

# PNEUMOLOGIA PEDIATRICA

## PREMI SIMRI

**Profilo metabolico di bambini  
con infezioni respiratorie ricorrenti**

**Analisi eziologica delle polmoniti in un paese  
a basse risorse: necessario il potenziamento del piano  
di prevenzione vaccinale locale**

**Fattori predittivi di esacerbazioni asmatiche in  
bambini e adolescenti con asma persistente**

**Indicatore Composto (IC) per la valutazione  
multidimensionale baseline dell'impatto dell'asma in  
pazienti ambulatoriali non trattati: studio pilota**

**Valutazione dei livelli di leptina nel siero  
e nel condensato dell'aria esalata  
di bambini asmatici e obesi: uno studio pilota**



# Profilo metabolomico di bambini con infezioni respiratorie ricorrenti

*Metabolomic profile of children with recurrent respiratory infections*

Sara Bozzetto<sup>1</sup>, Paola Pirillo<sup>1</sup>, Mariangela Berardi<sup>1</sup>, Laura Cesca<sup>1</sup>, Giuseppe Giordano<sup>1</sup>, Matteo Stocchero<sup>2</sup>, Maria Encarnacion Blanco<sup>1</sup>, Stefania Zanconato<sup>1</sup>, Silvia Carraro<sup>1</sup>, Eugenio Baraldi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>*Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino (SDB), Istituto di Ricerca Pediatrica (IRP) Città della Speranza, Padova.*

<sup>2</sup>*S-IN Soluzioni Informatiche, Vicenza.*

**Corrispondenza:** Sara Bozzetto **email:** sara.bozzetto@sanita.padova.it

**Riassunto Obiettivi.** Applicare l'analisi metabolomica eseguita su campioni di urine a bambini affetti da infezioni respiratorie ricorrenti (IRR) allo scopo di:

- identificare profili di metaboliti caratteristici di tale condizione rispetto a un gruppo di bambini sani;
- confrontare il profilo metabolico dopo la somministrazione per 3 mesi di Pidotimod, un immunostimolante sintetico, con quello di un gruppo di controlli sani.

**Materiali e Metodi.** Sono stati confrontati 13 bambini di età compresa tra i 3 e i 6 anni, affetti da IRR, con 15 bambini sani della stessa età. È stato valutato il profilo metabolomico urinario dei bambini con IRR prima e dopo un mese di terapia con Pidotimod. L'analisi metabolomica è stata eseguita mediante spettroscopia di massa (Synapt G2, Waters) accoppiata con cromatografia liquida ad alta prestazione (UPLC-MS, Acquity Waters). I dati sono stati esaminati mediante analisi statistica multivariata.

**Risultati.** È stato possibile costruire robusti modelli in grado di discriminare bambini con IRR rispetto a quelli sani e bambini con IRR dopo terapia con Pidotimod rispetto ai controlli. Delle 1502 variabili emerse, 138 caratterizzano i bambini con IRR rispetto ai controlli. Dopo la terapia con Pidotimod, solo 34 variabili permangono nel differenziare i bambini con IRR rispetto ai soggetti sani. L'analisi delle variabili ha consentito di identificare potenziali *biomarkers* che caratterizzano i bambini con IRR, alcuni dei quali sono correlati al microbiota intestinale.

**Conclusioni.** Il profilo metabolomico urinario è in grado di discriminare bambini con IRR rispetto ai soggetti sani. Dopo la terapia con Pidotimod, solo 34 delle 138 variabili caratterizzanti persistono nel differenziare i bambini con IRR rispetto ai sani. Questi dati suggeriscono che il Pidotimod può parzialmente ripristinare il metabolismo dei bambini con IRR, avvicinandolo a quello dei bambini sani.

**Parole chiave:** infezioni respiratorie ricorrenti, metabolomica, pidotimod.

**Key words:** recurrent respiratory infections, metabolomics, pidotimod.

## INTRODUZIONE

Le infezioni respiratorie ricorrenti (IRR) possono interessare fino al 6% dei bambini con meno di sei anni ed hanno un costo economico e sociale elevato. Questa categoria di pazienti costituisce un *challenge* per il pediatra (1). La definizione di IRR è stata formulata nel 1970 dal Gruppo di Studio di Immunologia della Società Italiana di Pediatria (1). I criteri per la definizione di IRR sono l'assenza di condizioni patologiche sottostanti (come immunodeficit primari o secondari, fibrosi cistica, malformazioni delle vie aeree, discinesia ciliare primaria) che giustifichino la ricorrenza delle infezioni e almeno una delle seguenti condizioni:

- Sei o più infezioni respiratorie in un anno;
- Uno o più episodi di infezione respiratoria al mese tra ottobre e febbraio;
- Tre o più infezioni delle basse vie aeree in un anno.

Recenti evidenze hanno correlato le infezioni respiratorie del bambino con l'aumento del rischio di sviluppare asma e bronchite cronica ostruttiva in età adulta (2). Una miglior caratte-

rizzazione dei bambini con IRR può quindi risultare cruciale per identificare strategie preventive personalizzate.

Gli immunostimolanti rientrano fra le strategie di prevenzione delle IRR (3, 4). Essi sono stati anche indicati come ambito di ricerca nella *roadmap* tracciata dal *National Heart, Lung, and Blood Institute* nell'ambito della prevenzione primaria delle patologie respiratorie (5). Il pidotimod è un dipeptide sintetico con proprietà immunomodulatorie (6, 7). Gli studi attualmente disponibili dimostrano che il Pidotimod è efficace nella prevenzione delle IRR, ma sembra anche che sia in grado di potenziare la risposta immunitaria ad esempio se somministrato in associazione alla vaccinazione antiinfluenzale o in corso di polmonite (7-12).

La metabolomica è l'ultima delle scienze omiche e permette di caratterizzare il profilo metabolico complessivo di un campione biologico mediante l'uso di metodiche spettroscopiche, senza partire da ipotesi a priori. L'approccio metabolomico, infatti, considera simultaneamente un gran numero di metaboliti presenti in un campione e, con l'aiuto di strumenti di bioinformatica, permette l'identificazione di profili di metaboliti caratteristici in grado di discriminare gruppi diversi (13,14). La metabolomica, in questo modo, offre un'istantanea del funzionamento dei processi biochimici di un sistema biologico in un dato momento e può portare all'identificazione di metaboliti nuovi o inaspettati e alla caratterizzazione di processi metabolici non precedentemente noti, permettendo la formulazione di ipotesi patogenetiche nuove e successivamente l'identificazione di target terapeutici innovativi.

L'obiettivo di questo studio era di applicare l'analisi metabolomica, eseguita su campioni di urine, in bambini affetti da IRR allo scopo di identificare la presenza di profili di metaboliti caratteristici di tale condizione, avendo come controllo un gruppo di bambini sani. Secondo obiettivo era rivalutare l'analisi metabolomica dopo la somministrazione per 3 mesi di Pidotimod allo scopo di determinare se tale terapia si associa ad un cambiamento del profilo metabolico e di confrontare il profilo metabolico post-terapia con Pidotimod con quello dei controlli sani.

## MATERIALE E METODI

Lo studio è stato condotto presso il Dipartimento per la Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova. Sono stati consecutivamente arruolati 13 bambini tra i 3 e i 6 anni di età con diagnosi di IRR secondo la definizione del Gruppo di Studio di Immunologia della Società Italiana di Pediatria (1). Abbiamo escluso bambini con patologie respiratorie croniche o immunodeficit dimostrati. I bambini arruolati sono stati confrontati con 15 bambini sani della stessa età con anamnesi negativa per patologie respiratorie o allergiche.

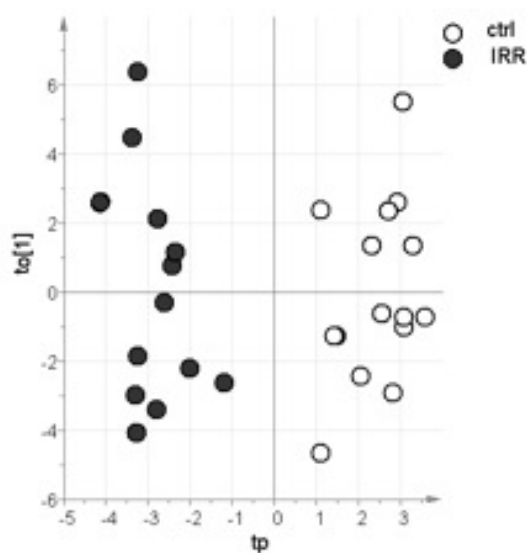
I campioni di urine sono stati raccolti a distanza di almeno 1 settimana da un episodio di infezione respiratoria. I bambini con IRR sono stati trattati con un immunostimolante, il Pidotimod, alla dose di 400 mg, per due volte al giorno per 10 giorni al mese per 3 mesi. È stato poi raccolto un campione di urine a distanza di un mese dal termine della terapia (per permettere un completo *wash-out* dal farmaco). Abbiamo quindi confrontato il profilo metabolomico dei campioni di urine raccolti dopo la terapia con Pidotimod con quello dei soggetti sani. Tutti i campioni di urine sono stati raccolti in contenitori di plastica che erano in precedenza stati lavati con metanolo e sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'analisi. Tutti i genitori dei bambini hanno dato il loro consenso informato alla partecipazione allo studio e questo è stato approvato dal Comitato Etico Locale.

L'analisi dei campioni di urina è stata condotta dal Laboratorio di Spettrometria di Massa e Metabolomica del Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università degli Studi di Padova. Il profilo metabolico urinario è stato ottenuto grazie alla spettrometria di massa ad alta definizione. L'analisi è stata condotta tramite una cromatografia liquida ad alta prestazione (UPLC, *Acquity*, *Waters*) accoppiata allo spettrometro Q-TOF Synapt G2 (*Waters Corp*, Milford, MA). I dati spettrometrici ottenuti sono stati poi esaminati mediante opportune tecniche di analisi statistica multivariata.

### Profilo metabolomico di bambini con IRR confrontati con controlli sani

Un robusto modello di ptPLS-DA distingue i bambini con IRR dai controlli sani (*ptPLS-DA*  $R^2=0.92$ ;  $Q^2$  7-folds  $=0.75$ ). I due gruppi, come si può osservare in Figura 1, occupano regioni diverse del grafico.

**Fig. 1.** Scatter plot del modello *ptPLS-DA* per i soggetti con IRR ed i controlli sani. In nero sono riportati i bambini con IRR, in bianco i controlli sani.



DA per caratterizzare i soggetti con IRR dopo terapia con Pidotimod e i controlli sani ( $R^2=0.85$ ;  $Q^2$  7-folds  $=0.64$ ).

Solo 34 delle 138 variabili coinvolte nella discriminazione basale tra bambini con IRR e controlli permangono alterate nei profili dei bambini con IRR dopo la terapia con Pidotimod rispetto ai soggetti sani. Tra queste 34 si ritrovano delle variabili i cui valori di m/z sono riconducibili agli acidi biliari e all'acido ippurico.

### DISCUSSIONE

Questo studio pilota dimostra che il profilo metabolomico urinario è in grado di distinguere i bambini con IRR dai piccoli pazienti sani. Tra le variabili caratterizzanti i bambini con IRR rispetto ai controlli, abbiamo identificato alcuni metaboliti che corrispondono all'acido ippurico, agli acidi biliari ed agli ormoni steroidei. Questi ultimi sono sintetizzati dal colesterolo tramite una serie di reazioni e sono implicati in varie funzioni fisiologiche dell'organismo tra cui la riproduzione, la differenziazione, lo sviluppo, la proliferazione cellulare, l'apoptosi, l'infiammazione, il metabolismo e la risposta immunitaria (15). Essi potrebbero anche, in questo caso, correlare con la presenza di uno stato infiammatorio, caratterizzando i bambini con IRR rispetto ai sani. L'acido ippurico è un prodotto escretorio urinario le cui variazioni sono state associate a modifiche del microbiota intestinale (16). Tra le variabili caratterizzanti i bambini con IRR sono stati identificati anche gli acidi biliari. Esiste un vero e proprio asse ed equilibrio dinamico tra *pool* ematico di acidi biliari e microbioma intestinale. Studi recenti, infatti, si sono concentrati nel tentativo di identificare potenziali meccanismi per spiegare come alterazioni nel microbioma intestinale influenzino la dimensione e la composizione del *pool* ematico di acidi biliari. Dall'altro lato, gli acidi biliari stessi stanno emergendo come fattori che regolano la composizione del microbioma intestinale (17). Si potrebbe quindi ipotizzare che i bambini con IRR presentino un diverso microbioma intestinale se confrontato con quello dei bambini sani.

Il modello IRR-controlli, dopo il *pre-processing*, è descritto da una tabella di 1502 variabili, definite da *rt* e *m/z*. L'analisi in *pt-PLS-DA* e le successive analisi ROC e *t-test* sulle singole variabili hanno permesso di estrarre 138 variabili che maggiormente definiscono la distribuzione dei profili urinari dei soggetti con IRR e dei bambini sani. Utilizzando i database disponibili (Metlin e HMDB) e analizzando lo spettro di frammentazione, abbiamo estrapolato i possibili *biomarkers* che discriminano i soggetti con IRR rispetto ai controlli sani. Il gruppo di bambini con IRR è caratterizzato da un aumento dei livelli di variabili che sono ascrivibili agli ormoni steroidei, ad alcuni acidi biliari primari e secondari e all'acido ippurico.

### Profilo metabolomico di bambini con IRR dopo terapia con Pidotimod confrontati con il gruppo di bambini sani

Le 138 variabili estratte dal precedente modello sono state utilizzate per costruire il modello *ptPLS-*

Andando ad analizzare la differenza osservata tra i bambini con IRR dopo terapia con Pidotimod e i controlli sani, solo 34 delle 138 variabili precedentemente descritte persistono nel definire tale differenza. Tra queste 34 permangono gli acidi biliari e l'acido ippurico, mentre gli ormoni steroidei non risultano più come variabili caratterizzanti. Si può quindi ipotizzare che la terapia con pidotimod possa modificare il profilo metabolomico dei bambini con IRR, rendendolo più simile a quello dei controlli sani, anche se persistono le differenze legate ai metaboliti collegati al microbioma intestinale.

## CONCLUSIONI

Il nostro studio pilota dimostra che l'analisi del profilo metabolomico urinario è in grado di discriminare bambini con IRR dai sani, suggerendo la presenza in questi soggetti di un alterato *background* biochimico-metabolico. Solo 34 delle 138 variabili caratterizzanti i bambini con IRR persistono nel differenziare i bambini dopo la terapia con Pidotimod rispetto al gruppo dei controlli sani. Questi dati suggeriscono che il Pidotimod possa parzialmente ripristinare le alterazioni del metaboloma riscontrato nei bambini con IRR, rendendolo più simile a quello dei bambini sani.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) De Martino M, Ballotti S. *The child with recurrent respiratory infections: normal or not?* *Pediatr Allergy Immunol* 2007; 18: 13-18.
- (2) Martinez FD. *The origins of asthma and chronic obstructive pulmonary disease in early life.* *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6: 272-277.
- (3) Del-Rio-Navarro BE, Espinosa Rosales F, Flenady V, et al. *Immunostimulants for preventing respiratory tract infection in children.* *Cochrane Database Syst Rev* 2006; 18: CD004974.
- (4) Esposito S, Musio A. *Immunostimulants and prevention of recurrent respiratory tract infections.* *J Biol Regul Homeost Agents* 2013; 27: 627-636.
- (5) Jackson DJ, Hartert TV, Martinez FD, et al. *Asthma: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases.* *Ann Am Thorac Soc* 2014; 3: 139-145.
- (6) Carta S, Silvestri M, Rossi GA. *Modulation of airway epithelial cell functions by Pidotimod: NF-kB cytoplasmic expression and its nuclear translocation are associated with an increased TLR-2 expression.* *Ital J Pediatr* 2013; 10; 39: 29.
- (7) Ferrario BE, Garuti S, Braido F, et al. *Pidotimod: the state of the art.* *Clin Mol Allergy* 2015; 13: 8.
- (8) Namazova-Baranova LS, Alekseeva AA, Kharit SM, et al. *Efficacy and safety of pidotimod in the prevention of recurrent respiratory infections in children: a multicentre study.* *Int J Immunopathol Pharmacol* 2014; 27: 413-419.
- (9) Zuccotti GV, Mameli C, Trabattoni D, et al. *Immunomodulating activity of Pidotimod in children with Down syndrome.* *J Biol Regul Homeost Agents* 2013; 27: 253-258.
- (10) Mameli C, Pasinato A, Picca M, et al. *AX-Working group. Pidotimod for the prevention of acute respiratory infections in healthy children entering into daycare: A double blind randomized placebo-controlled study.* *Pharmacol Res* 2015; 97: 79-83.
- (11) Esposito S, Garziano M, Rainone V, et al. *Immunomodulatory activity of pidotimod administered with standard antibiotic therapy in children hospitalized for community-acquired pneumonia.* *J Transl Med* 2015; 13: 288.
- (12) Zuccotti GV, Mameli C, Trabattoni D, et al. *Immunomodulating activity of Pidotimod in children with*

*Down syndrome.* J Biol Regul Homeost Agents 2013; 27: 253-258.

- (13) Carraro S, Giordano G, Reniero F, et al. *Metabolomics: a new frontier for research in pediatrics.* J Pediatr 2009; 154: 638-644.
- (14) Nicholson JK, Lindon JC. *Systems biology: Metabonomics.* Nature 2008; 455: 1054-1056.
- (15) Cho HJ, Kim JD, Lee WY, et al. *Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry.* Anal Chim Acta 2009; 632: 101-108.
- (16) Goodwin BL, Ruthven CRJ, Sandler M. *Gut flora and the origin of some urinary aromatic phenolic compounds.* Biochem Pharmacol 1194; 47: 2294-2297.
- (17) Claus SP, Tsang TM, Wang Y, et al. *Systemic multicompartmental effects of the gut microbiome on mouse metabolic phenotypes.* Mol Syst Biol 2008; 4: 219.