



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA
Azienda Ospedaliera Brotzu

Adottata dal Commissario Straordinario in data 18 FEB. 2015 ^{Deliberazione 228}

OGGETTO: approvazione verbale n. 2 /2015 – 28.01.2015

Pubblicata all'Albo Pretorio dell'Azienda a partire da 19 FEB. 2015 per 15 giorni consecutivi e posta a disposizione per la consultazione

IL DIRETTORE AMMINISTRATIVO

Il Commissario Straordinario
Dott. ssa Graziella Pintus

Coadiuvato dal

Direttore Amministrativo

Dott. ssa Laura Balata

Direttore Sanitario

Dott. Nazzareno Pacifico

SU proposta del Comitato Etico Aziendale

PREMESSO che gli Ospedali di Rilievo Nazionali e di Alta Specializzazione sono abilitati a svolgere sperimentazioni cliniche sui farmaci così come previsto dalla Circolare MS n. 8 del 10.07.1997 e successivo aggiornamento del 05.10.2000 n. 1.

VISTO il Decreto Ministeriale 18 marzo 1998 "linee guida di riferimento per l'istituzione e per il funzionamento dei comitati Etici" e successive integrazioni.

PRESO atto del verbale n. 2/2015 del 28.01.2015 (all.n.02) del Comitato Etico Aziendale relativo allo Studio Clinico "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia" – Sperimentatore Dott. Pier Paolo Pusceddu Direttore S.C. Pediatria

VISTO il parere favorevole del Direttore Amministrativo e del Direttore Sanitario

DELIBERA

autorizzare la presa d'atto del verbale n. 2/2015 – del 28.01.2015 relativo allo Studio Clinico "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia" Sperimentatore Dott. Pier Paolo Pusceddu Direttore S.C. Pediatria

Il Direttore Amministrativo

Dott.ssa Laura Balata

Il Direttore Sanitario

Dott. Nazzareno Pacifico

Il Commissario Straordinario

Dott.ssa Graziella Pintus

Dir.San.Dott.ssa MS

M.



CAGLIARI, 02/02/2015

PROT. PG/2015/1818

ALLEGATO N° 02 AL VERBALE N.2
della Riunione del 28 gennaio 2015
COMITATO ETICO AZIENDA OSPEDALIERO UNIVERSITARIA DI CAGLIARI
*Comitato Etico Indipendente istituito con delibera N° 753 del 24/09/2013 della Direzione Generale della
Azienda Ospedaliero Universitaria di Cagliari*

Il giorno 28 gennaio 2015 alle ore 15,00 presso l'Aula della Direzione Medica al 2° piano del P.O. San Giovanni di Dio si è riunito il Comitato Etico Indipendente dell'Azienda Ospedaliero Universitaria di Cagliari per esprimere il proprio parere etico motivato sulla richiesta di cui al punto 2.2 dell'ordine del giorno dal titolo:

Esame del progetto di ricerca dal titolo: **Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia**

Responsabile della U.O.: **Dott. Pier Paolo Pusceddu**

Responsabile della Sperimentazione: **Dott. Pier Paolo Pusceddu**

Responsabile scientifica: **Prof.ssa Irene Messina Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente Sezione Biomedica Università di Cagliari, Dott.ssa Elisabetta Pisano Dipartimento di Scienze Chirurgiche Università di Cagliari.**

Centro di Sperimentazione: **Diabetologia Pediatrica**

Struttura di appartenenza: **AOB**

Verificata

la presenza del numero legale in relazione a n.14 componenti effettivi, con n.10 presenti, n.02 assenti giustificati (Prof.ssa Maria Del Zompo e Dott. Francesco Ronchi), n.02 assenti non giustificati (Dott.ssa Francesca Ibba e Dott. Sandro Loche); per i **Direttori Sanitari** presente la Dott.ssa Marinella Spissu quale sostituto permanente del Direttore Sanitario AOB di Cagliari ed assente non giustificato il Direttore Sanitario della ASL8 Dott. Ugo Storelli; per gli **esperti** sono presenti il Prof. Carlo Carcassi esperto in genetica e il Dott. Paolo Pintus esperto in nutrizione

Valutati i seguenti documenti:

- ❖ Lettera di richiesta di approvazione del progetto di ricerca indirizzata al Presidente del C.E e al Direttore Sanitario del 21/11/2014 ns prot 2014/19905 del 02/12/2014
- ❖ Parere tecnico-sanitario favorevole alla sperimentazione del Direttore Dott. Remigio Puddu
- ❖ Protocollo versione 1 del 21/11/2014
- ❖ Foglio informativo e modulo di consenso informato per i genitori (paziente) versione 1 del 21/11/2014
- ❖ Foglio informativo e modulo di consenso informato per i genitori (controllo) versione 1 del 21/11/2014
- ❖ Modulo di assenso per soggetti di età tra i 5 - 10 anni versione 1 del 05/12/2014
- ❖ Modulo di assenso per soggetti di età tra i 11-16 anni versione 1 del 05/12/2014
- ❖ Curriculum vitae Dott. Pusceddu aggiornato al 26/11/2014

VERIFICATA

- a) l'adeguatezza delle motivazioni e le ipotesi della ricerca
- b) l'adeguatezza delle attese dello studio
- c) la correttezza dei criteri di analisi e di interpretazione dei risultati



- d) la proposta di analisi statistiche appropriate
- e) la trasparenza delle sponsorizzazioni ed i relativi aspetti economici
- f) la proprietà dei dati e la trasparenza dei risultati
- g) il rispetto dei diritti dei partecipanti alla ricerca per quanto concerne le informazioni sullo studio
- h) l'adeguatezza della tutela della privacy
- i) la possibilità di individuare un comitato scientifico che abbia la responsabilità della gestione/conduzione dello studio

CONSTATATO CHE

fa riferimento ai codici deontologici (in particolare alla revisione corrente della Dichiarazione di Helsinki e/o alle norme di Buona Pratica Clinica CEE secondo l'allegato 1 del DM 27/4/1992 e/o al DM 18/3/1998 e seguenti)

APPROVA
la richiesta in oggetto

Si precisa che la Dott.ssa Elisabetta Pisano che ha illustrato la sperimentazione è uscita dall'aula al momento della votazione.

La valutazione scientifica dello studio è stata espletata dalla Dott.ssa Caterina Chillotti

Si ricorda che lo sperimentatore è obbligato ad informare il CE sull'andamento della sperimentazione ogni sei mesi, con relazione scritta riportante il numero dei casi arruolati tramite compilazione dell'Allegato L della modulistica di questo CE (rapporto sullo stato di avanzamento D.M. 15 Luglio 1997). Lo Sperimentatore è inoltre tenuto ad informare lo scrivente CE dell'inizio e della conclusione della sperimentazione.

Il parere sopra espresso s'intende limitato esclusivamente alle versioni citate in oggetto ed alla documentazione presentata ed espressamente citata. Ogni variazione allo stesso deve obbligatoriamente essere sottoposta al parere di questo CE, così come previsto dalle vigenti norme nazionali ed europee. Tutte le segnalazioni relative ad eventi avversi seri e inattesi, la conclusione dello studio ed ogni eventuale sua integrazione dovranno essere comunicati allo scrivente CE. ***Lo studio potrà essere intrapreso solo a seguito della autorizzazione del Direttore Generale formalizzato da apposito atto deliberativo.** I farmaci per la sperimentazione dovranno essere consegnati esclusivamente per il tramite del Servizio di Farmacia dell'Azienda ospedaliera. Lo sperimentatore è tenuto ad interpellare in qualsiasi momento il CE ogni qual volta si renda necessaria una nuova valutazione etica.

***"Si attesta che questo Comitato Etico è organizzato ed opera in conformità alla normativa vigente in Italia in materia di GCP-ICH, in osservanza a quanto previsto dall'allegato del D.M. 15/07/1997, dal D.M. 18/03/1998 e dal D.L. n. 211/2003" (Recepimento delle linee guida dell'Unione Europea di buona pratica clinica per l'esecuzione delle sperimentazioni cliniche dei medicinali), nonché della Legge n. 189 del 08/11/2012 e del D.M. della Salute 08/02/2013.**
Si allega lista dei presenti e assenti e delle relative funzioni.

Il Presidente
Prof. Ernesto d'Aloja



FOGLIO FIRME PRESENZE RIUNIONE COMITATO ETICO
 28 gennaio 2015

2.2) alle ore 15,25

Esame dello studio dal titolo: Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia

Responsabile della U.O.: Dott. Pier Paolo Pusceddu

Responsabile della Sperimentazione: Dott. Pier Paolo Pusceddu

Centro di Sperimentazione: Diabetologia Pediatrica

Struttura di appartenenza: AOB

PARERE:

di approvazione

COMPONENTI EFFETTIVI DEL COMITATO ETICO

Nominativo	Qualifica	Firma
Prof. Ernesto d'Aloja	Presidente: Esperto in materia giuridica e assicurativa o un medico legale	[Firma]
Dott. Pietro Greco	Vicepresidente: Clinico	[Firma]
Dott. Francesco Scarpa	Medico di medicina generale	[Firma]
Dott.ssa Luisa Cossu Giua	Rappresentante del volontariato o dell'associazionismo di tutela dei pazienti	[Firma]
Prof.ssa Maria Del Zompo	Farmacologo	assente giustificato
Dott.ssa Maria Teresa Galdieri	Farmacista del SSN	[Firma]
Dott.ssa Francesca Ibba	Rappresentante dell'area delle professioni sanitarie interessata alle sperimentazioni	assente
Dott. Sandro Lochè	Clinico	assente
Dott. Giuseppe Ortu	Direttore Sanitario AOU Cagliari facente funzioni	assente giustificato
Dott. Luigi Minerba	Biostatistico	[Firma]
Dott. Salvatore Pisu	Esperto in bioetica	[Firma]
Dott. Pier Paolo Pusceddu	Pediatra	è uscito in quanto coperto
Dott. Francesco Ronchi	Esperto di dispositivi medici	assente giustificato
Dott. Tonio Sollai	Clinico	[Firma]
DIRETTORI SANITARI		
Dott.ssa Marinella Spissu	Sostituto permanente Direttore Sanitario AOB di Cagliari (in relazione agli studi svolti nella AOB)	[Firma]
Dott. Ugo Storelli	Direttore Sanitario ASL8 di Cagliari	assente
ESPERTI		
Prof. Carlo Carcassi	Esperto in genetica in relazione allo studio di genetica	assente giustificato
Dott. Paolo Pintus	Esperto in nutrizione in relazione allo studio di prodotti alimentari sull'uomo	assente giustificato
Segreteria Scientifica C.E.I.	Dott.ssa Caterina Chillotti - Farmacologa	[Firma]
Segretario verbalizzante	Dott.ssa Sabrina Chabert	[Firma]



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA
AZIENDA OSPEDALIERA BROTZU

**AREA MEDICINA INTERNA
S.C. di PEDIATRIA**

Prot. n. 102/14

Dott ssa Marinella Spissu
Direttore Sanitario
Azienda Ospedaliera Brotzu
Cagliari

Prof. Ernesto D'Aloia
Presidente Comitato Etico
Azienda Ospedaliero-Universitaria
Cagliari

Cagliari, 21/11/2014

Oggetto: Richiesta approvazione studio

Il sottoscritto Dott. Pier Paolo Pusceddu, Direttore della Struttura Complessa di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera Brotzu, chiede cortesemente alla S.V. di voler portare all'attenzione del Comitato Etico da lei presieduto il progetto di ricerca dal titolo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia".

Il Responsabile clinico dello studio sarà il sottoscritto che condurrà lo studio in collaborazione con la Prof.ssa Irene Messina del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione Biomedica dell'Università di Cagliari in qualità di responsabile scientifico e della Dott.ssa Elisabetta Pisano ricercatore del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università di Cagliari.

Lo studio in oggetto di valutazione etico-scientifica è mirato ad evidenziare differenze statisticamente significative nel pattern secretorio salivare di un gruppo di 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia di età compresa tra 5 e 16 anni, rispetto a 50 soggetti affetti da diabete di tipo 1 e un egual numero di soggetti sani di pari età e sesso. Studi precedenti hanno infatti evidenziato l'esistenza di differenze significative nella frazione solubile in acido della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e il presente progetto di ricerca è indirizzato a evidenziare se la coesistenza del diabete di tipo 1 e della celiachia determini variazioni statisticamente



significative nell'espressione di specifiche proteine della saliva rispetto ai soggetti diabetici e ai soggetti sani. In questo modo potrebbero essere evidenziati dei biomarcatori salivari delle complicanze legate alle patologie.

L'ospedalizzazione dei pazienti non è richiesta e i benefici della ricerca sono proporzionati agli impegni organizzativi ed economici richiesti dalla sperimentazione.

Il sottoscritto dichiara sotto la propria responsabilità:

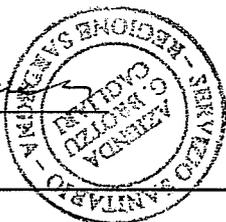
1. Che non esistono oneri accessori;
2. Che il personale è competente, i locali e le attrezzature sono idonei;
3. Che verranno segnalati entro 5 giorni il termine, la sospensione e la rinuncia allo studio;
4. Che verrà inviata, appena disponibile, copia della relazione finale e della pertinente pubblicazione.

Si precisa che lo studio è un progetto di ricerca spontaneo e non ha sponsor né privati né istituzionali.

Ringraziando per l'attenzione, porgo i miei cordiali saluti.

Il Responsabile clinico dello Studio

Paolo Pusceddu



Il Direttore Sanitario

**PARERE TECNICO-SANITARIO
FAVOREVOLE**
IL DIRETTORE
Dott. Remigio C. Puddu

Allegati:

1. Protocollo versione n° 1 del 21/11/2014
2. Consenso informato per la partecipazione ad un progetto di ricerca e foglio informativo per i genitori del donatore versione n° 1 del 21/11/2014



CONSENSO INFORMATO PER LA PARTECIPAZIONE AD UN PROGETTO DI RICERCA E FOGLIO INFORMATIVO PER IL SOGGETTO

Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia.

Gentile Genitore,

Le viene proposto di dare l'autorizzazione alla partecipazione di suo figlio/a ad uno studio che ha per titolo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia". Lo studio prevede l'esecuzione di un prelievo non invasivo di saliva, necessario per la realizzazione dello studio stesso. Non è prevista la somministrazione di nessun farmaco.

Prima di decidere se far partecipare o meno suo figlio/a è importante che Lei comprenda bene perché viene svolto lo studio e che cosa comporta. La preghiamo, pertanto, di voler dedicare un pò del Suo tempo per leggere con attenzione le informazioni che Le verranno date di seguito e a discuterle con altre persone, se lo riterrà opportuno. Chieda agli sperimentatori di questo studio se qualcosa non Le è chiaro o se desidera ulteriori informazioni. Prenda tutto il tempo necessario per decidere se partecipare o no allo studio. Gli sperimentatori La ringraziano per la disponibilità a leggere queste informazioni.

Lo scopo dello studio

Lo scopo dello studio sarà quello di valutare eventuali variazioni qualitative e quantitative della composizione proteica salivare in soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto sia a soggetti affetti da diabete di tipo 1 che a soggetti sani di pari età e sesso al fine di evidenziare dei possibili biomarcatori delle complicanze legate alle patologie. Per questo verrà effettuato uno studio su campioni di saliva prelevati da bambini/ragazzi di età compresa tra 5 e 16 anni.



I prelievi di saliva verranno effettuati in modalità assolutamente non invasiva e solo se il bambino/ragazzo sarà collaborante. Tale studio consentirà di stabilire differenze statisticamente significative nel profilo proteico della saliva umana tra soggetti affetti da entrambe le patologie rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani. I risultati di questa ricerca potranno fornire un valido supporto per chiarire le funzioni di specifiche proteine ancora poco caratterizzate all'interno del cavo orale.

Perché suo figlio/a è stato selezionato/a per questa proposta?

Suo figlio/a è stato/a selezionato/a per questa proposta perché risponde ai criteri di inclusione dello studio e non presenta criteri di esclusione dallo stesso.

Criteri di inclusione nel gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia:

1. Età compresa tra 5 e 16 anni, di entrambi i sessi.
2. Diagnosi accertata di diabete di tipo 1 e celiachia da almeno 1 anno.
3. Consenso informato scritto da parte dei genitori.

Criteri di inclusione nel gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1:

1. Età compresa tra 5 e 16 anni, di entrambi i sessi.
2. Diagnosi accertata di diabete di tipo 1 da almeno 1 anno.
3. Consenso informato scritto da parte dei genitori.

Criteri di esclusione:

1. Patologie diverse da quelle di interesse per lo studio.
2. Incapacità o rifiuto a seguire le procedure dello studio

Cosa prevede lo studio?



Lo studio prevede esclusivamente un prelievo di saliva, che verrà effettuato la mattina dall'analizzatore, ovvero, quando possibile, direttamente dal bambino/ragazzo.

Procedura

I campioni di saliva saranno raccolti da soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia e da soggetti affetti da diabete di tipo 1 di età compresa tra 5 e 16 anni a digiuno, di mattina tra le ore 8.00 e le 11.00.

Il prelievo di saliva verrà effettuato dall'analizzatore con micro pipette monouso e sterili solo su soggetti collaboranti, o autonomamente dal bambino/ragazzo.

I campioni saranno raccolti e trattati secondo protocolli riportati in letteratura. Il volume di saliva raccolto (poche gocce, 500 µL circa) sarà miscelato in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) 0.2%. La soluzione ottenuta verrà successivamente centrifugata ad una velocità di 14000g per 15 minuti e il sopranatante e il precipitato così ottenuti saranno conservati separatamente a -80°C per essere successivamente analizzati. Il sopranatante sarà analizzato mediante un approccio HPLC-ESI-MS mentre il precipitato sarà solubilizzato e sottoposto ad elettroforesi bidimensionale per la separazione e quantificazione delle proteine.

L'aggiunta di una soluzione acida al campione di saliva inibisce la gran parte delle proteasi presenti naturalmente nel fluido biologico, in modo da evitare modificazioni a carico dei peptidi/proteine presenti.

Cosa succederà al campione biologico una volta terminato lo studio

Il campione biologico verrà totalmente utilizzato per le analisi e non sarà conservato.

Benefici

Suo figlio/a non avrà dei benefici diretti dallo studio, ma la sua partecipazione sarà utile per verificare la presenza di differenze significative nella composizione proteica della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani al fine di evidenziare eventuali biomarcatori di complicanze associate alle patologie.



Rischi

La procedura di prelievo non comporta nessun rischio per il soggetto, poiché la raccolta della saliva viene effettuata con una pipetta di plastica morbida monouso e sterile.

Risultati dello Studio e riservatezza delle informazioni raccolte

Il presente studio sarà condotto nel rispetto del totale anonimato secondo il DL 196/2003.

L'anonimizzazione dei dati personali di suo figlio/a verrà effettuata mediante il sistema della codifica singola che prevede l'assegnazione di un codice numerico al campione biologico (saliva). Lo stesso codice numerico verrà utilizzato per registrare i dati demografici e quelli relativi alle informazioni demografiche di suo figlio/a.

Il nome di suo figlio/a e qualunque altra informazione che leghi l'identità di suo figlio/a al campione di biologico (e alle informazioni demografiche raccolte) saranno tenuti separati. La corrispondenza tra il codice numerico e l'identità di suo/a figlio/a sarà conosciuta soltanto dal medico referente della S.C. Pediatria. L'utilizzo di un codice numerico non permette che persone diverse dal medico referente che conduce la ricerca possano associare il nome di suo figlio/a al campione biologico.

Durante la presentazione di questo studio o la pubblicazione dei risultati ottenuti non verrà reso noto nessuno dei dati personali, o qualunque altro dato che possa far risalire alla identità di suo figlio/a.

Titolare del trattamento dei dati così detti sensibili di suo figlio/a, ai sensi del Decreto Legislativo 196 del 30 Giugno 2003, è il Dipartimento di Medicina Interna dell'AOB dove verranno effettuati i prelievi di saliva.

Al termine dello studio, Lei potrà essere informato, se lo vorrà, circa i risultati generali dello studio. Questo non accadrà subito al termine dello studio, in quanto occorrerà attendere l'analisi dei risultati.

Se decide di far partecipare suo figlio/a a questo studio, Le verrà consegnata una copia di questo foglio informativo e del relativo modulo di consenso da Lei firmato.



Per qualunque domanda riguardo lo studio può contattare il Medico sperimentatore Dott Pierpaolo Pusceddu, al seguente recapito telefonico 070 539553.

Se deciderà di far partecipare allo studio suo figlio/a, completi e firmi l'allegato modulo di consenso. La Sua firma indica che uno degli sperimentatori La ha informata su tutti gli aspetti dello studio e che è Sua volontà far partecipare allo studio suo figlio/a.

Gli sperimentatori desiderano anche informarla che lo studio è stato notificato e approvato dal Comitato Etico dell' Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari.

Lo studio riguarderà **ESCLUSIVAMENTE** l'analisi delle proteine presenti nella saliva.

Non verrà eseguita nessuna procedura di estrazione del DNA sul campione.

La partecipazione di suo/a figlio/a a questo studio è libera e volontaria.

Se accetta di far partecipare allo studio suo/a figlio/a potrà comunque ritirarlo/a in qualunque momento senza dare alcuna spiegazione.

Le verrà rilasciata una copia del consenso.

CHI POSSO CONTATTARE IN CASO DI DOMANDE O PROBLEMI?

La invitiamo a porre qualsiasi domanda che Lei ritenga opportuna al Medico Responsabile dello studio che Le spiegherà in dettaglio ogni parte del progetto di ricerca proposto.

Il medico Le chiederà anche di firmare e datare il modulo di Consenso informato allegato a questo documento per confermare che Lei abbia letto le informazioni qui contenute e compreso lo scopo della ricerca.

Se desiderasse ulteriori informazioni su tale ricerca può contattare una delle persone di seguito indicate che saranno liete di fornirLe qualsiasi chiarimento.

Per qualunque domanda riguardo lo studio può contattare il Medico sperimentatore Dott. Pierpaolo Pusceddu al seguente recapito telefonico 070-539553.



DICHIARAZIONE DI CONSENSO

Dopo aver letto le informazioni sul progetto di ricerca e sull' articolo 13 del DL 196/2003 sul trattamento dei dati personali, e dopo un approfondito colloquio con il personale medico:

- Ho letto e capito le informazioni contenute in questo consenso.
- Ho avuto la possibilità di fare domande e ritengo che tutte le mie domande abbiano avuto risposta.
- So che donare un campione per questo studio è una mia scelta.
- Mi è stata data una copia di questo consenso.
- So che potrò far ritirare mio figlio/a dallo studio in qualunque momento e che da questa mia decisione mio figlio/a non riceverà alcuna penalizzazione.
- Sono a conoscenza del fatto che i risultati derivati dallo studio mi verranno resi noti a richiesta.
- Io accetto di far partecipare volontariamente mio figlio/a a questo studio per donare un campione di saliva che verrà analizzato.

Vorrei ricevere notizie contenenti informazioni generali sullo studio: Si [] / No []

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Nome per esteso del donatore data di nascita.....

Firma dello sperimentatore che ha informato i genitori del donatore

Nome per esteso

Paolo Pusceddu



REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA
AZIENDA OSPEDALIERA BROTZU

AREA MEDICINA INTERNA
S.C. di PEDIATRIA

Prot. n. 102/14

Dott ssa Marinella Spissu
Direttore Sanitario
Azienda Ospedaliera Brotzu
Cagliari

Prof. Ernesto D'Aloia
Presidente Comitato Etico
Azienda Ospedaliero-Universitaria
Cagliari

Cagliari, 21/11/2014

Oggetto: Richiesta approvazione studio

Il sottoscritto Dott. Pier Paolo Pusceddu, Direttore della Struttura Complessa di Pediatria dell'Azienda Ospedaliera Brotzu, chiede cortesemente alla S.V. di voler portare all'attenzione del Comitato Etico da lei presieduto il progetto di ricerca dal titolo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia".

Il Responsabile clinico dello studio sarà il sottoscritto che condurrà lo studio in collaborazione con la Prof.ssa Irene Messana del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Sezione Biomedica dell'Università di Cagliari in qualità di responsabile scientifico e della Dott.ssa Elisabetta Pisano ricercatore del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università di Cagliari.

Lo studio in oggetto di valutazione etico-scientifica è mirato ad evidenziare differenze statisticamente significative nel pattern secretorio salivare di un gruppo di 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia di età compresa tra 5 e 16 anni, rispetto a 50 soggetti affetti da diabete di tipo 1 e un egual numero di soggetti sani di pari età e sesso. Studi precedenti hanno infatti evidenziato l'esistenza di differenze significative nella frazione solubile in acido della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e il presente progetto di ricerca è indirizzato a evidenziare se la coesistenza del diabete di tipo 1 e della celiachia determini variazioni statisticamente



significative nell'espressione di specifiche proteine della saliva rispetto ai soggetti diabetici e ai soggetti sani. In questo modo potrebbero essere evidenziati dei biomarcatori salivari delle complicanze legate alle patologie.

L'ospedalizzazione dei pazienti non è richiesta e i benefici della ricerca sono proporzionati agli impegni organizzativi ed economici richiesti dalla sperimentazione.

Il sottoscritto dichiara sotto la propria responsabilità:

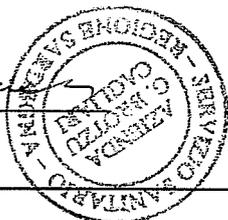
1. Che non esistono oneri accessori;
2. Che il personale è competente, i locali e le attrezzature sono idonei;
3. Che verranno segnalati entro 5 giorni il termine, la sospensione e la rinuncia allo studio;
4. Che verrà inviata, appena disponibile, copia della relazione finale e della pertinente pubblicazione.

Si precisa che lo studio è un progetto di ricerca spontaneo e non ha sponsor né privati né istituzionali.

Ringraziando per l'attenzione, porgo i miei cordiali saluti.

Il Responsabile clinico dello Studio

Paolo Pusceddu



Il Direttore Sanitario

Remigio C. Puddu
**PARERE TECNICO-SANITARIO
FAVOREVOLE**
IL DIRETTORE
Dott. Remigio C. Puddu

Allegati:

1. Protocollo versione n° 1 del 21/11/2014
2. Consenso informato per la partecipazione ad un progetto di ricerca e foglio informativo per i genitori del donatore versione n° 1 del 21/11/2014



Progetto di ricerca: Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia

Il suddetto studio non è sponsorizzato da nessun ente o casa farmaceutica, pertanto non verranno utilizzati, sperimentati o iniettati farmaci o altre sostanze.

Razionale dello studio

Numerosi studi proteomici condotti sulla saliva di soggetti affetti da diverse patologie hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto a soggetti sani (11-15), in particolare sono state evidenziate numerose differenze nella composizione proteica della frazione solubile in acido della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 (16). In questo studio vogliamo evidenziare le differenze nella composizione proteica della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto a soggetti sani, sia a livello della frazione solubile in acido che di quella insolubile, in modo da caratterizzare l'intero proteoma salivare al fine di evidenziare differenze significative tra le tre classi di campioni.

Introduzione

Da diversi anni la secrezione salivare si è imposta all'attenzione dei laboratori di analisi cliniche in quanto, nonostante la sua variabilità, questo liquido biologico può rispecchiare in modo sufficientemente affidabile il quadro di alcune situazioni patologiche acute e cronicizzate. Il fluido orale costituisce una interessante fonte potenziale di importanti informazioni biochimiche e bio-metaboliche anche per il fatto che costituisce un campione facilmente ottenibile con tecniche non invasive. Esso risulta molto semplice da prelevare in condizioni basali, il che lo rende ideale per indagini conoscitive a riguardo dello sviluppo organico soprattutto durante l'età pediatrica.

In studi precedenti il nostro gruppo ha dato un contributo alla caratterizzazione del proteoma della saliva intera (1-7) che comprende proteine e peptidi derivanti dalle ghiandole salivari



maggiori e minori, dal fluido crevicolare gengivale, dalla flora orale e dalle cellule di sfaldamento della mucosa.

Attraverso un approccio HPLC-ESI-MS sono state caratterizzate proteine e peptidi, presenti nella frazione solubile in acido, specifici della saliva e appartenenti alle famiglie delle proteine ricche in prolina (PRP) acide e basiche, istatine, cistatine e staterina, nonché tutta una serie di loro prodotti di modificazione post-traduzionale originati prima, durante e dopo la secrezione. Lo stesso approccio analitico ha consentito di evidenziare e quantificare altri peptidi non specifici della saliva tra cui le beta-timosine, le alfa-defensine e alcune proteine della famiglia delle S100 (8-10).

Attraverso l'utilizzo dell'elettroforesi bidimensionale è possibile analizzare la frazione insolubile in acido della saliva procedendo con una isoelettrofocalizzazione come prima dimensione e con un'analisi SDS-PAGE come seconda dimensione. L'uso delle due tecniche ortogonali, che sfruttano per la separazione differenze di punto isoelettrico la prima e di peso molecolare la seconda consentendo di ottenere risoluzioni molto elevate, permette la separazione di un elevato numero di proteine. L'analisi dei gel bidimensionali opportunamente rivelati con coloranti sensibili può consentire di evidenziare differenze quantitative significative per specifiche proteine tra i diversi gruppi di soggetti, e le proteine differenzialmente espresse possono essere identificate mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione dopo tripsinizzazione in gel.

Scopo

Questo studio si propone di evidenziare la presenza di differenze statisticamente significative nella composizione proteica della saliva (sia nella frazione solubile in acido che nella frazione insolubile in acido) tra soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, soggetti affetti da diabete di tipo 1 e soggetti sani di pari età e sesso. In un precedente studio in cui è stata analizzata la composizione proteica della frazione della saliva solubile in acido di soggetti affetti da diabete di tipo 1 è stata evidenziata una concentrazione inferiore di staterina, del peptide P-B, P-C e di istatina nei soggetti affetti da diabete di tipo 1 rispetto ai soggetti sani, e concentrazioni aumentate delle α -defensine 1, 2 e 4 e della proteina S100A9. L'analisi di campioni di soggetti affetti da celiachia e da diabete di tipo 1 potrebbe rivelare differenze significative per altre



proteine che non hanno mostrato significatività nei pazienti affetti dal solo diabete di tipo 1. Inoltre dai campioni di saliva raccolti in questo studio verrà analizzata anche la frazione insolubile in acido e questa analisi permetterà di ottenere informazioni complementari rispetto a quelle ottenute dall'analisi della frazione solubile in acido, in modo da evidenziare differenze significative sull'intero proteoma salivare tra le tre classi di soggetti. Dati preliminari in questa direzione hanno mostrato che diverse proteine della classe delle S100 (S100A7, S100A8, l'isoforma fosforilata e ossidata dell'S100A9, S100A11) risultano più rappresentate nella frazione insolubile in acido dei controlli sani rispetto ai pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia.

Obiettivi

L'obiettivo dello studio è quello di evidenziare differenze qualitative e quantitative nel contenuto proteico e peptidico della saliva, sia a livello della frazione solubile in acido che di quella insolubile in acido, tra soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, soggetti affetti da diabete di tipo 1 e soggetti sani di pari età e sesso al fine di evidenziare possibili biomarcatori delle complicanze legate alle patologie.

Metodi

I campioni di saliva saranno raccolti da 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia e da 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 con età compresa tra 5 e 16 anni che afferiscono per le proprie patologie al reparto di pediatria dell'A.O.B, durante un periodo di 12 mesi.

Criteri di inclusione al gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia: età dei soggetti compresa tra 5 e 16 anni, diagnosi accertata di diabete di tipo 1 e celiachia da almeno 1 anno, consenso informato scritto da parte dei genitori e assenso.

Criteri di inclusione al gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1: età dei soggetti compresa tra 5 e 16 anni, diagnosi accertata di diabete di tipo 1 da almeno 1 anno, consenso informato scritto da parte dei genitori e assenso.

Criteri di esclusione: patologie diverse da quelle di interesse per lo studio, e incapacità o rifiuto a seguire le procedure dello studio.



I campioni saranno trattati secondo protocolli riportati in letteratura (1-3).

Tutti i campioni di saliva saranno raccolti a digiuno tra le ore 8.00 e le 11.00.

Il prelievo di saliva verrà effettuato dall'analizzatore o autonomamente dal bambino/ragazzo con micro pipette monouso sterili, esclusivamente su soggetti collaboranti.

Il volume di saliva raccolto (500 µl circa) sarà miscelato in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) 0.2%. La soluzione ottenuta verrà quindi centrifugata ad una velocità di 14000 g per 15 minuti, separando il supernatante (frazione solubile in acido) dal precipitato (frazione insolubile in acido). Entrambe le frazioni ottenute saranno congelate a -80°C e trasportate presso i laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, dove verranno condotte le analisi. In particolare la frazione solubile in acido sarà analizzata attraverso un approccio HPLC-ESI-MS. Dai profili cromatografici verranno estratti i picchi di corrente ionica di circa 140 peptidi e proteine e loro derivati, e dalla misura dell'area del picco di corrente ionica estratta (XIC) specifico di ciascun analista verrà determinata la concentrazione relativa nel campione. La frazione insolubile in acido verrà solubilizzata per essere analizzata mediante elettroforesi bidimensionale, procedendo con una isoelettrofocalizzazione come prima dimensione e quindi con un'analisi SDS-PAGE come seconda dimensione. Sarà così possibile confrontare qualitativamente e quantitativamente i campioni ottenuti dai soggetti sani e dai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, al fine di evidenziare proteine e peptidi che siano presenti in quantitativi diversi (sopra espresse o sotto espresse) nei tre gruppi, e che potrebbero essere utilizzati come biomarcatori salivari di complicanze associate alle patologie.

Analisi dei dati

L'analisi statistica dei dati sperimentali ottenuti sulla frazione solubile in acido mediante analisi HPLC-ESI-MS relativi alle aree dei picchi verrà effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism (versione 4.0). Per l'area del picco XIC di ciascun analita verranno calcolati: intervalli, mediane, medie, deviazioni standard ed errori standard. L'analisi delle immagini dei gel ottenuti mediante elettroforesi bidimensionale sulle frazioni insolubili in acido verrà effettuata mediante il software SameSpots grazie al quale verranno quantificate le intensità dei diversi spot in modo da poter



valutare le differenze statisticamente significative tra pazienti diabetici e celiaci, pazienti diabetici e soggetti sani.

Considerazioni regolatorie ed etiche

Approvazione Autorità regolatorie

Questo studio sarà condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e previa approvazione del Comitato Etico Indipendente della AOU di Cagliari.

Approvazione del Comitato Etico

Il Comitato Etico dovrà analizzare ed approvare il consenso informato per il soggetto e qualunque altra informazione scritta per il soggetto.

Se durante lo studio si renderà necessario apportare degli emendamenti al protocollo, al consenso informato o ad altri documenti, lo sperimentatore dovrà accertarsi che il Comitato Etico abbia approvato gli emendamenti prima di istituire le modificazioni al protocollo.

In caso di emendamento del consenso informato l'approvazione del Comitato Etico dovrà essere ottenuta prima di includere altri soggetti nello studio.

Consenso informato

Lo sperimentatore dovrà provvedere ad informare il paziente/soggetto su ogni aspetto inerente la sua partecipazione allo studio. L'acquisizione del consenso informato dovrà svolgersi secondo le modalità previste e richieste dal Comitato Etico.

Lo sperimentatore e il paziente/soggetto dovranno entrambi firmare il modulo di consenso informato completo della data, prima dell'arruolamento nello studio.

Il paziente/soggetto riceverà una copia del consenso informato mentre l'originale sarà allegato al resto della documentazione dello studio. La decisione di aderire allo studio da parte del paziente/soggetto è completamente volontaria. Lo sperimentatore dovrà far presente in maniera chiara al paziente/soggetto che potrà ritirare il proprio consenso in qualunque momento dello



studio senza alcun pregiudizio. Qualora il modulo di consenso informato dovesse essere emendato in corso di studio lo sperimentatore dovrà attenersi alle modifiche apportate dagli organismi regolatori ed utilizzare il modulo emendato anche per i pazienti/soggetti già arruolati.

Doveri del medico sperimentatore

Il medico sperimentatore dovrà assicurarsi che tutto il personale coinvolto nello studio sia qualificato e adeguatamente istruito circa le procedure dello studio medesimo.

Registrazione dei dati

Il medico sperimentatore dovrà assicurarsi che tutti i dati riportati nella CRF corrispondano fedelmente al profilo del soggetto e a tutte le notizie specificamente richieste dal protocollo.

Riservatezza dei dati

In ottemperanza alle disposizioni legislative vigenti relative alla tutela delle persone rispetto al trattamento dei dati personali (art 13 del DL 196/2003) i risultati relativi a questo studio potranno essere oggetto di pubblicazione scientifica fermo restando l'anonimato dei soggetti partecipanti.

Proprietà intellettuale

Qualsiasi scoperta, dato e conoscenza scaturiti da questo studio saranno di proprietà del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari e la Prof.ssa Irene Messina sarà il responsabile scientifico coadiuvata dalla Dott.ssa Elisabetta Pisano Ricercatore del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università di Cagliari e del Dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale Brotzu - Cagliari ed il responsabile clinico sarà il Dott. Pierpaolo Pusceddu, Direttore della S.C. Pediatria.

Pubblicazione dei dati



Uno scopo dello studio, in accordo alla buona pratica di ricerca, è quello di pubblicare i risultati ottenuti in riviste scientifiche, sia nazionali che internazionali, e di divulgare questi dati in convegni nazionali o internazionali.

Fondi

Lo studio è un progetto di ricerca spontanea. Le spese per la realizzazione del progetto sono a carico del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari.

Bibliografia

1) A. Lupi, I. Messina, G. Denotti, M.E. Schininà, G. Gambarini, M.B. Fadda, A. Vitali, T. Cabras, V. Piras, M. Patamia, M. Cordaro, B. Giardina, M. Castagnola.

“Identification of the human salivary cystatin complex by the coupling of high-performance liquid chromatography and ion-trap mass spectrometry.”

Proteomics 3, 461-467 (2003).

2) I. Messina, T. Cabras, R. Inzitari, A. Lupi, C. Zuppi, C. Olmi, M.B. Fadda, M. Cordaro, B. Giardina, M. Castagnola.

“Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach.”

J. Proteome Res. 3, 792-800 (2004).

3) M. Castagnola, R. Inzitari, D.V. Rossetti, C. Olmi, T. Cabras, V. Piras, P. Nicolussi, M.T. Sanna, M. Pellegrini, B. Giardina, I. Messina

“A cascade of 24 histatins (histatin 3 fragments) in human saliva: suggestions for a pre-secretory sequential cleavage pathway.”

J. Biol. Chem. 279, 41436-41443 (2004).

4) R. Inzitari, T. Cabras, G. Onnis, C. Olmi, A. Mastinu, M.T. Sanna, M. Pellegrini, M. Castagnola, I. Messina

“Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins.”

Proteomics 5, 805-815 (2005).

5) Pisano E, Cabras T, Montaldo C, Piras V, Inzitari R, Olmi C, Castagnola M, Messina I.

“Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS”

Eur J Oral Sci. Dec 13, 462-468 (2005).



6) Inzitari R, Cabras T, Rossetti DV, Fanali C, Vitali A, Pellegrini M, Paludetti G, Manni A, Giardina B, Messana I, Castagnola M.

“Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives”
Proteomics 6, 6370-6379 (2006).

7) Messana I, Cabras T, Pisano E, Sanna MT, Olianias A, Manconi B, Pellegrini M, Paludetti G, Scarano E, Fiorita A, Agostino S, Contucci AM, Calò L, Picciotti PM, Manni A, Bennick A, Vitali A, Fanali C, Inzitari R, Castagnola M

“Trafficking and post-secretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides. A proteomic approach”
Mol Cell Proteomics 7, 911-926 (2008).

8) Inzitari R, Cabras T, Pisano E, Fanali C, Manconi B, Scarano E, Fiorita A, Paludetti G, Manni A, Nemolato S, Faa G, Castagnola M, Messana I.

“HPLC-ESI-MS analysis of oral human fluids reveals that gingival crevicular fluid is the main source of oral thymosins beta(4) and beta(10)”
J Sep Sci. 32, 57-63 (2009).

9) Nemolato S, Messana I, Cabras T, Manconi B, Inzitari R, Fanali C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Riva A, Fanni D, Di Felice E, Faa G, Castagnola M.

“Thymosin beta(4) and beta(10) levels in pre-term newborn oral cavity and foetal salivary glands evidence a switch of secretion during foetal development”
PLoS One. 4, e5109 (2009).

10) Castagnola M, Inzitari R, Fanali C, Iavarone F, Vitali A, Desiderio C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Cabras T, Manconi B, Sanna MT, Boi R, Pisano E, Olianias A, Pellegrini M, Nemolato S, Heizmann CW, Faa G, Messana I.

“The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn”
Mol Cell Proteomics. 10(1):M110.003467 (2011).

11) Castagnola M, Messana I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Morelli A, Pecoraro AM, Neri G, Torrioli MG, Gurrieri F.

“Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders”
J Proteome Res. 7, 5327-5332 (2008).

12) Fanali C, Inzitari R, Cabras T, Pisano E, Castagnola M, Celletti R, Manni A, Messana I.

“alpha-Defensin levels in whole saliva of totally edentulous subjects”
Int J Immunopathol Pharmacol. 21, 845-849 (2008).



- 13) Contucci AM, Inzitari R, Agostino S, Vitali A, Fiorita A, Cabras T, Scarano E, Messina I
"Statherin levels in saliva of patients with precancerous and cancerous lesions of the oral cavity: a preliminary report"
Oral Dis. 11, 95-99 (2005).
- 14) G. Peluso, M. De Santis, R. Inzitari, C. Fanali, T. Cabras, I. Messina, M. Castagnola, F.F. Ferraccioli.
"Proteomic Study of Salivary Peptides and Proteins in Patients With Sjogren's Syndrome Before and After Pilocarpine Treatment."
Arthritis & Rheumatism 56, 2216–2222 (2007).
- 15) Cabras T, Pisano E, Montaldo C, Giuca MR, Iavarone F, Zampino G, Castagnola M, Messina I.
"Significant modifications of the salivary proteome potentially associated with complications of Down syndrome revealed by top-down proteomics." Mol Cell Proteomics. 12(7):1844-1852(2013).
- 16) Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, Fanali C, Nemolato S, Castagnola M, Messina I.
"Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes"
Mol Cell Proteomics 9, 2099-2108 (2010).

Paolo Pusceddu



Cagliari, 21.11.2014



Università degli Studi di Cagliari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Direttore: Prof. Anna Maria Deiana

Elenco Documenti presentati al Comitato Etico per la proposta di studio spontaneo: Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia

- Curriculum vitae sintetico dello sperimentatore Dott. Pier Paolo Pusceddu
- Modulo di assenso 5-10 anni
- Modulo di assenso 11-16 anni
- Foglio informativo e modulo di consenso informato (controllo)
- Foglio informativo e modulo di consenso informato (caso)
- Autorizzazione Direzione Sanitaria Azienda Ospedaliera Brotzu
- Proposta di studio spontaneo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia"

Progetto di ricerca: Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia

Il suddetto studio non è sponsorizzato da nessun ente o casa farmaceutica, pertanto non verranno utilizzati, sperimentati o iniettati farmaci o altre sostanze.

Razionale dello studio

Numerosi studi proteomici condotti sulla saliva di soggetti affetti da diverse patologie hanno mostrato differenze statisticamente significative rispetto a soggetti sani (11-15), in particolare sono state evidenziate numerose differenze nella composizione proteica della frazione solubile in acido della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 (16). In questo studio vogliamo evidenziare le differenze nella composizione proteica della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto a soggetti sani, sia a livello della frazione solubile in acido che di quella insolubile, in modo da caratterizzare l'intero proteoma salivare al fine di evidenziare differenze significative tra le tre classi di campioni.

Introduzione

Da diversi anni la secrezione salivare si è imposta all'attenzione dei laboratori di analisi cliniche in quanto, nonostante la sua variabilità, questo liquido biologico può rispecchiare in modo sufficientemente affidabile il quadro di alcune situazioni patologiche acute e cronicizzate. Il fluido orale costituisce una interessante fonte potenziale di importanti informazioni biochimiche e bio-metaboliche anche per il fatto che costituisce un campione facilmente ottenibile con tecniche non invasive. Esso risulta molto semplice da prelevare in condizioni basali, il che lo rende ideale per indagini conoscitive a riguardo dello sviluppo organico soprattutto durante l'età pediatrica.

In studi precedenti il nostro gruppo ha dato un contributo alla caratterizzazione del proteoma della saliva intera (1-7) che comprende proteine e peptidi derivanti dalle ghiandole salivari maggiori e minori, dal fluido crevicolare gengivale, dalla flora orale e dalle cellule di sfaldamento della mucosa.

Attraverso un approccio HPLC-ESI-MS sono state caratterizzate proteine e peptidi, presenti nella frazione solubile in acido, specifici della saliva e appartenenti alle famiglie delle proteine ricche in prolina (PRP) acide e basiche, istatine, cistatine e staterina, nonché tutta una serie di loro prodotti di modificazione post-traduzionale originati prima, durante e dopo la secrezione. Lo stesso approccio analitico ha consentito di evidenziare e quantificare altri peptidi non specifici della saliva tra cui le beta-timosine, le alfa-defensine e alcune proteine della famiglia delle S100 (8-10).

Attraverso l'utilizzo dell'elettroforesi bidimensionale è possibile analizzare la frazione insolubile in acido della saliva procedendo con una isoelettrofocalizzazione come prima dimensione e con un'analisi SDS-PAGE come seconda dimensione. L'uso delle due tecniche ortogonali, che sfruttano per la separazione differenze di punto isoelettrico la prima e di peso molecolare la seconda consentendo di ottenere risoluzioni molto elevate, permette la separazione di un elevato numero di proteine. L'analisi dei gel bidimensionali opportunamente rivelati con coloranti sensibili può consentire di evidenziare differenze quantitative significative per specifiche proteine tra i diversi gruppi di soggetti, e le proteine differenzialmente espresse possono essere identificate mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione dopo tripsinizzazione in gel.

Scopo

Questo studio si propone di evidenziare la presenza di differenze statisticamente significative nella composizione proteica della saliva (sia nella frazione solubile in acido che nella frazione insolubile in acido) tra soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, soggetti affetti da diabete di tipo 1 e soggetti sani di pari età e sesso. In un precedente studio in cui è stata analizzata la composizione proteica della frazione della saliva solubile in acido di soggetti affetti da diabete di tipo 1 è stata evidenziata una concentrazione inferiore di staterina, del peptide P-B, P-C e di istatina nei soggetti affetti da diabete di tipo 1 rispetto ai soggetti sani, e concentrazioni aumentate delle α -defensine 1, 2 e 4 e della proteina S100A9. L'analisi di campioni di soggetti affetti da celiachia e da diabete di tipo 1 potrebbe rivelare differenze significative per altre proteine che non hanno mostrato significatività nei pazienti affetti dal solo diabete di tipo 1. Inoltre dai campioni di saliva raccolti in questo studio verrà analizzata anche la frazione insolubile in acido e questa analisi permetterà di ottenere informazioni complementari rispetto a quelle ottenute dall'analisi della frazione solubile in acido, in modo da evidenziare differenze significative sull'intero proteoma salivare tra le tre classi di soggetti. Dati preliminari in questa direzione hanno mostrato che diverse proteine della classe delle S100 (S100A7, S100A8, l'isoforma fosforilata e ossidata dell'S100A9, S100A11) risultano più rappresentate nella frazione insolubile in acido dei controlli sani rispetto ai pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia.

Obiettivi

L'obiettivo dello studio è quello di evidenziare differenze qualitative e quantitative nel contenuto proteico e peptidico della saliva, sia a livello della frazione solubile in acido che di quella insolubile in acido, tra soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, soggetti affetti da

diabete di tipo 1 e soggetti sani di pari età e sesso al fine di evidenziare possibili biomarcatori delle complicanze legate alle patologie.

Metodi

I campioni di saliva saranno raccolti da 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia e da 50 pazienti affetti da diabete di tipo 1 con età compresa tra 5 e 16 anni che afferiscono per le proprie patologie al reparto di pediatria dell'AOB, durante un periodo di 12 mesi.

Criteri di inclusione al gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia: età dei soggetti compresa tra 5 e 16 anni, diagnosi accertata di diabete di tipo 1 e celiachia da almeno 1 anno, consenso informato scritto da parte dei genitori e assenso.

Criteri di inclusione al gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1: età dei soggetti compresa tra 5 e 16 anni, diagnosi accertata di diabete di tipo 1 da almeno 1 anno, consenso informato scritto da parte dei genitori e assenso.

Criteri di esclusione: patologie diverse da quelle di interesse per lo studio, e incapacità o rifiuto a seguire le procedure dello studio.

I campioni saranno trattati secondo protocolli riportati in letteratura (1-3).

Tutti i campioni di saliva saranno raccolti a digiuno tra le ore 8.00 e le 11.00.

Il prelievo di saliva verrà effettuato dall'analizzatore o autonomamente dal bambino/ragazzo con micro pipette monouso sterili, esclusivamente su soggetti collaboranti.

Il volume di saliva raccolto (500 µl circa) sarà miscelato in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) 0.2%. La soluzione ottenuta verrà quindi centrifugata ad una velocità di 14000 g per 15 minuti, separando il supernatante (frazione solubile in acido) dal precipitato (frazione insolubile in acido). Entrambe le frazioni ottenute saranno congelate a -80°C e trasportate presso i laboratori del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, dove verranno condotte le analisi. In particolare la frazione solubile in acido sarà analizzata attraverso un approccio HPLC-ESI-MS. Dai profili cromatografici verranno estratti i picchi di corrente ionica di circa 140 peptidi e proteine e loro derivati, e dalla misura dell'area del picco di corrente ionica estratta (XIC) specifico di ciascun analista verrà determinata la concentrazione relativa nel campione. La frazione insolubile in acido verrà solubilizzata per essere analizzata mediante elettroforesi bidimensionale, procedendo con una isoelettrofocalizzazione come prima dimensione e quindi con un'analisi SDS-PAGE come seconda dimensione. Sarà così possibile confrontare qualitativamente e quantitativamente i campioni ottenuti dai soggetti sani e dai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia, al fine di evidenziare proteine e peptidi che siano presenti in

quantitativi diversi (sovra espresse o sotto espresse) nei tre gruppi, e che potrebbero essere utilizzati come biomarcatori salivari di complicità associate alle patologie.

Analisi dei dati

L'analisi statistica dei dati sperimentali ottenuti sulla frazione solubile in acido mediante analisi HPLC-ESI-MS relativi alle aree dei picchi verrà effettuata utilizzando il programma GraphPad Prism (versione 4.0). Per l'area del picco XIC di ciascun analita verranno calcolati: intervalli, mediane, medie, deviazioni standard ed errori standard. L'analisi delle immagini dei gel ottenuti mediante elettroforesi bidimensionale sulle frazioni insolubili in acido verrà effettuata mediante il software SameSpots grazie al quale verranno quantificate le intensità dei diversi spot in modo da poter valutare le differenze statisticamente significative tra pazienti diabetici e celiaci, pazienti diabetici e soggetti sani.

Considerazioni regolatorie ed etiche

Approvazione Autorità regolatorie

Questo studio sarà condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e previa approvazione del Comitato Etico Indipendente della AOU di Cagliari.

Approvazione del Comitato Etico

Il Comitato Etico dovrà analizzare ed approvare il consenso informato per il soggetto e qualunque altra informazione scritta per il soggetto.

Se durante lo studio si renderà necessario apportare degli emendamenti al protocollo, al consenso informato o ad altri documenti, lo sperimentatore dovrà accertarsi che il Comitato Etico abbia approvato gli emendamenti prima di istituire le modificazioni al protocollo.

In caso di emendamento del consenso informato l'approvazione del Comitato Etico dovrà essere ottenuta prima di includere altri soggetti nello studio.

Consenso informato

Lo sperimentatore dovrà provvedere ad informare il paziente/soggetto su ogni aspetto inerente la sua partecipazione allo studio. L'acquisizione del consenso informato dovrà svolgersi secondo le modalità previste e richieste dal Comitato Etico.

Lo sperimentatore e il paziente/soggetto dovranno entrambi firmare il modulo di consenso informato completo della data, prima dell'arruolamento nello studio.

Il paziente/soggetto riceverà una copia del consenso informato mentre l'originale sarà allegato al resto della documentazione dello studio. La decisione di aderire allo studio da parte del paziente/soggetto è completamente volontaria. Lo sperimentatore dovrà far presente in maniera chiara al paziente/soggetto che potrà ritirare il proprio consenso in qualunque momento dello studio senza alcun pregiudizio. Qualora il modulo di consenso informato dovesse essere emendato in corso di studio lo sperimentatore dovrà attenersi alle modifiche apportate dagli organismi regolatori ed utilizzare il modulo emendato anche per i pazienti/soggetti già arruolati.

Doveri del medico sperimentatore

Il medico sperimentatore dovrà assicurarsi che tutto il personale coinvolto nello studio sia qualificato e adeguatamente istruito circa le procedure dello studio medesimo.

Registrazione dei dati

Il medico sperimentatore dovrà assicurarsi che tutti i dati riportati nella CRF corrispondano fedelmente al profilo del soggetto e a tutte le notizie specificamente richieste dal protocollo.

Riservatezza dei dati

In ottemperanza alle disposizioni legislative vigenti relative alla tutela delle persone rispetto al trattamento dei dati personali (art 13 del DL 196/2003) i risultati relativi a questo studio potranno essere oggetto di pubblicazione scientifica fermo restando l'anonimato dei soggetti partecipanti.

Proprietà intellettuale

Qualsiasi scoperta, dato e conoscenza scaturiti da questo studio saranno di proprietà del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari e la Prof.ssa Irene Messina sarà il responsabile scientifico coadiuvata dalla Dott.ssa Elisabetta Pisano Ricercatore del Dipartimento di Scienze Chirurgiche dell'Università di Cagliari e del Dipartimento di Medicina Interna dell'Ospedale Brotzu - Cagliari ed il responsabile clinico sarà il Dott. Pierpaolo Pusceddu, Direttore della S.C. Pediatria.

Pubblicazione dei dati

Uno scopo dello studio, in accordo alla buona pratica di ricerca, è quello di pubblicare i risultati ottenuti in riviste scientifiche, sia nazionali che internazionali, e di divulgare questi dati in convegni nazionali o internazionali.

Fondi

Lo studio è un progetto di ricerca spontanea. Le spese per la realizzazione del progetto sono a carico del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università di Cagliari.

Bibliografia

- 1) A. Lupi, I. Messana, G. Denotti, M.E. Schininà, G. Gambarini, M.B. Fadda, A. Vitali, T. Cabras, V. Piras, M. Patamia, M. Cordaro, B. Giardina, M. Castagnola.
"Identification of the human salivary cystatin complex by the coupling of high-performance liquid chromatography and ion-trap mass spectrometry."
Proteomics 3, 461-467 (2003).
- 2) I. Messana, T. Cabras, R. Inzitari, A. Lupi, C. Zuppi, C. Olmi, M.B. Fadda, M. Cordaro, B. Giardina, M. Castagnola.
"Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach."
J. Proteome Res. 3, 792-800 (2004).
- 3) M. Castagnola, R. Inzitari, D.V. Rossetti, C. Olmi, T. Cabras, V. Piras, P. Nicolussi, M.T. Sanna, M. Pellegrini, B. Giardina, I. Messana
"A cascade of 24 histatins (histatin 3 fragments) in human saliva: suggestions for a pre-secretory sequential cleavage pathway."
J. Biol. Chem. 279, 41436-41443 (2004).
- 4) R. Inzitari, T. Cabras, G. Onnis, C. Olmi, A. Mastinu, M.T. Sanna, M. Pellegrini, M. Castagnola, I. Messana
"Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins."
Proteomics 5, 805-815 (2005).
- 5) Pisano E, Cabras T, Montaldo C, Piras V, Inzitari R, Olmi C, Castagnola M, Messana I.
"Peptides of human gingival crevicular fluid determined by HPLC-ESI-MS"
Eur J Oral Sci. Dec 13, 462-468 (2005).
- 6) Inzitari R, Cabras T, Rossetti DV, Fanali C, Vitali A, Pellegrini M, Paludetti G, Manni A, Giardina B, Messana I, Castagnola M.
"Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives"
Proteomics 6, 6370-6379 (2006).
- 7) Messana I, Cabras T, Pisano E, Sanna MT, Olianias A, Manconi B, Pellegrini M, Paludetti G, Scarano E, Fiorita A, Agostino S, Contucci AM, Calò L, Picciotti PM, Manni A, Bennick A, Vitali A, Fanali C, Inzitari R, Castagnola M
"Trafficking and post-secretory events responsible for the formation of secreted human salivary peptides. A proteomic approach"
Mol Cell Proteomics 7, 911-926 (2008).
- 8) Inzitari R, Cabras T, Pisano E, Fanali C, Manconi B, Scarano E, Fiorita A, Paludetti G, Manni A, Nemolato S, Faa G, Castagnola M, Messana I.

- “HPLC-ESI-MS analysis of oral human fluids reveals that gingival crevicular fluid is the main source of oral thymosins beta(4) and beta(10)”
J Sep Sci. 32, 57-63 (2009).
- 9) Nemolato S, Messina I, Cabras T, Manconi B, Inzitari R, Fanali C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Riva A, Fanni D, Di Felice E, Faa G, Castagnola M.
“Thymosin beta(4) and beta(10) levels in pre-term newborn oral cavity and foetal salivary glands evidence a switch of secretion during foetal development”
PLoS One. 4, e5109 (2009).
- 10) Castagnola M, Inzitari R, Fanali C, Iavarone F, Vitali A, Desiderio C, Vento G, Tirone C, Romagnoli C, Cabras T, Manconi B, Sanna MT, Boi R, Pisano E, Olianias A, Pellegrini M, Nemolato S, Heizmann CW, Faa G, Messina I.
“The surprising composition of the salivary proteome of preterm human newborn”
Mol Cell Proteomics. 10(1):M110.003467 (2011).
- 11) Castagnola M, Messina I, Inzitari R, Fanali C, Cabras T, Morelli A, Pecoraro AM, Neri G, Torrioli MG, Gurrieri F.
“Hypo-Phosphorylation of Salivary Peptidome as a Clue to the Molecular Pathogenesis of Autism Spectrum Disorders”
J Proteome Res. 7, 5327-5332 (2008).
- 12) Fanali C, Inzitari R, Cabras T, Pisano E, Castagnola M, Celletti R, Manni A, Messina I.
“alpha-Defensin levels in whole saliva of totally edentulous subjects”
Int J Immunopathol Pharmacol. 21, 845-849 (2008).
- 13) Contucci AM, Inzitari R, Agostino S, Vitali A, Fiorita A, Cabras T, Scarano E, Messina I
“Statherin levels in saliva of patients with precancerous and cancerous lesions of the oral cavity: a preliminary report”
Oral Dis. 11, 95-99 (2005).
- 14) G. Peluso, M. De Santis, R. Inzitari, C. Fanali, T. Cabras, I. Messina, M. Castagnola, F.F. Ferraccioli.
“Proteomic Study of Salivary Peptides and Proteins in Patients With Sjogren’s Syndrome Before and After Pilocarpine Treatment.”
Arthritis & Rheumatism 56, 2216–2222 (2007).
- 15) Cabras T, Pisano E, Montaldo C, Giuca MR, Iavarone F, Zampino G, Castagnola M, Messina I.
“Significant modifications of the salivary proteome potentially associated with complications of Down syndrome revealed by top-down proteomics.” Mol Cell Proteomics. 12(7):1844-1852(2013).
- 16) Cabras T, Pisano E, Mastinu A, Denotti G, Pusceddu PP, Inzitari R, Fanali C, Nemolato S, Castagnola M, Messina I.
“Alterations of the salivary secretory peptidome profile in children affected by type 1 diabetes”
Mol Cell Proteomics 9, 2099-2108 (2010).

**FORMATO EUROPEO
PER IL CURRICULUM
VITAE**



INFORMAZIONI PERSONALI

Nome **PUSCEDDU PIER PAOLO**
Indirizzo **Via Giudicessa Benedetta, 72 09131 Cagliari**
Telefono **070539570**
Fax **070539570**
E-mail **pierpaolopusceddu@aob.it**

Nazionalità **italiana**
Data di nascita **27 GENNAIO 1948**

ESPERIENZA LAVORATIVA

- Date (da – a)
 - **APRILE 2008: DIRETTORE DIPARTIMENTO MEDICINA INTERNA AOBROTZU CAGLIARI**
 - **GENNAIO 2005: DIRETTORE S.C. PEDIATRIA AOBROTZU CAGLIARI**
 - **NOVEMBRE 2004: DIRETTORE S.C. P.S. PEDIATRICO AOBROTZU CAGLIARI**
 - **GENNAIO 2001: DIRETTORE S.S.D. P.S. PEDIATRICO AOBROTZU CAGLIARI**
 - **GENNAIO 1991: AIUTO S.C. PEDIATRIA AOBROTZU CAGLIARI**
 - **AGOSTO 1979: ASSISTENTE DI RUOLO U.O. PEDIATRIA OSPEDALE SS.TRINITÀ CAGLIARI**
- Nome e indirizzo del datore di lavoro
Azienda Ospedaliera Brotzu Piazzale Richi 1

ISTRUZIONE E FORMAZIONE

- Date (da – a)
 - Anno 1974: Laurea in Medicina e Chirurgia Università Cagliari**
 - Anno 1978 Specializzazione in Puericoltura**
 - Anno 1982 Specializzazione in Pediatria**

**CAPACITÀ E COMPETENZE
PERSONALI**

*Acquisite nel corso della vita e della
carriera ma non necessariamente
riconosciute da certificati e diplomi
ufficiali.*

MADRELINGUA **Italiano**

ALTRE LINGUA

- Capacità di lettura **INGLESE**
[Buono
- Capacità di scrittura **elementare**
- Capacità di espressione orale **elementare**

Cagliari, 26-11-2014

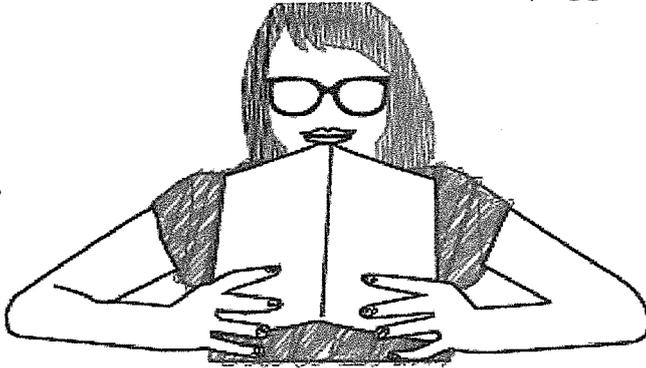


Università degli Studi di Cagliari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Direttore: Prof. Anna Maria Deiana

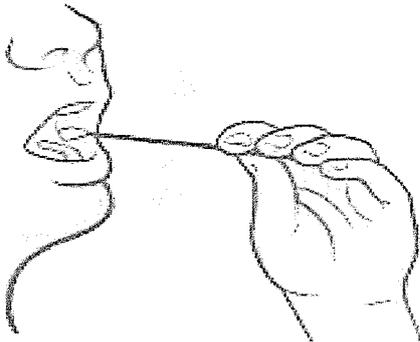
Modulo di assenso (soggetti di età tra 11 e 16 anni)



MODULO di ASSENSO

Sono stato invitato a partecipare allo studio clinico Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia.

Ho ben compreso quanto mi è stato spiegato con termini comprensibili per un bambino della mia età. Ho avuto la possibilità, in caso di dubbi, di rivolgere domande al medico o ai ricercatori qualsiasi domanda e le risposte che mi sono state date sono state chiare ed esaurienti. So che partecipando a questo studio mi verrà chiesto un campione della mia saliva per valutare se sono presenti eventuali variazioni nella composizione proteica della mia saliva. Sono stato informato che parteciperanno allo studio tanti bambini malati di diabete di tipo 1 e di celiachia e bambini sani.



Sono stato informato che avrò la possibilità di ritirarmi dallo studio in qualsiasi momento senza che la mia decisione possa avere ripercussioni negative un domani sulla mia salute.

Firma del partecipante:

Nome e cognome (maiuscolo)

Firma dello sperimentatore

Nome e cognome (maiuscolo)

1/1

versione 1 del 5/12/2014

Sezione Biomedica - Cittadella Universitaria di Monserrato

09042 MONSERRATO (CA) - tel. 070/675 4520 - fax 070/6754523 - e-mail: imessana@unica.it

Codice Fiscale: 80019600925 – Partita IVA: 00443370929



Università degli Studi di Cagliari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Direttore: Prof. Anna Maria Deiana

Foglio informativo e modulo di consenso informato (controllo)

Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da e diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia.

Gentile Genitore,

Le viene proposto di dare l'autorizzazione alla partecipazione di suo figlio/a come controllo sano ad uno studio che ha per titolo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia". Lo studio prevede l'esecuzione di un prelievo non invasivo di saliva, necessario per la realizzazione dello studio stesso. Non è prevista la somministrazione di nessun farmaco.

Prima di decidere se far partecipare o meno suo figlio/a è importante che Lei comprenda bene perché viene svolto lo studio e che cosa comporta. La preghiamo, pertanto, di leggere attentamente queste informazioni e di porre qualsiasi domanda allo sperimentatore qualora qualcosa non le fosse chiaro. Prenda tutto il tempo necessario per decidere se far partecipare o meno allo studio vostro figlio/a. Gli sperimentatori La ringraziano per la disponibilità a leggere queste informazioni qualunque sia la sua decisione.

Lo scopo dello studio

Lo scopo dello studio è quello di valutare eventuali variazioni qualitative e quantitative della composizione proteica salivare in soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto sia a soggetti affetti da diabete di tipo 1 che a soggetti sani di pari età e sesso al fine di evidenziare dei possibili biomarcatori delle complicanze legate alle patologie. Per questo verrà effettuato uno studio su campioni di saliva prelevati da bambini/ragazzi di età compresa tra 5 e 16 anni.

I prelievi di saliva verranno effettuati in modalità assolutamente non invasiva e solo se il bambino/ragazzo sarà collaborante. Tale studio consentirà di stabilire differenze statisticamente significative nel profilo proteico della saliva umana tra soggetti affetti da entrambe le patologie rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani. I risultati di questa ricerca potranno fornire un valido supporto per chiarire le funzioni di specifiche proteine ancora poco caratterizzate all'interno del cavo orale.

Perché suo figlio/a è stato selezionato/a per questa ricerca?

Suo figlio/a è stato/a selezionato/a per questa ricerca in quanto controllo sano cioè non affetto da diabete o celiachia.



Cosa prevede lo studio?

Lo studio prevede esclusivamente un prelievo di saliva, che verrà effettuato la mattina dall'analizzatore, o quando possibile, direttamente dal bambino/ragazzo.

Procedura

I campioni di saliva saranno raccolti da soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia e da soggetti affetti da diabete di tipo 1 di età compresa tra 5 e 16 anni a digiuno, di mattina tra le ore 8.00 e le 11.00.

Il prelievo di saliva verrà eseguito con l'utilizzo di micro pipette monouso e sterili solo su soggetti collaboranti. Il volume di saliva raccolto (poche gocce, 500 μ L circa) sarà miscelato in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) 0.2%. La soluzione ottenuta verrà successivamente centrifugata ad una velocità di 14000g per 15 minuti e il sopranatante e il precipitato così ottenuti saranno conservati separatamente a -80°C per essere successivamente analizzati. Il sopranatante sarà analizzato mediante un approccio HPLC-ESI-MS mentre il precipitato sarà solubilizzato e sottoposto ad elettroforesi bidimensionale per la separazione e quantificazione delle proteine.

L'aggiunta di una soluzione acida al campione di saliva inibisce la gran parte delle proteasi presenti naturalmente nel fluido biologico, in modo da evitare modificazioni a carico dei peptidi/proteine presenti.

Cosa succederà al campione biologico una volta terminato lo studio

Il campione biologico verrà totalmente utilizzato per le analisi e non sarà conservato.

Benefici

Suo figlio/a non avrà dei benefici diretti dallo studio, ma la sua partecipazione sarà utile per verificare la presenza di differenze significative nella composizione proteica della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani al fine di evidenziare eventuali biomarcatori di complicità associate alle patologie.

Rischi

La procedura del prelievo non comporta nessun rischio per il soggetto, poiché la raccolta della saliva viene effettuata con una pipetta di plastica morbida monouso e sterile.

Risultati dello Studio e riservatezza delle informazioni raccolte

Il presente studio sarà condotto nel rispetto del totale anonimato secondo il DL 196/2003.

L'anonimizzazione dei dati personali di suo figlio/a verrà effettuata mediante il sistema della codifica singola che prevede l'assegnazione di un codice numerico al campione biologico (saliva). Lo stesso codice numerico verrà utilizzato per registrare i dati demografici e quelli relativi alle informazioni demografiche di suo figlio/a.



Il nome di suo figlio/a e qualunque altra informazione che leghi l'identità di suo figlio/a al campione di biologico (e alle informazioni demografiche raccolte) saranno tenuti separati. La corrispondenza tra il codice numerico e l'identità di suo/a figlio/a sarà conosciuta soltanto dal medico referente della S.C. Pediatria. L'utilizzo di un codice numerico non permette che persone diverse dal medico referente che conduce la ricerca possano associare il nome di suo figlio/a al campione biologico.

Durante la presentazione di questo studio o la pubblicazione dei risultati ottenuti non verrà reso noto nessuno dei dati personali, o qualunque altro dato che possa far risalire alla identità di suo figlio/a.

Titolare del trattamento dei dati così detti sensibili di suo figlio/a, ai sensi del Decreto Legislativo 196 del 30 Giugno 2003, è la S.C di Pediatria dell'Azienda Ospedaliero Brotzu dove verranno effettuati i prelievi di saliva.

Al termine dello studio, Lei potrà essere informato, se lo vorrà, circa i risultati generali dello studio. Questo non accadrà subito al termine dello studio, in quanto occorrerà attendere l'analisi dei risultati.

Se decide di far partecipare suo figlio/a a questo studio, Le verrà consegnata una copia di questo foglio informativo e del relativo modulo di consenso da Lei firmato.

Se deciderà di far partecipare allo studio suo figlio/a, completi e firmi l'allegato modulo di consenso. La Sua firma indica che uno degli sperimentatori La ha informata su tutti gli aspetti dello studio e che è Sua volontà far partecipare allo studio suo figlio/a.

Gli sperimentatori desiderano anche informarLa che lo studio è stato notificato e approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari.

Lo studio riguarderà ESCLUSIVAMENTE l'analisi delle proteine presenti nella saliva.

Non verrà eseguita nessuna procedura di estrazione del DNA sul campione.

La partecipazione di suo/a figlio/a a questo studio è libera e volontaria.

Se accetta di far partecipare allo studio suo/a figlio/a potrà comunque ritirarlo/a in qualunque momento senza dare alcuna spiegazione.

Le verrà rilasciata una copia del consenso.

CHI POSSO CONTATTARE IN CASO DI DOMANDE O PROBLEMI?

La invitiamo a porre qualsiasi domanda che Lei ritenga opportuna al Medico Responsabile dello studio che Le spiegherà in dettaglio ogni parte del progetto di ricerca proposto.

Il medico Le chiederà anche di firmare e datare il modulo di Consenso informato allegato a questo documento per confermare che Lei abbia letto le informazioni qui contenute e compreso lo scopo della ricerca.

Se desiderasse ulteriori informazioni su tale ricerca può contattare il Medico sperimentatore Dott. Pierpaolo Pusceddu al seguente recapito telefonico 070-539553. che sarà lieta di fornirLe qualsiasi chiarimento.



DICHIARAZIONE DI CONSENSO

Dopo aver letto le informazioni sul progetto di ricerca e sull' articolo 13 del DL 196/2003 sul trattamento dei dati personali, e dopo un approfondito colloquio con il personale medico:

- Ho letto e capito le informazioni contenute in questo consenso.
- Ho avuto la possibilità di fare domande e ritengo che tutte le mie domande abbiano avuto risposta.
- So che far partecipare mio/a figlio/a. come controllo sano. a questo studio è una mia libera scelta.
- Mi è stata data una copia di questo consenso.
- So che potrò far ritirare mio/a figlio/a dallo studio in qualunque momento e che da questa mia decisione mio figlio/a non riceverà alcuna penalizzazione.
- Sono a conoscenza del fatto che i risultati derivati dallo studio mi verranno resi noti a richiesta.
- Io accetto di far partecipare volontariamente mio figlio/a a questo studio per donare un campione di saliva che verrà analizzato.

Vorrei ricevere notizie contenenti informazioni generali sullo studio: Si [] / No []

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Nome per esteso del donatore data di nascita.....

Firma dello sperimentatore che ha informato i genitori del donatore

Nome per esteso



Università degli Studi di Cagliari

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Direttore: Prof. Anna Maria Deiana

Foglio informativo e modulo di consenso informato (caso)

Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da e diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia.

Gentile Genitore,

Le viene proposto di dare l'autorizzazione alla partecipazione di suo figlio/a ad uno studio che ha per titolo "Studio proteomico della saliva di soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e da diabete di tipo 1 e celiachia". Lo studio prevede l'esecuzione di un prelievo non invasivo di saliva, necessario per la realizzazione dello studio stesso.

Non è prevista la somministrazione di nessun farmaco.

Prima di decidere se far partecipare o meno suo figlio/a è importante che Lei comprenda bene perché viene svolto lo studio e che cosa comporta. La preghiamo, pertanto, di voler dedicare un pò del Suo tempo per leggere con attenzione le informazioni che Le verranno date di seguito e a discuterle con altre persone, se lo riterrà opportuno. Chieda agli sperimentatori di questo studio se qualcosa non Le è chiaro o se desidera ulteriori informazioni. Prenda tutto il tempo necessario per decidere se far partecipare o meno suo figlio/a allo studio. Gli sperimentatori La ringraziano per la disponibilità a leggere queste informazioni.

Lo scopo dello studio

Lo scopo dello studio sarà quello di valutare eventuali variazioni qualitative e quantitative della composizione proteica salivare in soggetti in età pediatrica affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto sia a soggetti affetti da diabete di tipo 1 che a soggetti sani di pari età e sesso al fine di evidenziare dei possibili biomarcatori delle complicanze legate alle patologie. Per questo verrà effettuato uno studio su campioni di saliva prelevati da bambini/ragazzi di età compresa tra 5 e 16 anni.

I prelievi di saliva verranno effettuati in modalità assolutamente non invasiva e solo se il bambino/ragazzo sarà collaborante. Tale studio consentirà di stabilire differenze statisticamente significative nel profilo proteico della saliva umana tra soggetti affetti da entrambe le patologie rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani. I risultati di questa ricerca potranno fornire un valido supporto per chiarire le funzioni di specifiche proteine ancora poco caratterizzate all'interno del cavo orale.

Perché suo figlio/a è stato selezionato/a per questa proposta?

Suo figlio/a è stato/a selezionato/a a partecipare a questo progetto perché risponde ai criteri di inclusione dello studio e non presenta criteri di esclusione dallo stesso.

1/4

versione 1 del 5/12/2014

Sezione Biomedica - Cittadella Universitaria di Monserrato

09042 MONSERRATO (CA) - tel. 070/675 4520 - fax 070/6754523 - e-mail: imessana@unica.it

Codice Fiscale: 80019600925 – Partita IVA: 00443370929

**Criteria di inclusione nel gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia:**

1. Età compresa tra 5 e 16 anni, di entrambi i sessi.
2. Diagnosi accertata di diabete di tipo 1 e celiachia da almeno 1 anno.
3. Consenso informato scritto da parte dei genitori.

Criteria di inclusione nel gruppo dei soggetti affetti da diabete di tipo 1:

1. Età compresa tra 5 e 16 anni, di entrambi i sessi.
2. Diagnosi accertata di diabete di tipo 1 da almeno 1 anno.
3. Consenso informato scritto da parte dei genitori.

Criteria di esclusione:

1. Patologie diverse da quelle di interesse per lo studio.
2. Incapacità o rifiuto a seguire le procedure dello studio

Cosa prevede lo studio?

Lo studio prevede esclusivamente un prelievo di saliva, che verrà effettuato la mattina dall'analizzatore, o quando possibile, direttamente dal bambino/ragazzo.

Procedura**Procedura**

I campioni di saliva saranno raccolti da soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia e da soggetti affetti da diabete di tipo 1 di età compresa tra 5 e 16 anni a digiuno, di mattina tra le ore 8.00 e le 11.00.

Il prelievo di saliva verrà eseguito con l'utilizzo di micro pipette monouso e sterili solo su soggetti collaboranti. Il volume di saliva raccolto (poche gocce, 500 μ L circa) sarà miscelato in rapporto 1:1 (v/v) con una soluzione acquosa di acido trifluoroacetico (TFA) 0.2%. La soluzione ottenuta verrà successivamente centrifugata ad una velocità di 14000g per 15 minuti e il soprannatante e il precipitato così ottenuti saranno conservati separatamente a -80°C per essere successivamente analizzati. Il soprannatante sarà analizzato mediante un approccio HPLC-ESI-MS mentre il precipitato sarà solubilizzato e sottoposto ad elettroforesi bidimensionale per la separazione e quantificazione delle proteine.

L'aggiunta di una soluzione acida al campione di saliva inibisce la gran parte delle proteasi presenti naturalmente nel fluido biologico, in modo da evitare modificazioni a carico dei peptidi/proteine presenti.

Cosa succederà al campione biologico una volta terminato lo studio

Il campione biologico verrà totalmente utilizzato per le analisi e non sarà conservato.



Benefici

Suo figlio/a non avrà dei benefici diretti dallo studio, ma la sua partecipazione sarà utile per verificare la presenza di differenze significative nella composizione proteica della saliva di soggetti affetti da diabete di tipo 1 e celiachia rispetto ai soggetti affetti da diabete di tipo 1 e ai soggetti sani al fine di evidenziare eventuali biomarcatori di complicanze associate alle patologie.

Rischi

La procedura di prelievo non comporta nessun rischio per il soggetto, poiché la raccolta della saliva viene effettuata con una pipetta di plastica morbida monouso e sterile.

Risultati dello Studio e riservatezza delle informazioni raccolte

Il presente studio sarà condotto nel rispetto del totale anonimato secondo il DL 196/2003.

L'anonimizzazione dei dati personali di suo figlio/a verrà effettuata mediante il sistema della codifica singola che prevede l'assegnazione di un codice numerico al campione biologico (saliva). Lo stesso codice numerico verrà utilizzato per registrare i dati demografici e quelli relativi alle informazioni demografiche di suo figlio/a.

Il nome di suo figlio/a e qualunque altra informazione che leghi l'identità di suo figlio/a al campione di biologico (e alle informazioni demografiche raccolte) saranno tenuti separati. La corrispondenza tra il codice numerico e l'identità di suo/a figlio/a sarà conosciuta soltanto dal medico referente della S.C. Pediatria. L'utilizzo di un codice numerico non permette che persone diverse dal medico referente che conduce la ricerca possano associare il nome di suo figlio/a al campione biologico.

Durante la presentazione di questo studio o la pubblicazione dei risultati ottenuti non verrà reso noto nessuno dei dati personali, o qualunque altro dato che possa far risalire alla identità di suo figlio/a.

Titolare del trattamento dei dati così detti sensibili di suo figlio/a, ai sensi del Decreto Legislativo 196 del 30 Giugno 2003, è la S.C di Pediatria dell'Azienda Ospedaliero Brotzu dove verranno effettuati i prelievi di saliva.

Al termine dello studio, Lei potrà essere informato, se lo vorrà, circa i risultati generali dello studio. Questo non accadrà subito al termine dello studio, in quanto occorrerà attendere l'analisi dei risultati.

Se decide di far partecipare suo figlio/a a questo studio, Le verrà consegnata una copia di questo foglio informativo e del relativo modulo di consenso da Lei firmato.

Se deciderà di far partecipare allo studio suo figlio/a, completi e firmi l'allegato modulo di consenso. La Sua firma indica che uno degli sperimentatori La ha informata su tutti gli aspetti dello studio e che è Sua volontà far partecipare allo studio suo figlio/a.

Gli sperimentatori desiderano anche informarLa che lo studio è stato notificato e approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Cagliari.

Lo studio riguarderà ESCLUSIVAMENTE l'analisi delle proteine presenti nella saliva.

Non verrà eseguita nessuna procedura di estrazione del DNA sul campione.



La partecipazione di suo/a figlio/a a questo studio è libera e volontaria.

Se accetta di far partecipare allo studio suo/a figlio/a potrà comunque ritirarlo/a in qualunque momento senza dare alcuna spiegazione.

Le verrà rilasciata una copia del consenso.

CHI POSSO CONTATTARE IN CASO DI DOMANDE O PROBLEMI?

La invitiamo a porre qualsiasi domanda che Lei ritenga opportuna al Medico Responsabile dello studio che Le spiegherà in dettaglio ogni parte del progetto di ricerca proposto.

Il medico Le chiederà anche di firmare e datare il modulo di Consenso informato allegato a questo documento per confermare che Lei abbia letto le informazioni qui contenute e compreso lo scopo della ricerca.

Se desiderasse ulteriori informazioni su tale ricerca può contattare il Medico sperimentatore Dott. Pierpaolo Pusceddu al seguente recapito telefonico 070-539553. che sarà lieta di fornirLe qualsiasi chiarimento.

DICHIARAZIONE DI CONSENSO

Dopo aver letto le informazioni sul progetto di ricerca e sull' articolo 13 del DL 196/2003 sul trattamento dei dati personali, e dopo un approfondito colloquio con il personale medico:

- Ho letto e capito le informazioni contenute in questo consenso.
- Ho avuto la possibilità di fare domande e ritengo che tutte le mie domande abbiano avuto risposta.
- So che far partecipare mio/a figlio/a a questo studio è una mia libera scelta.
- Mi è stata data una copia di questo consenso.
- So che potrò far ritirare mio/a figlio/a dallo studio in qualunque momento e che da questa mia decisione mio figlio/a non riceverà alcuna penalizzazione.
- Sono a conoscenza del fatto che i risultati derivati dallo studio mi verranno resi noti a richiesta.
- Io accetto di far partecipare volontariamente mio figlio/a a questo studio per donare un campione di saliva che verrà analizzato.

Vorrei ricevere notizie contenenti informazioni generali sullo studio: Si [] / No []

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Firma del genitore:

Nome per esteso del genitore

Nome per esteso del donatore data di nascita.....

Firma dello sperimentatore che ha informato i genitori del donatore

Nome per esteso