

## Titolo del Progetto

### APPROCCIO NUTRACEUTICO BASATO SU ALIMENTI FERMENTATI CON IL PROBIOTICO L. PARACASEI CBA L74 PER IL TRATTAMENTO DELLA DERMATITE ATOPICA

#### Background

La dermatite atopica (DA) viene definita come un eczema pruriginoso, a decorso cronico recidivante, con una distribuzione delle lesioni tipica a secondo dell'età, spesso associata ad altre malattie atopiche. La DA rimane la più frequente manifestazione clinica dell'atopia nei primi anni di vita: la sua prevalenza nell'età scolare è di circa il 10%. Le attuali conoscenze patogenetiche definiscono la DA come il risultato di una alterazione della barriera cutanea che innesca una reazione infiammatoria, caratterizzata da una fase precoce nella quale prevalgono le citochine Th2 (IL4, IL5) con reclutamento di eosinofili, e da una seconda fase in cui prevalgono le citochine Th1 (IL2, IL12 e IFN-gamma) con un probabile coinvolgimento della componente anticorpale. Il decorso cronico-recidivante della malattia rende spesso difficile il trattamento con le sole cure topiche, ed i casi più severi necessitano di terapia sistemica con steroidi e/o immunomodulanti e/o farmaci biologici. L'uso dei probiotici è stato recentemente suggerito nella cura della DA nella popolazione pediatrica con risultati incoraggianti, seppur non conclusivi. È scientificamente riconosciuto come alcuni effetti probiotici possono essere ottenuti anche con l'utilizzo di batteri inattivati, componenti batteriche isolate (ad esempio DNA batterico) o fattori prodotti durante la fermentazione (acidi grassi a catena corta, proteine batteriche etc). In questa categoria rientra anche il prodotto oggetto di questo studio: farina di riso fermentata, ovvero in cui è stato fatto crescere un probiotico (*Lactobacillus paracasei* CBA L74) che è stato inattivato alla fine del processo fermentativo attraverso un trattamento termico. Il prodotto finito, quindi, non contiene batteri vivi. Il batterio è stato testato per la sua sensibilità agli antibiotici sulla base dei criteri stilati dall'EFSA in materia ed è nota la sua sequenza genomica. Studi di fase preclinica hanno mostrato proprietà anti-infiammatorie di matrici alimentari fermentate con *Lactobacillus paracasei* CBA L74 (stimolazione della produzione di IL10 e riduzione di IL12), anche in risposta alla stimolazione con *Salmonella typhimurium*. Recentemente sono stati testati gli effetti clinici del consumo per 12 settimane di farina di riso fermentata con *Lactobacillus paracasei* CBA L74 in uno studio pilota condotto su bambini affetti da DA moderata/severa (definita tramite indice SCORAD). In questo studio tutti i bambini hanno registrato un miglioramento della severità della DA e hanno ridotto la frequenza di applicazione di steroidi topici. Questi dati preliminari aprono rilevanti prospettive di utilizzo di questi prodotti in nutrizione umana e nuove strutture di produzione sono attualmente attive nella Regione Campania ed in altri stabilimenti situati nel territorio nazionale. È importante supportare questi prodotti con un'ulteriore fase di ricerca volta ad una migliore definizione dei meccanismi d'azione coinvolti nella protezione della dermatite atopica. Il disegno della ricerca è stata approvata dal Comitato Etico dell'Istituzione del gruppo di ricerca del proponente.

Il progetto di ricerca si articolerà in 2 fasi, descritte di seguito:

#### Fase#1

Obiettivi:

- 1) Valutare l'efficacia della somministrazione di farina di riso fermentata con il probiotico *L.paracasei* CBAL74 sul decorso clinico dei pazienti affetti da DA moderata o severa, in termini di riduzione dello SCORAD, durante il periodo dello studio e a distanza di 4 settimane dalla sospensione del trattamento.
- 2) Valutare la risposta infiammatoria basale (T0) ed al termine dell'intervento (T12) in termini di markers di infiammazione (profilo citochinico) e immunofenotipo periferico, in confronto al gruppo trattato con placebo.
- 3) Valutare la sensibilizzazione allergica mediante dosaggio basale (T0) ed al termine dell'intervento (T12) di IgE totali e specifiche (sIgE), in confronto al gruppo trattato con placebo.
- 4) Valutare la prescrizione di terapia steroidea topica nel gruppo di bambini trattati con farina di riso fermentata rispetto al gruppo di bambini trattati con placebo.
- 5) Valutare la variazione del microbiota intestinale tra il T0 ed il T12.
- 6) Valutare la tollerabilità della farina di riso fermentata (definita come occorrenza di eventi avversi) rispetto al placebo.

Popolazione di studio:

Saranno inclusi nello studio bambini con DA moderata o severa (secondo SCORAD index).

Criteri di inclusione: Bambini tra i 6 ed i 36 mesi di vita, arruolati progressivamente tra i soggetti afferenti all'Ambulatorio di Allergologia Pediatrica del Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali dell'Università degli Studi di Napoli Federico II con diagnosi di DA moderata o severa valutata mediante l'utilizzo di un indice di Severità della DA (SCORAD index)

Criteri di esclusione: Rino-congiuntivite e/o asma acuti, malattie croniche (malattie autoimmuni, BPCO, cardiopatie, IRC, malattie del SNC, diabete immunodepressione congenita o acquisita), trattamenti con prebiotici e/o probiotici nel mese antecedente l'arruolamento, terapia antibiotica in corso, trattamenti con immunomodulatori sistemici nel mese antecedente l'arruolamento, trattamenti con immunomodulatori topici (Tacrolimus o Pimecrolimus) nei tre mesi antecedenti l'arruolamento, malattie infettive acute o croniche, storia di allergia al riso.

Procedure dello studio : arruolamento e assegnazione al trattamento

Per 12 settimane, un gruppo di bambini assumerà farina di riso fermentata e un gruppo riceverà placebo (maltodestrine), secondo schema randomizzato, in doppio cieco. Per tutta la durata dello studio i prodotti saranno forniti gratuitamente ai bambini da Heinz Italia. I prodotti risponderanno ai requisiti per i prodotti per l'infanzia e saranno testati per l'assenza di contaminanti microbiologici e chimici. Il prodotto assegnato mediante randomizzazione sarà contenuto in barattoli simili per packaging per i 2 trattamenti, contenenti polvere da diluire in liquido. Dopo la diluizione l'aspetto ed il sapore saranno identici per i 2 trattamenti. L'aderenza verrà valutata intervistando i genitori e verificando il quantitativo di barattoli restituiti. Nell'archivio dello sperimentatore verranno conservate le copie sigillate dei codici di randomizzazione. Nel caso si verificasse un Evento Avverso Serio (SAE) per il quale fosse necessario conoscere il prodotto assunto

dal bambino, lo sperimentatore potrà aprire il codice al fine di gestire al meglio il SAE. Ogni bambino sarà identificato durante tutta la durata dello studio da un codice alfanumerico identificativo, corrispondente alle iniziali del centro e al codice numerico progressivo assegnato al momento del reclutamento dallo sperimentatore per consultazione della lista di randomizzazione.

#### Campioni e Indagini

Indagini eseguite nel corso dello studio :

- Questionario standardizzato per il calcolo dell'indice SCORAD
- Analisi del microbiota fecale in tutti i bambini arruolati
- Dosaggio citochine periferiche (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31) in condizioni basali e dopo stimolazione specifica (Anti-CD3/CD28) o aspecifica (PHA) su tutti i bambini arruolati mediante kit ELISA specifici
- Dosaggio IgE totali e specifiche (sIgE) su tutti i bambini arruolati pre e post intervento mediante ELISA automatizzato
- Verifica immunofenotipo periferico (Tregs, central memory, effectors, Th1/Th2/Th17) su tutti i bambini arruolati mediante citofluorimetria
- Valutazione della concentrazione di butirato fecale al momento dell'arruolamento (T0) e dopo un trattamento terapeutico di 3 mesi con un prodotto fermentato a base di riso con *Lactobacillus paracasei* CBA L74 (T1) rispetto al gruppo trattato con placebo e correlazione con la composizione del microbiota intestinale, mediante gas cromatografia e sequenziamento del 16S RNA
- Analisi dei biomarker sierici: TSLP, IL-33, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , nei pazienti con DA al momento dell'arruolamento (T0) e dopo il trattamento (T1) rispetto al gruppo placebo.
- Valutazione di HBD-2, HBD-3, espressione di filaggrina su RNA estratto da biopsie cutanee di pazienti con AD all'arruolamento (T0) e dopo trattamento (T1).
- Valutazione dei miRNA sierici coinvolti nella patogenesi dell'AD, nei pazienti al momento dell'arruolamento (T0) e alla fine del trattamento (T1) rispetto al gruppo placebo

#### Valutazioni cliniche nel corso dello studio

Nel corso dello studio sono previste 5 visite: arruolamento (T0), quarta (T4), ottava (T8), dodicesima (T12) settimana di trattamento e follow up dopo 4 settimane di sospensione (T16). Tutti i pazienti arruolati nello studio saranno sottoposti a:

Visita T0 – arruolamento

Arruolamento se soddisfatti i criteri di inclusione e assenti quelli di esclusione

Raccolta anamnestica

Valutazione della gravità della DA (calcolo dello SCORAD index/prurito )

Raccolta di campione di siero per determinazioni immunologiche

Esecuzione skin prick test

Raccolta di campione di feci per analisi del microbiota fecale

Prescrizione emollienti topici e/o terapie antiinfiammatorie topiche (GSC) (se necessario)

Inizio trattamento con farina di riso fermentata o placebo

Visita T4 (dopo 4 settimane dall'arruolamento)

Visita specialistica per valutazione clinica complessiva e calcolo dello SCORAD index/prurito

Rilevazione quantità di steroidi topici utilizzata e aggiornamento schema terapeutico (se necessario)

Rilevazione eventuali effetti avversi

Visita T8 (dopo 8 settimane dall'arruolamento)

Visita specialistica per valutazione clinica complessiva e calcolo dello SCORAD index/prurito

Rilevazione quantità di steroidi topici utilizzata e aggiornamento schema terapeutico (se necessario)

Rilevazione eventuali effetti avversi

Visita T12 (dopo 12 settimane dall'arruolamento) – fine trattamento

Visita specialistica per valutazione clinica complessiva e calcolo dello SCORAD index/ prurito

Rilevazione quantità di steroidi topici utilizzata e aggiornamento schema terapeutico (se necessario)

Raccolta di campione di siero per determinazioni immunologiche

Raccolta di campione di feci per analisi del microbiota fecale

Rilevazione eventuali effetti avversi

Visita T16 (dopo 4 settimane dalla fine del trattamento) – visita di follow up

Visita specialistica per valutazione clinica complessiva e calcolo dello SCORAD index/ prurito

Rilevazione quantità di steroidi topici utilizzata e aggiornamento schema terapeutico (se necessario)

Valutazione della tollerabilità

La valutazione della tollerabilità del prodotto in studio avverrà mediante questionario presente nella Scheda Raccolta Dati, in cui verrà registrata la comparsa, la frequenza e la durata dei seguenti disturbi: feci acquose, feci dure, coliche/flatulenza, maggiore agitazione o irritabilità rispetto al solito, rigurgiti eccessivi dopo il pasto.

Scheda raccolta dati

I dati relativi ai soggetti reclutati verranno adeguatamente registrati nella Scheda Raccolta Dati. 7.4 Terapie concomitanti

I pazienti potranno usare creme emollienti durante il periodo di osservazione e terapia steroidea topica, all'occorrenza, su indicazione dello specialista. Lo Sperimentatore registrerà nella Scheda Raccolta Dati lo schema terapeutico prescritto e annoterà la frequenza di utilizzo e la quantità di cortisonici topici impiegata.

Descrizione dei prodotti

Composizione

La composizione del prodotto in studio e del controllo è descritta nelle schede tecniche.

Dosaggio

Il prodotto in studio e il controllo saranno in formulazione polvere. La dose prescritta è pari a 7 grammi di polvere al giorno da diluire in un liquido a piacere (es. acqua, latte,..). In occasione della prima visita. Lo sperimentatore consegnerà ai genitori, unitamente al prodotto, anche le istruzioni per la preparazione e la conservazione dello stesso.

Controllo qualità

Il controllo qualità dei prodotti sarà effettuato da Heinz Italia S.p.A., nel rispetto delle normative europee vigenti, al momento della produzione. La stessa normativa verrà applicata per lo stoccaggio, il trasporto e la distribuzione del prodotto. Il lotto, il codice identificativo e la data di scadenza saranno riportati su ogni confezione.

Confezionamento ed etichettatura

I prodotti saranno confezionati ed etichettati da Heinz Italia S.p.A.

Requisiti legali ed etici

Legalità dello studio

Lo studio sarà condotto in accordo ai requisiti legali vigenti.

Tutela della privacy dei dati del paziente

I dati personali dei partecipanti e i risultati ottenuti saranno mantenuti confidenziali. L'informativa ed il consenso al trattamento dei dati personali dei minori verranno consegnati ai genitori dei bambini partecipanti allo studio.

Consenso informato

Lo studio sarà descritto e spiegato in dettaglio ai genitori (o alla persona avente patria potestà) di ciascun bambino considerato eleggibile da uno dei medici addetti. Verrà consegnata una copia del consenso informato, che dovrà essere datato e firmato dagli esercenti patria potestà e dal medico addetto. Nessun paziente sarà arruolato senza consenso informato debitamente firmato.

Informativa Pediatra Curante

All'arruolamento verrà consegnata ai genitori di ogni bambino una lettera informativa dello studio per il Pediatra Curante.

Approvazione del comitato etico

Lo studio sarà sottoposto all'approvazione del Comitato Etico. E avrà inizio solamente previa autorizzazione.

Assicurazione Qualità e Controllo Qualità

In accordo con le Linee Guida di Buona Pratica Clinica (CPMP/ICH/135/95), l'azienda è responsabile della qualità dei dati dello studio.

Fase #2

Obiettivo

Valutare gli effetti immunologici e non-immunologici del riso fermentato con *L. paracasei* CBAL74 nei bambini affetti da DA.

Arruolamento dei pazienti

Saranno arruolati 10 bambini con una diagnosi certa di DA e contemporaneamente 10 bambini sani non a rischio atopico. Sarà effettuato un campione di sangue periferico per eseguire l'estrazione di PBMCs per la stimolazione con riso fermentato con *L. paracasei* CBAL74. Gli effetti immunologici saranno valutati mediante esperimenti di dose-risposta e time-course sui PBMCs dei bambini arruolati nello studio.

Sul surnante cellulare saranno determinate di IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IFN- $\gamma$  mediante ELISA

Sul DNA estratto dai PBMCs stimolati, sarà effettuata:

- Valutazione dello stato di metilazione del DNA di geni codificanti per citochine (IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31) al basale e dopo specifici stimoli (anti-CD3 / CD28) o non specifici (PHA) su PBMCs da bambini con DA, mediante Real Time HRM, e confermate mediante sequenziamento
- Valutazione dei miRNA coinvolti nella patogenesi dell'DA, sull'RNA estratto dai PMBCs dei con DA pazienti

Gli effetti non immunologici saranno valutati mediante stimolazione di enterociti umani (cellule Caco-2) con riso fermentato con *L. paracasei* CBAL74.

Saranno effettuati esperimenti dose-risposta e di time-course e valutati i seguenti parametri:

- proliferazione / differenziamento cellulare (espressione della lattasi)
- resistenza transepiteliale (TER)

- permeabilità FITC-dextrano
- spessore dello strato di muco, espressione di MUC-5AC e immunofluorescenza
- espressione di proteine a giunzione stretta (occludina, ZO-1) e immunofluorescenza