanno dato risultati normali, mentre 8 patologici (23,5%) (vedi tabella 1); per 3 pazienti l'esame è ancora in corso. Tra le pazienti che non si sono sottoposte ad amniocentesi, 8 hanno partorito bambini normali (5 femmine e 3 maschi), 6 non hanno ancora portato a termine la gravidanza.

*Discussione*: I dati riportati sono preliminari, ma al momento non abbiamo riportato falsi negativi e la percentuale di falsi positivi (2,1%) è al disotto di quella riportata in letteratura. Inoltre il test è stato in grado di identificare anche patologie diverse dalla sindrome di Down. Il contributo del laboratorio è stato determinante in 3 pazienti.

| paziente | Età (anni) | Rischio per t. nucale | Rischio biochi | Rischio combinato | diagnosi |
|---|---|---|---|---|---|
| LE | 36 | 1:114 | 1:7 | 1:3 | Trisomia 18 |
| SMC | 33 | 1:8 | 1:7 | 1:3 | Trisomia 18 |
| VD | 30 | 1:14 | 1:102 | 1:8 | S. di C. De Lange (dg alla nascita, amnio neg. |
| SS | 30 | 1:2740 | 1:10 | 1:44 | S. Down |
| PL | 34 | 1:2536 | 1:26 | 1:208 | Turner mosaico |
| PP | 30 | 1:74 | 1:9 | 1:7 | S. Down |
| SM | 30 | 1:76 | 1:5121 | 1:182 | Trisomia 13 |
| BM | 28 | 1:6367 | 1:13 | 1:101 | Trisomia 16 |
| SD | 35 | 1:5 | 1:166 | 1:4 | Trisomia 18 |

**C-18**

## ARG 75 GLN UNA RARA MUTAZIONE NEL GENE CHE CODIFICA PER LA CONNESSINA 26 IN UNA FORMA DI SORDITÀ CONGENITA AUTOSOMICA DOMINANTE NON SINDROMICA.

**R. Argento, P. Siciliani, C. Cristofaro, E. Colao, P. Malatesta, L.V. Gallo, E. Cassandro, E. Gulletta, N. Perrotti**
Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Università degli Studi "Magna Graecia" Catanzaro

*Scopo del lavoro*. La sordità congenita è una forma comune di difetto dell'udito che si verifica con una frequenza di 1/1000 nati vivi. Sono state descritte molte mutazioni nel gene che codifica per la connessina 26 (GJB2). La famiglia dei geni della connessina codifica per le subunità proteiche dei canali delle gap junctions che mediano il trasporto di ioni e metaboliti fra il citoplasma di cellule adiacenti. Alcune mutazioni della connessina 26 (30 delG o 35delG). sono state trovate con frequenza relativamente aumentata in pazienti con sordità congenita autosomica recessiva non sindromica (NARD). Mutazioni della connessina 26 sono state trovate pure in forme autosomiche dominanti, sindromiche e non sindromiche. Ci siamo proposti di identificare queste mutazioni mediante il sequenziamento del gene GJB2.

*Materiali e metodi* L'indagine è stata eseguita su una famiglia calabrese caratterizzata da sordità congenita non sindromica, autosomica dominante. La raccolta dei pazienti e la loro caratterizzazione fenotipica è stata effettuata presso la cattedra di Audiologia della Facoltà di Medicina di Catanzaro. L'analisi è stata effettuata sia mediante SSCP sia sequenziando i frammenti di DNA amplificato, corrispondenti all'intera sequenza codificante la connessina 26.

*Risultati e discussione*. Nei soggetti affetti appartenenti alla famiglia studiata abbiamo identificato la sostituzione della arginina 75 con una glutammina (Arg75Gln). Arg75 occupa un posto importante nella sequenza della proteina, essendo l'ultimo aminoacido extracellulare prima del secondo dominio transmembranario. Una sostituzione arginina-triptofano (Arg75Trp), in questo stesso sito, è stata descritta nel 1998 in una famiglia egiziana caratterizzata da sordità congenita autosomica dominante, sindromica perché associata a cheratosi palmoplantare. Nell'ottobre dello scorso anno (Clin. Genet,. 2002) la stessa mutazione che noi abbiamo identificato (Arg75Gln) è stata descritta in una famiglia turca. In questo caso la sordità congenita, ereditata con modalità autosomica dominante era sindromica perché associata a cheratosi palmo-plantare. Nel caso da noi identificato, al contrario, non era presente la cheratosi palmo plantare. Si tratta della prima descrizione di sordità congenita non sindromica, autosomica dominate dovuta a sostituzione di Arg 75 con Gln. La descrizione di questo caso riveste un certo interesse in quanto suggerisce diverse modalità ereditarie per la sordità congenita e la cheratosi palmo-plantare.

**C-19**

## EQUILIBRIO REDOX E FUNZIONE IMMUNITARIA NELLE FAMIGLIE DEI DIABETICI TIPO 1

^L. Rossi, , E. Matteucci, *G. Malvaldi, F. Fagnani, I. Evangelista, O. Giampietro, ^B. Innocenti
Dip. Medicina Interna,*Dip. Patologia Sperimentale, Università di Pisa;^Lab. Analisi I.Azienda Ospedaliera Pisana

**Introduzione** - Poiché esistono anomalie dell'equilibrio redox nelle famiglie con diabete tipo 1 (T1DM) ed i gruppi tiolici intracellulari modulano le funzioni immunitarie, abbiamo studiato la relazione fra stress ossidativo e sistema immune nelle famiglie di T1DM.

**Materiale e metodi** - Lo studio biochimico prevede: glucosio, insulina, HbA1c, colesterolo totale ed HDL, trigliceridi, creatinina, albumina urinaria, vitamina B9 e B12, omocisteina (oltre alla misurazione della pressione arteriosa); indicatori di danno ossidativo (glutatione eritrocitario, RBC GSH, malondialdeide plasmatica ed eritrocitaria, P e RBC MDA, emolisi, livelli plasmatici di advanced oxidation protein products, AOPP e tioli, P SH), citochine proinfiammatorie (IL-1 b, IL-6, IFN-gamma, TNF-alfa) e recettori citochinici solubili (sIL-2R alfa e sIL-6R). Sono stati tipizzati i linfociti periferici mediante combinazione di CD4, CD8, CD23 (low affinity IgE receptor) e CD25 (IL-2 receptor). Sono stati reclutati 39 T1DM con durata di malattia da 4 mesi a 41 anni (media 18±11 a), 76 loro parenti di primo grado, non diabetici, a basso rischio immunitario (negativi per GADA e ICA), e 95 soggetti sani senza familiarità diabetica.

**Risultati** - I livelli di AOPP erano elevati e quelli di P SH ridotti nei pazienti con T1DM e nei loro parenti che pure presentavano basso rischio immunologico. RBC GSH era ridotto solo nei pazienti con T1DM, che presentavano anche un aumento della fragilità eritrocitaria. I recettori sIL-2R e sIL-6R erano aumentati nei T1DM. Percentuale e numero assoluto di monociti circolanti erano minori nei T1DM e nei parenti rispetto ai controlli. La tipizzazione linfocitaria evidenziava nei T1DM un ridotto numero di cellule con doppia positività: CD4+CD8+ e CD23+CD25+. Nei parenti di T1DM erano ridotte le cellule CD25+ e quelle CD23+CD25+. Nei T1DM, i livelli di GADA erano associati (R 0.6, p=0.01) positivamente con sIL-6R, negativamente con la durata del diabete e CD23+CD25+. La creatininemia correlava positivamente (multiple R 0.6, p<0.001) con sIL-2R e TNF-a. Era osservabile una correlazione (R 0.5, p<0.001) delle cellule CD23+CD25+ con il numero di monociti, CD4+CD+, CD25+, emolisi, e livelli plasmatici dei gruppi SH.

**Conclusioni** - Lo studio dimostra per la prima volta una relazione fra lo stress ossidativo, osservato nelle famiglie con T1DM, ed alcune caratteristiche immunologiche suggestive di meccanismi immunoregolatori differenti dai controlli. Rimane da chiarire l'ordine cronologico degli eventi che culminano nell'instaurarsi della patologia metabolica nelle famiglie con T1DM.

**C-20**

## DOSAGGIO DI PROTEINA C REATTIVA AD ALTA SENSIBILITÀ (hs-CRP) COME INDICE DI RISCHIO CARDIOVASCOLARE NELLE DONNE OBESE IPERINSULINEMICHE

**E. Dall'Aglio[2], R. Aloe[1], L. Battistelli[1], C. Bonaguri[1], R.Rossi[1], R. Franzosi[1], R. Montanari[2], S. Caronna[2], L. Arsenio[2], C. Monica[1]**
[1]Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Azienda Ospedaliera Parma
[2]Servizio di Malattie del Ricambio e Diabetologia, Azienda Ospedaliera Parma

*Scopo del lavoro* Nell'ultimo decennio la prevalenza dell'obesità nei paesi occidentali ha raggiunto proporzioni epidemiche. L'obesità si associa a resistenza insulinica, iperinsulinemia e costituisce un importante fattore di rischio indipendente per la patologia cardiovascolare. La determinazione della hs-CRP è stata associata ad un aumentato rischio cardiovascolare e valori significativamente più elevati sono stati riscontrati nei soggetti obesi rispetto ai controlli normopeso. Scopo del nostro studio è stato quello di determinare la hs-CRP ad alta sensibilità in una popolazione di soggetti obesi per individuare sottogruppi a rischio vascolare elevato.

*Materiali e metodi* Sono stati valutati 157 soggetti obesi con BMI>30 (95F;62M) non diabetici, suddivisi in terzili in relazione ai livelli di insulina a digiuno: i primi 2 terzili sono confrontabili, come età (F 45 vs 43; M 41 vs 44 anni), peso (F 89 vs 92; M 102 vs 110 kg), BMI (F 35 vs 36; M 33 vs 34 kg/m2), circonferenza vita (F 104 vs 107; M 111 vs 115 cm), livelli di AST (F 23 vs 24; M 25 vs 28), ALT (F 25 vs 26; M 34 vs 44) e gammaGT (F 20 vs 25; M 34 vs 41). La hs-CRP è stata determinata con metodica turbidimetrica in infrarosso (Beckman Coulter) e nefelometrica (Dade Behring).

*Risultati* I valori di hs-CRP sono risultati sovrapponibili per le due metodiche: in particolare i livelli di hs-CRP sono significativamente (p<0.05) più elevati nelle obese iperinsulinemiche in confronto alle obese normoinsulinemiche (0.64 vs 0.42 mg/L); nel primo gruppo si sono riscontrati valori significativamente più elevati di trigliceridi (p<0.005), più bassi di HDL-col (p<0.001), mentre i valori di pressione arteriosa e di frequenza cardiaca erano più elevati ma non raggiungevano la significatività. I livelli di colesterolo totale, colesterolo-LDL ed acido urico risultano sovrapponibili nei due gruppi.

*Discussione e Conclusioni* Nelle femmine, ma non nei maschi, hs-CRP correla positivamente con i livelli di insulina. Nelle femmine inoltre, a parità di grado di obesità e distribuzione del grasso corporeo, il rischio cardiovascolare espresso da hs-CRP è in relazione alla presenza di elevati livelli di insulina.

*Bibliografia* Rifai N., Ridker M. High-Sensitivity C-Reactive Protein: A Novel and Promising Marker of Coronary Heart Disease Clinical Chemistry 47:3 2001