

FACOLTÀ DI FARMACIA
E MEDICINA



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA



La Facoltà di Farmacia e Medicina presenta le attività di ricerca scientifica dei Dipartimenti di appartenenza.

Highlighting the Research Activity of the Sapienza Faculty of Pharmacy and Medicine.

Aula Magna del Rettorato

22 e 23 febbraio 2023

TURBO TALK

Turbo Talk

Spettrometria di massa: dalle proprietà intrinseche di ioni isolati all'analisi di matrici complesse	3
Progettazione e sviluppo di biosensori con applicazioni in campo medico	5
Valorizzazione degli scarti alimentari: dalla caratterizzazione chimica al recupero per prodotti per la salute umana	7
Le mille sfaccettature della chiralità	9
Recenti progressi nello studio di nanomedicine basate su molecole anfifiliche presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco: drug delivery e nuove speranze	11
Portali WEB utili per la ricerca scientifica e la didattica	13
Sviluppo e validazione di un modello di Intelligenza Artificiale per la previsione della recidiva dell'epatocarcinoma dopo trapianto di fegato	15
Valutazione dell'espressione dei fattori prognostici molecolari in pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino a grandi cellule del polmone (L-LCNEC)	17
Risultati di un'esperienza prospettica multicentrica di stenting carotideo con uso di stent C-Guard – Lo studio IronGuard 2	19
Bypass gastrico Roux-Y (RYGB) versus Bypass duodenale-ileale con anastomosi singola e sleeve gastrectomia (SADI-S): può una procedura malassorbitiva con conservazione pilorica può migliorare il controllo metabolico?	21
Rimozione extracorporea di CO2 nella gestione del trapianto di polmone	23
Il ruolo dell'immunità innata nella progressione della Sclerosi Laterale Amiotrofica	25
Cannabis e cervello in via di sviluppo: studio delle conseguenze dell'esposizione prenatale ai cannabinoidi	26
Ruolo della microglia nella plasticità sinaptica alla base delle memorie persistenti disadattative associate alla cocaina	28
La trasmissione sinaptica come bersaglio terapeutico nel trattamento delle patologie del neurosviluppo	30
La sindrome del leaky-gut induce cambiamenti neuroplastici nel sistema nervoso enterico durante i disordini dell'asse intestino-cervello e le malattie infiammatorie intestinali: un focus sulla glia enterica	32
Nanomedicina e composti naturali per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nel trattamento del medulloblastoma HH-dipendente	34
Carcinoma mammario e geni BRCA: una prospettiva di genere	36
La corona proteica delle nanoparticelle lipidiche decorate con DNA riduce il sequestro da parte delle cellule immunitarie in vivo	38
Contrastare l'oncogenesi mediante un ncRNA? Una prima strategia basata su un dominant negative RNA per contrastare la Transizione Epitelio-Mesenchimale	40
Impatto dei ligandi di NKG2D associati a vescicole extracellulari sull'immunosorveglianza tumorale mediata dalle cellule Natural Killer	42
Qualità della risposta T al vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2 in PLWH sotto ART	44

Interazione tra vescicole extracellulari e organoidi intestinali umani per lo studio della patogenicità e del potenziale tumorigenico del parassita nematode Anisakis	46
COVID-19 e Comunità Sapienza: strategie ed interventi di Sanità Pubblica	48
Istruzioni per infettare: studio del comportamento competitivo tra batteri intestinali in organoidi	50
Valutazione della vitalità delle lesioni in ambito forense	52
Fratture complesse dell'epifisi prossimale dell'omero trattate con un costrutto biomeccanicamente validato di fili filettati bloccati	54
Scoprire l'infinitamente piccolo tramite la Microscopia Elettronica	56
Trascrittomica Spaziale: un punto d'incontro tra l'istologia e la biologia molecolare	58
Ruolo del metabolismo degli aminoacidi nel potenziale metastatico delle cellule tumorali mammarie e polmonari	59
Studi di interazioni proteina-proteina mediate da proteine adattatrici di interesse patologico	61
Studi strutturali e funzionali per lo sviluppo 'structure-based' di nuovi farmaci tripanocidi	63
Il ruolo del miR-802 nel segnale dell'insulina ed il suo impatto nella sindrome di Down	65
Come contrastare la neuroinfiammazione alla base di molte malattie neurodegenerative	67
In pazienti con adenocarcinoma polmonare le cellule stromali derivate da tessuto adiposo e da tessuto polmonare in sono in grado di produrre un microambiente simile	69
L'attività di legame del miR-223 al promotore del gene Flotillina-1 ne induce l'espressione e la funzione nella regolazione del differenziamento mieloide	71
L'attivazione dell'autofagia in cellule stromali cardiache preserva un fenotipo cardioprotettivo in condizioni di stress metabolico	73
La disbiosi intestinale: una nuova chiave di lettura per l'alterata omeostasi farmacologica tiroidea	75

Spettrometria di massa: dalle proprietà intrinseche di ioni isolati all'analisi di matrici complesse

Caterina Frascchetti, Antonello Filippi

Abstract

La spettrometria di massa costituisce il core dell'attività di ricerca svolta dal SSD CHIM03 all'interno del Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Farmaco. La caratterizzazione strutturale di biomolecole ioniche ed architetture supramolecolari [1] richiede l'applicazione di diverse metodologie di spettrometria di massa. Gli studi condotti nel nostro laboratorio sono indirizzati alla determinazione delle seguenti caratteristiche: 1) l'identità chimica degli ioni selezionati e dei frammenti derivanti dalla loro dissociazione attivata collisionalmente in un esperimento MS_n (tipicamente n=2, 3); la natura e l'intensità delle interazioni non covalenti responsabili delle conformazioni molecolari (interazioni intramolecolari) e dell'organizzazione topologica all'interno di un cluster (interazioni intracomplexo), comprendendo anche gli effetti strutturali indotti dalla chiralità. Le simulazioni in-silico forniscono un ulteriore contributo alla comprensione dei risultati sperimentali.

Una dissociazione attivata collisionalmente, accessibile negli spettrometri di massa commerciali, fornisce esclusivamente il pattern di frammentazione in funzione del rapporto m/z, insufficiente per descrivere un sistema a livello molecolare. Il nostro gruppo, sfruttando la velocità e la sensibilità di uno spettrometro di massa, ha interfacciato quest'ultimo con un laser IR tunabile per misurare lo spettro IRMPD (InfraRed Multiple Photon Dissociation) delle specie isolate in fase gassosa. A titolo di esempio, qui citiamo lo spettro ESI-IRMPD della vitamina B6 protonata, che esiste in tre forme interconvertibili: piridossina, piridossamina e piridossale [2]. La caratterizzazione dettagliata della struttura di queste specie ci ha consentito di correlare la forza di un legame idrogeno con "l'impronta" spettrale (i.e. shift verso il rosso ed intensità) delle bande osservate.

La chimica analitica costituisce un ulteriore ambito di ricerca in cui il nostro gruppo è da tempo coinvolto. Una piattaforma multidisciplinare è stata allestita per studiare il metaboloma di estratti vegetali [3]. Le analisi sono state condotte mediante GC-MS (Gas-Chromatography-Mass Spectrometry) preceduta dalla pre-concentrazione del campione attraverso HS-SPME (head space-solid phase microextraction). In una recente applicazione della metodologia HS-SPME-GC-MS nell'analisi della polvere di aglio [4], abbiamo ottimizzato diversi parametri sperimentali per massimizzare l'efficienza di estrazione delle classi di composti prevalenti. Il profilo fitochimico così ottenuto è stato infine correlato con l'attività farmacologica e tossicologica delle matrici investigate.

1 Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2021, 32, 3, 736.

2 International Journal of Mass Spectrometry, 2019, 438, 148.

3 Biomolecules, 2021, 11, 2, 1.

4 Nutrients, 2021, 13, 7, 2332.

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Caterina Frascchetti: caterina.frascchetti@uniroma1.it

Mass spectrometry: from intrinsic properties of naked ions to the analysis of complex matrices

Caterina Fraschetti, Antonello Filippi

Abstract

Mass spectrometry represents the effective core of the SSD CHIM03 research activity within the Drug's Chemistry and Technology Department. Different mass spectrometric techniques aimed at answering issues concerning the structural characterization of charged biomolecules as well as noncovalent supramolecular architectures [1] in the gas phase are employed through the application of advanced hyphenated techniques. Object of our studies is the structural characterization at molecular level in order to ascertain: 1) the chemical identity of both the m/z selected ions and their relevant fragments obtained by MS n (typically $n=2, 3$) dissociation; 2) the nature and the strength of the noncovalent interactions responsible of the actual conformation of free charged molecules (intramolecular interactions) and supramolecular organization within ionic clusters (intracomplex interactions), including chiral systems. A further crucial contribution to our experimental studies comes from the in-silico simulations of the experimental gas-phase results obtained through theoretical calculations. Commercial mass spectrometers typically allow the MS n dissociation through a collisional activation that suffers the limitation to exclusively provide a m/z fragmentation pattern, in several cases insufficient to describe a molecular entity. Exploiting the speed and sensitivity of MS techniques, our research group coupled a commercial mass spectrometer with a tunable IR laser to measure the InfraRed Multiple Photon Dissociation (IRMPD) spectrum, providing detailed structural information for the isolated parent ions. As a case of study, here we cite the ESI-IRMPD spectra of the protonated water-soluble Vitamin B6, existing as three interconverting forms, namely pyridoxine, pyridoxamine and pyridoxal [2]. The detailed characterization of their structures enabled us to correlate the intramolecular hydrogen bond strength with the spectral features (i.e. red-shift and intensity) of the relevant bands.

Analytical chemistry is the parallel experimental field our expertise is devoted to. A multidisciplinary platform was set up to investigate the metabolomics of plant extracts [3]. The analyses are performed through GC-MS, coupled with a sample pre-concentration by means of HS-SPME (head space-solid phase microextraction). In our recent application of the HS-SPME-GC-MS methodology on the analysis of garlic powder [4], we tuned several experimental parameters to maximize the extraction efficiency of the prevalent classes of compounds. The phytochemical profiles obtained through GC-MS were then evaluated in relation to the pharmacological and toxicological activities of the matrices under investigation.

1 Journal of American Society for Mass Spectrometry, 2021, 32, 3, 736.

2 International Journal of Mass Spectrometry, 2019, 438, 148.

3 Biomolecules, 2021, 11, 2, 1.

4 Nutrients, 2021, 13, 7, 2332.

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Caterina Fraschetti: caterina.fraschetti@uniroma1.it

Progettazione e sviluppo di biosensori con applicazioni in campo medico

Riccarda Antiochia, Cristina Tortolini, Valeria Gigli

Abstract

La progettazione di un biosensore prevede alcuni passaggi chiave, così da ottenere una piattaforma altamente sensibile e selettiva nei confronti di un determinato composto che deve essere monitorato. Uno dei passaggi fondamentali consiste nel modificare la superficie di un elettrodo con uno specifico nanomateriale in modo da aumentare notevolmente la sensibilità finale del biosensore. A seguito di questa modifica, il nanomateriale può essere funzionalizzato con una serie di composti, come ad esempio polimeri, enzimi, antigeni ed anche anticorpi. Infine, il biosensore sviluppato viene usato in campioni biologici (sangue, urine, etc.) per monitorare, tramite specifiche analisi elettrochimiche, la presenza di uno specifico analita.

In nostro recente lavoro, viene riportata la progettazione di un immunosensore voltammetrico (dove viene sfruttata l'interazione antigene/ anticorpo) per il rilevamento di SARS-CoV-2. La piattaforma è stata costruita su un elettrodo serigrafato con nanotubi di carbonio che viene funzionalizzato con metilene blu (MB), anticorpi contro la proteina SARS-CoV-2 (SP), uno strato bioattivo di chitosano (CS) e proteina A (Pra). L'immunosensore voltammetrico è stato testato in campioni di saliva, mostrando risultati promettenti.

È stato anche sviluppato un biosensore enzimatico per monitorare i livelli di catecolammine in campioni reali, poiché alcuni comportamenti cerebrali, come stress, panico, ansia e depressione, sono strettamente dipendenti dai livelli delle principali catecolammine di interesse clinico, dopamina (DA), epinefrina (EP) e noradrenalina (NEP). Abbiamo così sviluppato il primo biosensore a base di tirosinasi (Tyr) basato su nanoparticelle chitosano (ChitNPs), per il rilevare i livelli di catecolammine totali in campioni di urina umana. L'eccellente conducibilità e la grande superficie dell'elettrodo in combinazione con le proprietà dei ChitNPs hanno permesso di ottenere buone prestazioni analitiche del biosensore in termini di breve tempo di risposta, alta sensibilità, basso limite di rilevamento e buona stabilità se testato su campioni di urina umana.

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Valeria Gigli: valeria.gigli@uniroma1.it

Design and Development of Biosensors with Applications in the Medical Field

Riccarda Antiochia, Cristina Tortolini, Valeria Gigli

Abstract

The design of a biosensor involves some key steps so as to obtain a highly sensitive and selective platform against a certain compound that must be monitored. One of the fundamental steps is to modify the surface of an electrode with a specific nanomaterial in order to greatly increase the final sensitivity of the biosensor. As a result of this modification, the nanomaterial can be functionalized with a number of compounds, such as polymers, enzymes, antigens, and even antibodies. Finally, the developed biosensor is used in biological samples (blood, urine, etc.) to monitor, through specific electrochemical analysis, the presence of a specific analyte. In our recent work, the design of a voltammetric immunosensor (where the antigen/antibody interaction is exploited) for the detection of SARS-CoV-2 was reported. The platform was built on a multi-walled carbon nanotube screen-printed electrode (SPE) functionalized with methylene blue (MB), antibodies against SARS-CoV-2 spike protein (SP), a bioactive layer of chitosan (CS) and protein A (PrA). The voltammetric immunosensor has been tested in real saliva, showing promising results.

An enzymatic biosensor has also been developed for monitoring catecholamine levels in real samples, since some brain behaviors, such as stress, panic, anxiety and depression, are strictly dependent on the levels of the main catecholamines of clinical interest, dopamine (DA), epinephrine (EP) and norepinephrine (NEP). We have designed the first tyrosinase (Tyr)-based biosensor based on chitosan nanoparticles (ChitNPs) for the detection of total catecholamines in human urine samples. The excellent conductivity and large electrode surface area in combination with the properties of ChitNPs resulted in the good analytical performance of the developed catecholamine biosensor in terms of short response time, high sensitivity, low limit of detection, good stability and satisfactory recovery when tested on spiked human urine samples.

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Valeria Gigli: valeria.gigli@uniroma1.it

Valorizzazione degli scarti alimentari: dalla caratterizzazione chimica al recupero per prodotti per la salute umana

Ingallina Cinzia, Cesa Stefania, Cairone Francesco, Spano Mattia, Di Matteo Giacomo, Ambroselli Donatella, Masciulli Fabrizio, Romano Enrico, Proietti Federica, Salvo Andrea, Mannina Luisa

Abstract

L'aumento della popolazione e la conseguente domanda di cibo, legata spesso ad un alto tasso di spreco alimentare, nonché il relativo impatto ambientale, richiedono una transizione verso pratiche più ecosostenibili. L'applicazione dei principi dell'economia circolare, nell'ottica di un sistema alimentare ad impatto zero, apre nuovi scenari nell'ambito del consumo, della gestione e della prevenzione dei rifiuti. Ogni anno vengono prodotte migliaia di tonnellate di scarti lungo la filiera ortofrutticola. È pertanto necessario trovare soluzioni adeguate a valorizzarli, considerato che molto spesso essi contengono composti bioattivi che possono rivestire un ruolo importante per la salute umana e/o come biostimolanti nella pratica agricola.

Nei nostri laboratori sono state portate avanti diverse linee di ricerca volte a recuperare e valorizzare i prodotti di scarto di alcune matrici vegetali.

Tra queste, gli scarti della filiera di produzione di carciofi e cavolfiori e gli scarti relativi alla produzione e alla raccolta del kiwi e della melagrana sono stati sottoposti ad un protocollo di estrazione "green" ed ecosostenibile e successiva caratterizzazione. L'analisi multi-metodologica (analisi spettroscopica NMR, analisi cromatografica HPLC-DAD e dello spazio di testa HS-MS/GC e analisi colorimetrica CIEL*a*b) di tutti gli scarti considerati ha evidenziato la presenza di numerose molecole con elevato potenziale biologico, spingendo la ricerca verso lo sviluppo di integratori e prodotti per la salute umana. Inoltre, sono stati messi appunto diverse procedure per la produzione di biostimolanti (costituendo una reale alternativa ai mezzi tecnici ampiamente impiegati in agricoltura per la nutrizione e la difesa delle colture spesso imputati di causare seri danni all'ambiente) e per l'ottenimento di biopolimeri (estrazione e caratterizzazione della cellulosa) con possibili applicazioni nel packaging alimentare, nella stampa 3D e/o come scaffold cellulari.

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Cinzia Ingallina: cinzia.ingallina@uniroma1.it

Food waste valorization: from chemical characterization to recovery for human health products

Ingallina Cinzia, Cesa Stefania, Cairone Francesco, Spano Mattia, Di Matteo Giacomo, Ambroselli Donatella, Masciulli Fabrizio, Romano Enrico, Proietti Federica, Salvo Andrea, Mannina Luisa

Abstract

The population increase and the consequent demand for food, often linked to a high rate of food waste, as well as the related environmental impact, require a transition towards more eco-sustainable practices. The application of the principles of the circular economy, with a view to a zero impact food system, opens up new scenarios in the field of waste consumption, management and prevention. Thousands of tons of waste along the fruit and vegetable supply chain are produced every year. It is therefore necessary to find adequate solutions to enhance them, considering that they contain bioactive compounds that can play an important role for human health and/or as biostimulants in agricultural practice.

In our laboratories various lines of research have been carried out with the aim of recovering and enhancing the waste products of some vegetable matrices.

Among these, waste from the artichoke and cauliflower production chain and the waste relating to the production and harvesting of kiwi and pomegranate were subjected to a "green" and eco-sustainable extraction protocol and subsequent characterization. The multi-methodological analysis (NMR spectroscopic analysis, HPLC-DAD chromatographic analysis, HS-MS/GC headspace analysis and CIEL*a*b colorimetric analysis) of all the considered wastes underlined the presence of numerous molecules with high biological activity, pushing research towards the development of supplements and products for human health. Furthermore, various procedures have been implemented for the production of biostimulants (constituting a real alternative to the technical means widely used in agriculture for the nutrition and defense of crops often accused of causing serious damage to the environment) and for obtaining biopolymers (cellulose extraction and characterization) with possible applications in food packaging, 3D printing and/or as cellular scaffolds.

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Cinzia Ingallina: cinzia.ingallina@uniroma1.it

Le mille sfaccettature della chiralità

Claudio Villani, Shilashi Oljira Badasa, Alessia Ciogli, Martina de Angelis, Maria Aurora Guarducci, Simone Manetto, Marco Pierini, Andrea Sorato, Giulia Mazzocanti

Abstract

Le attività di ricerca sia in ambito accademico che industriale mostrano un crescente interesse verso nuove ed efficienti metodologie per l'ottenimento di singoli enantiomeri di sostanze chirali di rilevanza biologica. Una forza trainante nella ricerca di base ed applicata in questo settore è la richiesta di metodi efficaci ed economici per la produzione su larga scala di prodotti ad alto valore aggiunto, che sono cruciali per l'industria farmaceutica ed agroalimentare. L'attività biologica osservata per un farmaco racemico (e per altre specie bioattive) spesso risiede in un singolo enantiomero, ed in alcuni casi uno dei due enantiomeri produce effetti tossici indesiderati. Pertanto, le agenzie regolatorie richiedono la valutazione separata di ciascun enantiomero nello sviluppo di farmaci chirali e raccomandano l'adozione di formulazioni con singolo enantiomero quando i dati sperimentali dimostrano la sua superiorità nei confronti del racemo. Gli ultimi due decenni hanno infatti testimoniato la continua crescita nell'impiego di farmaci chirali enantiopuri e un parallelo aumento nel numero di nuove e raffinate metodologie per la sintesi enantioselettiva e la separazione di farmaci chirali e intermedi e per la loro caratterizzazione spettroscopica. Molti gruppi di ricerca accademici e importanti operatori industriali sono impegnati nell'ampliamento del loro bagaglio delle cosiddette "chiro-tecnologie", in modo di essere potenzialmente in grado di produrre rapidamente e con notevole versatilità composti enantiopuri dalla in quantità variabili. (1) Attualmente, sono utilizzate diverse metodologie per la preparazione di composti bioattivi enantiopuri, mediante processi di sintesi o di separazione, e per la loro caratterizzazione stereochimica. Le procedure di sintesi oggi disponibili possono soffrire di una limitata applicabilità e versatilità, difficile scalabilità, e per le versioni catalitiche può presentarsi il problema dell'inattivazione e del riciclo del catalizzatore. (1,2)

In questo contributo vorremmo illustrare gli ultimi risultati ottenuti in studi condotti nel nostro laboratorio nell'ambito di sviluppo di fasi stazionarie chirali, studio di stereolabilità di composti chirali analizzati mediante tecniche Dynamic-HPLC e Dynamic-NMR e approccio di modellistica molecolare, reazioni a flusso e separazioni enantioselettive ultra-performanti.

1. E. M. Carreira, L. Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, 2009 Wiley-VCH
2. J. Aleman et al. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 774-793

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Giulia Mazzocanti: giulia.mazzocanti@uniroma1.it

The thousand facets of chirality

Claudio Villani, Shilashi Oljira Badasa, Alessia Ciogli, Martina de Angelis, Maria Aurora Guarducci, Simone Manetto, Marco Pierini, Andrea Sorato, Giulia Mazzocanti

Abstract

Academic and industrial activities show an increasing interest in new and efficient methodologies leading to pure single enantiomers of biologically relevant chiral substances. Biochemical processes in living organisms rely on a plethora of molecular reactions and interactions involving chiral molecules. These processes often show different responses to the enantiomers of exogenous or endogenous chemicals. A major driving force fostering basic and applied research in this field is the quest for efficient and cost-effective methods for the large-scale production of value-added products that are crucial for the pharmaceutical, agrochemical and food industries. In fact, it has been accepted since the early 1980s that most of the biological activity observed for a racemic drug (and for other bioactive species) often resides within a single enantiomer. In some cases, the therapeutic effects of chiral drugs reside on a single drug enantiomer, whereas the other enantiomer displays unwanted toxic effects. Thus, regulatory agencies have required separate evaluations of each enantiomer in developing chiral drugs and recommended the adoption of single-enantiomer dosage when experiments support its superiority over the racemate. The last two decades have indeed witnessed the continuous growth of usage of chiral drugs in single-enantiomer forms and a parallel increase in the number of new and refined methodologies for the enantioselective synthesis and separation of chiral drugs and intermediates and for their spectroscopic characterization. Academic research groups and leading industrial players are striving to extend their portfolio of the so called “chiral technologies” on hand, allowing them for quick and flexible production of enantiopure compounds from the gram to production scales.(1) Several efficient methodologies are available today for the preparation of enantiopure bioactive compounds, either synthetic or based on separation procedures, and for their stereochemical characterization. Synthetic procedures may suffer from limited scope, versatility, and difficult scalability, and the catalytic versions present catalyst poison and recovery problems. (2,3)

In this contribution, we would like to illustrate the latest results obtained in studies conducted in our laboratory in the field of development of chiral stationary phases, the study of stereolability of chiral compounds analyzed by Dynamic-HPLC and Dynamic-NMR techniques and molecular modelling approach, flow reactions, ultra-performant enantioselective separations.

1. E. M. Carreira, L. Kvaerno, *Classics in Stereoselective Synthesis*, 2009 Wiley-VCH
2. J. Aleman et al. *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 774-793

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Giulia Mazzocanti: giulia.mazzocanti@uniroma1.it

Recenti progressi nello studio di nanomedicine basate su molecole anfifiliche presso il Dipartimento di Chimica e Tecnologie del Farmaco: drug delivery e nuove speranze

Federica Rinaldi, Jacopo Forte, M. Gioia Fabiano, Patrizia N. Hanieh, Carlotta Marianecchi, Maria Carafa

Abstract

La somministrazione efficiente e sicura dei farmaci è sempre stata una sfida in terapia e diagnostica. L'uso della nanotecnologia, così come lo sviluppo di nanovettori per la somministrazione di farmaci, ha ricevuto grande attenzione in base all'evidenza che essi possano agire come "proiettili magici" in grado di colpire le cellule bersaglio evitando i tessuti e gli organi normali. La biodisponibilità dei composti attivi può essere aumentata se caricati in nanosistemi come liposomi o niosomi, nanobolle (NB) e nanoemulsioni (NE).

I niosomi ed i liposomi sono stati ampiamente studiati come sistemi di somministrazione di farmaci per diverse applicazioni e vie di somministrazione. Il loro comportamento in vitro/in vivo dipende sia dalle proprietà fisico-chimiche che dal metodo di preparazione.

Le NE sono sistemi colloidali stabilizzati da tensioattivi o miscele di tensioattivi, generalmente biocompatibili e biodegradabili. L'olio selezionato potrebbe essere in grado di agire in maniera sinergica con i farmaci caricati. Le NE olio in acqua (O/A) sono state proposte come formulazioni farmaceutiche e cosmetiche, in particolare per molecole lipofile che possono essere incorporate e protette nelle nanogoccioline della fase oleosa interna composta da oli vegetali, ricchi di antiossidanti insieme a grassi insaturi, acidi, fitosteroli e vitamine o oli essenziali che contribuiscono allo sviluppo e al mantenimento della salute e del benessere [1]. Diversi nanocarrier sono stati preparati e caratterizzati nei nostri laboratori per la somministrazione orale, oculare, dermica e transdermica ed in particolare per il rilascio a livello polmonare e cerebrale, attraverso vie alternative come quella naso-cervello [2]. Diverse condizioni caratteristiche delle aree patologiche o del tessuto bersaglio, potrebbero fornire condizioni per un rilascio potenziato/controllato del farmaco ed un migliore assorbimento cellulare. Gli stimoli tipici nei tessuti patologici includono variazioni di pH e redox [3].

La teranostica è un campo emergente della medicina derivato dalla possibilità di ottenere terapie e diagnostica dallo stesso nanocarrier. I farmaci e/o le tecniche sono combinati in modo univoco per diagnosticare e trattare condizioni mediche simultaneamente o in sequenza. Le NB, stabilizzate da doppi strati anfifilici, sono state studiate come piattaforma teranostica per il rilascio localizzato di farmaci incapsulati e/o molecole diagnostiche [4].

Poiché la ricerca e lo sviluppo di sistemi intelligenti di somministrazione dei farmaci è al centro di molti degli studi più recenti, una migliore caratterizzazione e la comprensione dei meccanismi di somministrazione diventano un obiettivo fondamentale. Infatti, l'appropriato controllo delle proprietà dei nanocarrier in vivo, mediante modifiche strutturali, viene spesso utilizzato per ottenere il targeting di organi o tessuti patologici e per conferire sensibilità a stimoli specifici di determinati ambienti e/o aree patologiche. È evidente che la grande opportunità per questo settore di ricerca consiste nella sua natura altamente interdisciplinare dalla chimica e fisica di base alle valutazioni biologiche e cliniche. Ciò significa che ci sono ancora molte sfide aperte che devono essere superate e ci sono ancora molte opportunità di collaborazione.

[1] Maurizi L., et al. (2022) *Pharmaceutics*, 14, 2662.

[2] Rinaldi, et al. (2019) *Journal of Controlled Release*, 294, pp. 17-26.

[3] Rinaldi F., et al. (2022) *International Journal of Pharmaceutics*, 613, 121391.

[4] Hanieh P.N., et al. (2022) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 46,102611.

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Federica Rinaldi: federica.rinaldi@uniroma1.it

Some recent advances on amphiphile-based nanomedicines at the department of chemistry and technology of drugs: drug delivery and new hopes

Federica Rinaldi, Jacopo Forte, M. Gioia Fabiano, Patrizia N. Hanieh, Carlotta Marianecchi, Maria Carafa

Abstract

Efficient and safe drug delivery has always been a challenge in therapy and diagnostics. The use of nanotechnology, as well as the development of nanocarriers for drug delivery, received great attention according to the evidence that they can theoretically act as “magic bullets” able to hit the target cells while sparing normal tissues and organs. The bioavailability of active compounds can be increased if loaded in nanosystems such as liposomes or niosomes, nanobubbles (NBs) and nanoemulsions (NEs).

Niosomes and liposomes have been extensively studied as drug delivery systems for different applications and administration routes. Their in vitro/in vivo behaviour depend both on their physical-chemical properties and on the preparation method.

NEs are colloidal systems stabilized by surfactants or surfactant mixtures. that are generally biocompatible and biodegradable. The selected oil could be able to act in a synergic manner with the loaded drugs. Oil-in-water (O/W) NEs have been proposed for drug and cosmetic formulations, notably for lipophilic molecules that can be incorporated and protected in the nanodroplets of the inner oil phase composed by vegetable oils, rich in antioxidants along with unsaturated fatty acids, phytosterols and vitamins, or essential oils contributing to the development and maintenance of health and well-being [1].

Several nanocarriers have been prepared and characterized in our labs to deliver active compounds for oral, ocular, dermal and transdermal administration and particular attention has been payed to lung delivery and brain delivery, by alternative route such as nose-to-brain [2].

Different stimuli, intrinsically characteristic of the pathological areas or of the target tissue, could provide enhanced/controlled drug release, improved cellular drug uptake, controlled intracellular drug fate. Typical stimuli in pathological tissues include pH and redox conditions [3].

Theranostics is a emerging field of medicine derived from the possibility to achieve therapeutics and diagnostics by the same nanocarrier. Drugs and/or techniques are uniquely combined to simultaneously or sequentially diagnose and treat medical conditions. NBs, stabilized by amphiphilic bilayers, have been studied as a theranostic platform for the localized delivery of encapsulated drugs and/or diagnostic molecule [4].

Since research and development for smart drug delivery systems is at the very core of many of the pharmaceutical investigations, a better characterization and the understanding of the delivery mechanisms become a fundamental goal. In fact, the appropriate control of nanocarrier in vivo properties, by structure modifications, are often used to achieve targeting to pathological organs or tissues and to impart sensitivity to specific stimuli of certain environments and/or pathological areas. It is evident that the big chance to the field consists in its highly interdisciplinary nature from basic chemistry and physic to biological and clinical evaluations. This means there are still many open challenges that need to be overcome and there are still opportunities for academic and industrial scientists to make a decisive impact.

[1] Maurizi L., et al. (2022) *Pharmaceutics*, 14, 2662.

[2] Rinaldi, F., et al. (2019) *Journal of Controlled Release*, 294, pp. 17-26.

[3] Rinaldi F., et al. (2022) *International Journal of Pharmaceutics*, 613, 121391.

[4] Hanieh P.N., et al. (2022) *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 46,102611.

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Federica Rinaldi: federica.rinaldi@uniroma1.it

Portali WEB utili per la ricerca scientifica e la didattica

Rino Ragno, Manuela Sabatino, Eleonora Proia, Filippo Umberto Sapienza

Abstract

Il gruppo di ricerca Rome Center for Molecular Design (RCMD) svolge attività di ricerca principalmente in due distinti ambiti: la modellazione molecolare applicata alla progettazione di molecole bioattive[1] e l'estrazione e caratterizzazione chimica e biologica di oli essenziali (EO) [2]. Negli ultimi anni l'attenzione è stata anche rivolta allo sviluppo di portali web sia di interesse scientifico che didattico [3, 4]. Nel caso della modellazione molecolare dal 2016 è attivo il sito web www.3d-qsar.com che attualmente conta oltre 4000 utenti registrati. Mediante la minima informazione necessaria che consta in una serie di molecole con associate le attività biologiche o fisiche, il portale permette all'utente di svolgere tutte le necessarie operazioni per sviluppare modelli predittivi sia con metodiche ligand-based (LB) che structure-based (SB). In particolare per i metodi LB si possono fare modelli tridimensionali di piccole molecole organiche mediante un editor oppure a partire da strutture SMILES ed effettuare l'analisi conformazionale con diversi algoritmi. Quindi si possono sovrapporre le molecole per sviluppare dei modelli di relazione struttura-attività di tipo quantitativo e tridimensionali (3D QSAR). I modelli possono quindi essere utilizzati per predire l'attività biologica di molecole non ancora sintetizzate permettendo così una progettazione razionale. Il sito dispone di tutte le visualizzazioni grafiche necessarie a progettare nuove possibili molecole bioattive. Per quanto riguarda i metodi SB il sito si interfaccia con il protein database (www.rcsb.org) e con il minimo impegno informatico è possibile studiare come molecole bioattive potrebbero interagire con una determinata proteina o altro obiettivo biologico. Il sito è fruibile gratuitamente per tutti per scopi senza profitto.

Per quanto riguarda gli EO l'RCMD ha anche realizzato un portale, informalmente chiamato PyEO (eo.3d-qsar.com), che raccoglie dati sperimentali da letteratura. Nell'arco di 4 anni sono state analizzate oltre 5000 pubblicazioni ed inseriti i dati da 1183 che hanno permesso di compilare un database di oltre 2600 estratti (composizioni di EO) riconducibili a circa 1100 diverse piante aromatiche e associati ad oltre 20500 dati di attività biologica (MIC, IC50, Ki, Kd, ecc.) e/o antiossidante. Il portale rappresenta un base di dati che sarà utilizzata per la produzione di modelli di relazione composizione-attività di tipo quantitativo (QSAR) che permetteranno di predire l'attività biologica di EO a composizione nota [5]. In futuro i dati elaborati potranno anche essere utilizzati per progettare EO mediante la miscelazione razionale di diversi oli essenziali oppure utilizzando i componenti puri disponibili in commercio.

1. Proia, E., et al., Ligand-based and structure-based studies to develop predictive models for SARS-CoV-2 main protease inhibitors through the 3d-qsar.com portal. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2022. 36(7): p. 483-505.
2. Taglienti, A., et al., In vivo Antiphytoviral Activity of Essential Oils and Hydrosols From *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* to Control Zucchini Yellow Mosaic Virus and Tomato Leaf Curl New Delhi Virus in *Cucurbita pepo* L. *Frontiers in Microbiology*, 2022. 13.
3. Ragno, R., www.3d-qsar.com: a web portal that brings 3-D QSAR to all electronic devices-the Py-CoMFA web application as tool to build models from pre-aligned datasets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2019. 33(9): p. 855-864.
4. Ragno, R., et al., Teaching and Learning Computational Drug Design: Student Investigations of 3D Quantitative Structure-Activity Relationships through Web Applications. *Journal of Chemical Education*, 2020. 97(7): p. 1922-1930.
5. Artini, M., et al., Essential Oils Biofilm Modulation Activity and Machine Learning Analysis on *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Microorganisms*, 2022. 10(5).

Dipartimento di Chimica e tecnologie del farmaco

Manuela Sabatino: manuela.sabatino@uniroma1.it

WEB sites useful for scientific application and teaching

Rino Ragno, Manuela Sabatino, Eleonora Proia, Filippo Umberto Sapienza

Abstract

The Rome Center for Molecular Design (RCMD) group is involved in researches mainly focused to the design of bioactive molecules through molecular modeling techniques [1] and extraction, chemical and biological characterization of essential oils (EO) [2]. During the last years RCMD has also spent efforts in developing scientific web portals also useful for teaching purposes [3, 4]. Since 2016 the www.3d-qsar.com portal is active in the field of drug design and more than 4000 users have signed in. The portal enables any user to build either ligand-based (LB) or structure-based (SB) predictive models starting with as low data as the list of bioactive molecules and their associated biological or physical properties. For LB methods the user can model three-dimensional (3D) conformation of small organic molecules by means of a chemical editor or by importing SMILES structures. Conformational analysis and molecular alignment through different algorithms lead to the development of 3D quantitative structure-activity relationships (3D QSAR) models that can be directly analyzed either graphically or numerically to design new molecules to be predicted for their potential bioactivity. Regarding SB, www.3d-qsar.com let the user to perform binding mode investigations for bioactive molecule in their biotarget binding site. The www.3d-qsar.com portal is free to anyone for not profit use.

RCMD has also realized a brand-new portal for EO, temporarily called PyEO and reachable at eo.3d-qsar.com. This site is under compilation with experimental data mainly from literature and in 4-year time more than 5000 scientific articles have been analyzed and 1183 of them have led to set up a database of more than 2600 EO extracts connected to about 1100 aromatic plants and with more than 20500 biological (MIC, IC50, Ki, Kd, ecc.) or antioxidant properties. PyEO represent an important source of data that will enable the development of various quantitative composition-activity relationships (QCAR) models useful to predict the biological activity of EO with known composition [5]. In the next years PyEO data and models will allow to design EO mixture or mixture of commercially available pure compounds.

1. Proia, E., et al., Ligand-based and structure-based studies to develop predictive models for SARS-CoV-2 main protease inhibitors through the 3d-qsar.com portal. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2022. 36(7): p. 483-505.
2. Taglienti, A., et al., In vivo Antiphytoviral Activity of Essential Oils and Hydrosols From *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* to Control Zucchini Yellow Mosaic Virus and Tomato Leaf Curl New Delhi Virus in *Cucurbita pepo* L. *Frontiers in Microbiology*, 2022. 13.
3. Ragno, R., et al., Teaching and Learning Computational Drug Design: Student Investigations of 3D Quantitative Structure-Activity Relationships through Web Applications. *Journal of Chemical Education*, 2020. 97(7): p. 1922-1930.
4. Ragno, R., www.3d-qsar.com: a web portal that brings 3-D QSAR to all electronic devices-the Py-CoMFA web application as tool to build models from pre-aligned datasets. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2019. 33(9): p. 855-864.
5. Artini, M., et al., Essential Oils Biofilm Modulation Activity and Machine Learning Analysis on *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients. *Microorganisms*, 2022. 10(5).

Department: Chemistry and Technology of Drugs

Manuela Sabatino: manuela.sabatino@uniroma1.it

Sviluppo e validazione di un modello di Intelligenza Artificiale per la previsione della recidiva dell'epatocarcinoma dopo trapianto di fegato

Quirino Lai,¹ Carmine De Stefano,² Jean Emond,³ Prashant Bhangui,⁴ Toru Ikegami,⁵ Benedikt Schaefer,⁶ Maria Hoppe-Lotichius,⁷ Anna Mrzljak,⁸ Takashi Ito,⁹ Marco Vivarelli,¹⁰ Giuseppe Tisone,¹¹ Salvatore Agnes,¹² Giuseppe M. Ettorre,¹³ Massimo Rossi,¹ Emmanuel Tsochatzis,¹⁴ Chung Mau Lo,¹⁵ Chao-Long Chen,¹⁶ Umberto Cillo,¹⁷ Matteo Ravaioli,¹⁸ Jan P Lerut;¹⁹ on behalf of the EurHeCaLT and the West-East LT Study Group

1. Sapienza University of Rome, Italy; 2. Polytechnic of Turin, Italy; 3. Columbia University, New York, US; 4. Medanta-The Medicity, Gurgaon, India; 5. Kyushu University, Fukuoka, Japan; 6. Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; 7. Universitätsmedizin Mainz, Mainz, Germany; 8. Merkur University of Zagreb, Zagreb, Croatia; 9. Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; 10. Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy; 11. University of Rome-Tor Vergata, Rome, Italy; 12. Catholic University - Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Rome, Italy; 13. San Camillo Hospital, Rome, Italy; 14. Royal Free Hospital, London, UK; 15. University of Hong Kong, Hong Kong SAR of China; 16. Chang Gung University College of Medicine, Kaohsiung, Taiwan; 17. University of Padua, Padua, Italy; 18. Bologna University, Bologna, Italy; 19. Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Abstract

Il trapianto di fegato (LT) rappresenta la migliore terapia per la cura di pazienti ben selezionati con carcinoma epatocellulare (HCC). Tuttavia, identificare i pazienti ad alto rischio di recidiva di HCC dopo LT rappresenta un problema rilevante. Diversi centri si sono concentrati sullo sviluppo di calcolatori in grado di migliorare la prognosi, ma manca ancora uno score facile da utilizzare che possa essere applicato in tutto il mondo.

Il presente studio mira a sviluppare e convalidare un accurato calcolatore di previsione della recidiva dopo LT utilizzando il metodo di machine learning. Lo studio è stato registrato presso ClinicalTrials.gov con numero: NCT05200195.

Due diversi database internazionali sono stati unificati con l'intento di esplorare il presente problema: il gruppo di studio EurHeCaLT e l'East-West Consortium. Un totale di 3.670 pazienti con HCC trapiantati durante il periodo 2000-2018 in 17 centri europei e asiatici componevano la coorte internazionale. La coorte internazionale è stata suddivisa per generare un Training Set e un Validation Set (80/20%). Il Test Set consisteva in 356 pazienti con HCC trapiantati presso la New York Columbia University durante lo stesso periodo. Analizzando i dati del Training Set con un Cox proportional hazards deep neural network, è stato sviluppato il modello Time_Radiological-response_Alpha-fetoprotein_Artificial-Intelligence (TRAIN-AI). Il Validation Set e il Test Set sono stati utilizzati per la validazione interna ed esterna del modello. La capacità prognostica del TRAIN-AI è stata confrontata con altri algoritmi di rischio di recidiva attualmente disponibili, come il Metroticket 2.0, l'AFP-French model e i criteri Up-to-seven.

Il modello TRAIN-AI ha mostrato una concordanza di 0,77 (95%CI=0,72-0,82) nel Validation Set e 0,77 (95%CI=0,70-0,84) nel Test Set, superando sempre significativamente gli altri criteri prognostici sia nella validazione interna che in quella esterna.

Con l'intento di chiarire l'entità del miglioramento della previsione ottenuto utilizzando lo score TRAIN-AI, sono stati calcolati anche il punteggio di Brier e il punteggio del Brier Skill. Partendo dalla considerazione che il miglior punteggio ottenibile presenta un Brier Score=0, il TRAIN-AI ha riportato il valore più basso tra i diversi criteri sia nel Validation che nel Test Set.

Per quanto riguarda la calibrazione del modello in ogni singolo paziente, le sopravvivenze attese corrispondevano strettamente alle sopravvivenze osservate, riportando una calibrazione del modello complessivamente molto buona.

Lo score TRAIN-AI proposto presenta un'accuratezza maggiore rispetto ad altri criteri disponibili per quanto riguarda il rischio di recidiva post-LT. È stato sviluppato un calcolatore web di facile utilizzo per migliorare la disponibilità del modello all'indirizzo <https://www.train-ai.ml>.

Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica

Quirino Lai: quirino.lai@uniroma1.it

Development and validation of an Artificial Intelligence model for predicting post-transplant hepatocellular cancer recurrence

Quirino Lai,1 Carmine De Stefano,2 Jean Emond,3 Prashant Bhangui,4 Toru Ikegami,5 Benedikt Schaefer,6 Maria Hoppe-Lotichius,7 Anna Mrzljak,8 Takashi Ito,9 Marco Vivarelli,10 Giuseppe Tisone,11 Salvatore Agnes,12 Giuseppe M. Ettore,13 Massimo Rossi,1 Emmanuel Tsochatzis,14 Chung Mau Lo,15 Chao-Long Chen,16 Umberto Cillo,17 Matteo Ravaioli,18 Jan P Lerut;19 on behalf of the EurHeCaLT and the West-East LT Study Group

1. Sapienza University of Rome, Italy; 2. Polytechnic of Turin, Italy; 3. Columbia University, New York, US; 4. Medanta-The Medicity, Gurgaon, India; 5. Kyushu University, Fukuoka, Japan; 6. Medical University of Innsbruck, Innsbruck, Austria; 7. Universitätsmedizin Mainz, Mainz, Germany; 8. Merkur University of Zagreb, Zagreb, Croatia; 9. Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; 10. Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy; 11. University of Rome-Tor Vergata, Rome, Italy; 12. Catholic University - Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Rome, Italy; 13. San Camillo Hospital, Rome, Italy; 14. Royal Free Hospital, London, UK; 15. University of Hong Kong, Hong Kong SAR of China; 16. Chang Gung University College of Medicine, Kaohsiung, Taiwan; 17. University of Padua, Padua, Italy; 18. Bologna University, Bologna, Italy; 19. Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium.

Abstract

Liver transplantation (LT) represents the best therapy for the cure of well-selected patients with hepatocellular cancer (HCC). However, identifying patients at high risk for HCC recurrence after LT is a challenging issue. Several centers focused on the development of tools able to improve the prognosis, but a user-friendly score able to be used worldwide is still missing.

The present study aims to develop and validate an accurate post-LT recurrence prediction calculator using the machine learning method. The study was registered with a ClinicalTrials.gov number: NCT05200195. Two different international efforts have been merged with the intent to explore the present issue, namely the EurHeCaLT study group and the East-West Consortium. A total of 3,670 HCC patients transplanted during the period 2000-2018 in 17 European and Asian centers composed the International Cohort. The International Cohort was split to generate a Training and a Validation Set (80/20%). The Test Set consisted of 356 HCC patients transplanted at the New York Columbia University during the same period. Analyzing the Training Set data with a Cox proportional hazards deep neural network, the Time_Radiological-response_Alpha-fetoprotein_Artificial-Intelligence (TRAIN-AI) model was developed. The Validation Set and the Test Set were used for internal and external validation of the model. The prognostic ability of the TRAIN-AI was compared to other currently available recurrence risk algorithms, like the Metroticket 2.0, the AFP-French Model, and the Up-to-seven criteria. The TRAIN-AI model showed a concordance of 0.77 (95%CI=0.72-0.82) in the Validation Set and 0.77 (95%CI=0.70-0.84) in the Test Set, always significantly outperforming the other scores in both the internal and external validation cohorts.

With the intent to clarify the magnitude of prediction improvement obtained using the TRAIN-AI score, the Brier score and the Brier Skill Score were also calculated. Starting from the consideration that the best achievable score presents a Brier Score=0, the TRAIN-AI reported the lowest value among the different criteria in both the Validation and Test Sets.

As for the calibration of the model in each individual patient, the expected survivals matched closely the observed survivals, reporting an overall very good calibration of the model.

The proposed TRAIN-AI score had a higher accuracy than other available criteria regarding post-LT recurrence risk. A web calculator has been developed to improve the user-friendly availability of the model (<https://www.train-ai.ml>).

Department: General and Specialist Surgery

Quirino Lai: quirino.lai@uniroma1.it

Valutazione dell'espressione dei fattori prognostici molecolari in pazienti affetti da carcinoma neuroendocrino a grandi cellule del polmone (L-LCNEC)

Camilla Poggi, Ylenia Pecoraro, Carolina Carillo, Jacopo Vannucci, Daniele Diso, Marco Anile, Tiziano De Giacomo, Davide Amore, Massimiliano Bassi, Sara Cagnetti, Emilia Mottola, Martina Bianco, Rita Vaz Sousa, Anastasia Centofanti, Francesco Ferrante, Antonio Pio Evangelista, Valerio Sebastianelli, Francesco Maria Mattoccia, Federico Venuta

Abstract

Il carcinoma neuroendocrino a grandi cellule del polmone (L-LCNEC) è un raro ed aggressivo istotipo tumorale con una sopravvivenza complessiva del 35% a 5 anni. La prognosi di LCNEC metastatici è scarsa e le opzioni di trattamento di prima linea sono molto dibattute, in assenza di trattamenti di seconda linea ben definiti. Ad oggi, non è stato ancora sviluppato un regime di trattamento standard. Sono stati riportati alcuni casi di pazienti trattati con immunoterapia, spesso con una buona risposta radiologica e clinica, in particolare dopo fallimento del trattamento di prima linea a base di platino.

La chirurgia rappresenta un fattore prognostico indipendente positivo per la overall survival (OS). Nei pazienti sottoposti a trattamento chirurgico radicale la prognosi resta severa (al I stadio sopravvivenza a 5 anni del 27-67%). Nell'era dell'immunoterapia e delle terapie mirate, sono disponibili pochi dati riguardanti i LCNEC. Il Next generation sequencing ha identificato sottotipi di LCNEC rilevanti per la prognosi e la risposta alla terapia, ma sono necessari ulteriori studi per definire meglio l'impatto clinico di questi risultati. Inoltre, esistono pochi dati sull'espressione di PD-L1 nei LCNEC e sul valore predittivo di quest'ultimo in merito all'efficacia dell'immunoterapia. In letteratura sono riportati alcuni casi di LCNEC metastatici portatori di mutazioni driver, in particolare mutazione di EGFR e, ancor più raramente, riarrangiamenti di ALK che mostrano efficacia della targeted therapy.

Il progetto prevede di analizzare tutte le neoplasie polmonari con istotipo carcinoma neuroendocrino a grandi cellule del polmone (L-LCNEC) resecate. Identificata la popolazione oggetto di studio, si esaminerà l'eventuale presenza di infiltrato linfocitario intratumorale (TILS) che verrà quantificato secondo la classificazione di Salgado, verranno quindi effettuate le colorazioni immunoistochimiche per PD-L1 (clone SP263, piattaforma Ventana) per valutare l'espressione del biomarcatore sia sulle cellule neoplastiche che su quelle infiammatorie, per ROS-1 (clone D4D6, piattaforma Ventana) e per ALK (clone D5F3, piattaforma Ventana). Attraverso Next generation sequencing saranno esaminati EGFR, K-RAS, B-RAF, MET e NTRK.

In virtù di quanto già noto, della biologia del LCNEC e delle recenti scoperte di genetica applicata e nei riguardi dell'immuno-microenvironment, la ricerca di queste alterazioni molecolari nell'ambito del nostro progetto potrebbe fornire nuovi dati per confermare/confutare le poche contraddittorie evidenze presenti in Letteratura nel tentativo di identificare il migliore approccio terapeutico per queste neoplasie.

Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica

Camilla Poggi: camilla.poggi@uniroma1.it

Evaluation of the expression of molecular prognostic factors in patients with large cell neuroendocrine carcinoma of the lung (L-LCNEC)

Camilla Poggi, Ylenia Pecoraro, Carolina Carillo, Jacopo Vannucci, Daniele Diso, Marco Anile, Tiziano De Giacomo, Davide Amore, Massimiliano Bassi, Sara Cagnetti, Emilia Mottola, Martina Bianco, Rita Vaz Sousa, Anastasia Centofanti, Francesco Ferrante, Antonio Pio Evangelista, Valerio Sebastianelli, Francesco Maria Mattoccia, Federico Venuta

Abstract

Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung (L-LCNEC) is a rare and aggressive tumor histology with an overall survival of 35% at 5 years. The prognosis of metastatic LCNEC is poor and first-line treatment options are highly debated, considering the lack of well-defined second-line treatments. To date, a standard treatment regimen has not been developed yet. A few cases of patients treated with immunotherapy have been reported, often with a good radiological and clinical response, particularly after failure of platinum-based first-line treatment.

Surgery is an independent positive prognostic factor for overall survival (OS). In patients undergoing radical surgical treatment, the prognosis remains severe (in stage I 5-year survival of 27-67%). In the era of immunotherapy and targeted therapies, little data regarding LCNECs are available and even fewer projects have been published regarding future options on this field. Next generation sequencing has identified LCNEC subtypes which proved to be relevant for prognosis and response to therapy. Indeed, further studies are needed to better define the clinical impact of these findings. Furthermore, there are few data on PD-L1 expression in LCNECs and on the predictive value of check point inhibitors for the efficacy of immunotherapy. Besides, sparse literature reports present some cases of metastatic LCNEC carrying driver mutations, in particular EGFR mutation and, even more rarely, ALK rearrangements potentially showing efficacy for targeted therapy.

The study project aims at analyzing all lung neoplasms with resected large cell neuroendocrine carcinoma (L-LCNEC) histology. Once the study population has been identified, the possible presence of intratumoral lymphocytic infiltrate (TILS) will be examined and quantified according to the Salgado classification. Then immunohistochemical staining for PD-L1 (SP263 clone, Ventana platform) will be performed to evaluate the expression of the biomarker on both neoplastic and inflammatory cells, for ROS-1 (clone D4D6, Ventana platform) and for ALK (clone D5F3, Ventana platform). Through Next generation sequencing EGFR, K-RAS, B-RAF, MET and NTRK will be examined.

Considering what is already known on the biology of the LCNEC and due to the recent discoveries in applied genetics and concerning the immuno-microenvironment, the search for these molecular signs might provide new data to confirm/refute the few contradictory findings shown in the recent preliminary literature data. The study is designed to generate hypothesis for future studies to finally identify the best therapeutic approach for these neoplasms.

Department: General and Specialist Surgery

Camilla Poggi: camilla.poggi@uniroma1.it

Risultati di un'esperienza prospettica multicentrica di stenting carotideo con uso di stent C-Guard – Lo studio IronGuard 2

P. Sirignano, W. Mansour, F. Speziale, E. Sbarigia, R. Gattuso, O. Martinelli, S. Cuzzo, A. Di Girolamo, L. di Marzo

Abstract

OBIETTIVI Questo studio ha avuto come obiettivo quello di valutare la sicurezza e l'efficacia degli stent carotideo a doppia maglia per le procedure di stenting dell'arteria carotidea (CAS) nella pratica clinica.

CONTESTO Notoriamente, se confrontata con l'endoarterectomia carotidea, la CAS è associata a un più alto tasso di eventi neurologici avversi nell'immediato periodo post procedurale; questi eventi potrebbero essere correlati a frammenti di placca che prollasso attraverso la rete dello stent. Di conseguenza, la necessità di una maggiore copertura della placca ha portato allo sviluppo di sistemi di stent carotideo a doppio strato, come quello analizzato nel presente studio.

METODI Da gennaio 2017 a giugno 2019, questo registro prospettico, multispecialistico, spontaneo ha arruolato 733 pazienti consecutivi sottoposti a CAS utilizzando il sistema di prevenzione embolica CGuard in 20 centri. L'endpoint primario era rappresentato dal tasso di incidenza di ictus fino a 12 mesi dalla procedura; gli endpoint secondari erano il successo tecnico e procedurale; l'occlusione dell'arteria carotide esterna; il tasso di attacco ischemico transitorio (TIA), infarto miocardico acuto (AMI) e mortalità durante il ricovero ospedaliero, a 30 giorni, e 12 mesi di follow-up.

RISULTATI Centotrentuno pazienti (17,87%) sono stati sottoposti a CAS per stenosi carotidea sintomatica. Un dispositivo di protezione embolica è stato utilizzato in 731 (99,72%) pazienti. Il successo procedurale è stato del 100%, il successo tecnico è stato ottenuto in tutti i pazienti tranne 1 (99,86%), deceduto in ospedale a causa di un ictus emorragico. Sei TIA, 2 ictus minori e 1 IMA si sono verificati durante la degenza ospedaliera e l'occlusione dell'arteria carotide esterna era evidente in 8 (1,09%) pazienti. Tra la dimissione ospedaliera e il follow-up a 30 giorni si sono verificati 2 TIA, 1 ictus minore e 3 IMA. A 1 anno, il follow-up era disponibile in 726 pazienti (99,04%). Oltre i 30 giorni dalla procedura, si sono verificati 1 ictus minore (0,13%), quattro attacchi ischemici transitori (0,55%), 2 infarti miocardici acuti fatali (0,27%) e 6 decessi non cardiaci (1,10%). Il tasso di ictus cumulativo è stato dello 0,68%. All'eco-color-Doppler, una restenosi della carotide interna sottoposta a CAS è stata riscontrata in 6 pazienti (0,82%): 2 occlusioni totali e 4 restenosi intrastent. Non è stato possibile identificare elementi predittori di restenosi e/o occlusione e la durata della doppia terapia antiplastrinica (90 giorni vs 30 giorni) non è risultata correlata a eventi avversi cardiovascolari maggiori o all'insorgenza di restenosi.

CONCLUSIONI Questo registro "real world" sembrerebbe suggerire che l'uso del sistema di prevenzione embolica CGuard nella pratica clinica è sicuro e associato a una ridotta insorgenza di eventi neurologici avversi ad un follow-up clinico e strumentale di 12 mesi.

Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica

Pasqualino Sirignano: pasqualino.sirignano@uniroma1.it

Results From a Prospective Experience on Carotid Artery Stenting Using CGuard Stent System – The IRONGUARD 2 Study

P. Sirignano, W. Mansour, F. Speziale, E. Sbarigia, R. Gattuso, O. Martinelli, S. Cuzzo, A. Di Girolamo, L. di Marzo

Abstract

OBJECTIVES This study sought to evaluate 12-month safety and efficacy of dual-layer mesh-covered carotid stent systems for carotid artery stenting (CAS) in the clinical practice.

BACKGROUND When compared with carotid endarterectomy, CAS has been associated with a higher rate of post procedural neurologic events; these could be related to plaque's debris prolapsing through stent's mesh. Consequently, the need for increased plaque coverage has resulted in the development of dual-layer mesh-covered carotid stent systems.

METHODS From January 2017 to June 2019, a physician-initiated, prospective, multispecialty registry enrolled 733 consecutive patients undergoing CAS using the CGuard embolic prevention system in 20 centers. The primary endpoint was stroke up to 12 months; secondary endpoints were technical and procedural success; external carotid artery occlusion; and in-hospital, 30-day, and 12-month transient ischemic attack (TIA), acute myocardial infarction (AMI), and death rates.

RESULTS Symptoms were present in 131 (17.87%) patients. An embolic protection device was used in 731 (99.72%) patients. Procedural success was 100%, technical success was obtained in all but 1 (99.86%) patient, who died in hospital due to a hemorrhagic stroke. Six TIAs, 2 minor strokes, and 1 AMI occurred during in-hospital stay, and external carotid artery occlusion was evident in 8 (1.09%) patients. Between hospital discharge and 30-day follow-up, 2 TIAs, 1 minor stroke, and 3 AMIs occurred. At 1 year, follow-up was available in 726 patients (99.04%). Beyond 30 days postprocedure, 1 minor stroke (0.13%), four transient ischemic attacks (0.55%), 2 fatal acute myocardial infarctions (0.27%), and 6 noncardiac deaths (1.10%) occurred. Therefore, the cumulative stroke rate was 0.68%. On duplex ultrasound examination, ICA restenosis was found in 6 patients (0.82%): 2 total occlusions and 4 in-stent restenoses. No predictors of target ICA restenosis and/or occlusion could be detected, and dual-antiplatelet therapy duration (90 days vs 30 days) was not found to be related to major adverse cardiovascular event or restenosis occurrence.

CONCLUSIONS This real-world registry suggests that use of CGuard embolic prevention system in clinical practice is safe and associated with a minimal occurrence of adverse neurological events up to 12-month follow-up.

Department: General and Specialist Surgery

Pasqualino Sirignano: pasqualino.sirignano@uniroma1.it

Bypass gastrico Roux-Y (RYGB) versus Bypass duodenale-ileale con anastomosi singola e sleeve gastrectomia (SADI-S): può una procedura malassorbitiva con conservazione pilorica può migliorare il controllo metabolico?

Silvia Quaresima, Delia Proposito, Massimo Chiaretti, Pietro Ursi, Ingrid Cordova Herencia, Eleonora Rapanotti, Germana Ginevra Perrone, Alessandro Paganini

Abstract

Introduzione:

Gli interventi bariatrici malassorbitivi (BP) sono spesso associati allo sviluppo della dumping syndrome. I pazienti che soffrono di ipoglicemia post-prandiale mostrano tassi più elevati di recupero ponderale e risultati peggiori in termini di controllo del diabete di tipo 2. La SADI-S è una BP emergente che combina il malassorbimento ai vantaggi di una procedura restrittiva con conservazione pilorica, ovvero la Sleeve Gastrectomy. La SADI-S mostra risultati paragonabili ad altri BP malassorbitivi in termini di perdita di peso e risoluzione delle comorbidità e può essere impiegata come procedura di revisione nei pazienti con recupero di peso e/o grave reflusso dopo Sleeve Gastrectomy. L'ipotesi degli autori è che lo svuotamento gastrico più fisiologico della SADI-S possa ridurre l'incidenza dell'ipoglicemia associata a dumping syndrome, migliorando il controllo glicemico e prevenendo il recupero ponderale associato all'alterazione degli ormoni intestinali correlata all'ipoglicemia

Materiali e Metodi:

Dopo l'acquisizione del consenso informato, i pazienti con obesità patologica idonei per BP secondo le linee guida, saranno assegnati in modo casuale a RYGB (gruppo A) o SADI-S (gruppo B). Il test di tolleranza al glucosio orale (OGTT), i livelli di insulina plasmatica, di grelina e GLP-1 saranno testati prima e a 3- 6 -12 mesi dopo l'intervento. La dumping symptoms rating scale (DSRS) verrà somministrata per identificare i pazienti sintomatici. I risultati in termini di perdita ponderale saranno valutati mediante la % della perdita di peso totale (%TWL) e dal tasso di miglioramento/risoluzione delle comorbidità (valore della pressione arteriosa, livelli di HBA1c, livelli di trigliceridi, rimodulazione o sospensione della terapia farmacologica).

Obiettivi dello studio:

L'endpoint primario sarà valutare il profilo glicemico, insulinemico e i livelli ormonali intestinali nei pazienti sottoposti a SADI-S e RYGB. L'endpoint secondario sarà confrontare i risultati postoperatori precoci in termini di tasso di complicanze, calo ponderale e risoluzione delle comorbidità nei pazienti sottoposti a SADI-S o RYGB. L'analisi dei sottogruppi esaminerà il tasso di recupero ponderale nei pazienti con ipoglicemia post-BP in entrambi i gruppi e la sua correlazione con il profilo glicemico e ormonale intestinale. I livelli ormonali e il calo ponderale dei pazienti diabetici non insulino-dipendenti ed insulino-dipendenti saranno confrontati in entrambe le popolazioni per determinare se la procedura chirurgica abbia un impatto clinicamente significativo su diversi tipi di diabete

Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica

Silvia Quaresima: silvia.quaresima@uniroma1.it

Roux -Y gastric Bypass (RYGB) versus Single Anastomosis Duodenal-Ileal Bypass with Sleeve Gastrectomy (SADI-S): may a pylorus preserving malabsorptive procedure improve the metabolic outcome?

Silvia Quaresima, Delia Proposito, Massimo Chiaretti, Pietro Ursi, Ingrid Cordova Herencia, Eleonora Rapanotti, Germana Ginevra Perrone, Alessandro Paganini

Abstract

Background:

Malabsorptive bariatric procedures (BP) are often associated with the development of dumping syndrome. Patients experiencing post-prandial hypoglycaemia show higher rates of weight regain and worst results in terms of Type 2 diabetes control. SADI-S is an emerging BP that combines malabsorption to the advantages of a restrictive pylorus preserving procedure such as Sleeve gastrectomy. SADI-S shows comparable results to other malabsorptive BP in terms of weight loss and comorbidity resolution and can be employed as a redo procedure in patients with weight regain and/or severe reflux after Sleeve gastrectomy. The authors' hypothesis is that the more physiological SADI-S gastric emptying may reduce the incidence of dumping syndrome-associated hypoglycaemia, to improve glycaemia control and preventing weight regain associated to gut hormonal dysregulation related to hypoglycemia.

Materials and Methods:

After informed consent administration, morbidly obese patients fit for BP according to guidelines will be randomly allocated to RYGB (group A) or to SADI-S (group B). Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) with 75 g of oral glucose bolus, plasma insulin, Ghrelin and GLP-1 levels will be tested pre and postoperatively at 3, 6 and 12 months after surgery. The dumping symptoms rating scale (DSRS) will be administered to identify symptomatic patients. Body weight control outcome will be evaluated by % of total weight loss (%TWL) and the improvement/resolution of comorbidity (blood pressure value, HBA1c levels, triglycerides levels, remodulation or suspension of the drug therapy).

Study endpoints

The primary endpoint will be to evaluate the glycaemic and insulinemic profile together with gut hormonal levels in patients who underwent SADI-S versus RYGB. The secondary endpoint will be to compare early postoperative outcomes in terms of complication rates, bariatric effects, and comorbidity resolution among patients who underwent SADI-S or RYGB. Subgroup analysis will investigate the rate of weight regain in patients presenting with post-bariatric surgery hypoglycaemia in both arms and its correlation to glycaemic and gut hormone profile. Hormonal levels and weight loss results of no insulin-dependent and insulin-dependent diabetic patients will be compared in both populations to determine if the surgical procedure has a valuable impact on different type of diabetes

Department: General and Specialist Surgery

Silvia Quaresima: silvia.quaresima@uniroma1.it

Rimozione extracorporea di CO₂ nella gestione del trapianto di polmone

Francesco Alessandri, Franco Ruberto, Guglielmo Tellan, Pierangelo Di Marco, Federico Bilotta, Maria Luisa Borgia, Fabrizio Fattorini, Maurizio Bufi, Francesco Pugliese

Abstract

L'uso della rimozione extracorporea di anidride carbonica (ECCO₂R) è meno invasivo dell'ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO) e il controllo intraoperatorio degli scambi gassosi in corso di trapianto di polmone (LT) potrebbe essere realizzabile. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare il ruolo dell'ECCO₂R intraoperatoria sulla richiesta di ECMO in emergenza nei pazienti di gravità intraoperatoria intermedia sottoposti a LT

Trentotto pazienti consecutivi sottoposti a LT con gravità intraoperatoria "intermedia" sono stati analizzati e confrontati in uno studio osservazionale e di coorte. La gravità intraoperatoria "intermedia" è stata definita come lo sviluppo di una grave acidosi respiratoria intraoperatoria con mantenimento della funzione di ossigenazione (cioè, pH <7,25, PaCO₂ >60 mmHg e PaO₂/FiO₂ >150), non associata a instabilità emodinamica. Di questi 38 pazienti, 23 sono stati trattati con "trattamento intraoperatorio standard", mentre 15 sono stati trattati con "trattamento intraoperatorio standard + ECCO₂R". La richiesta di ECMO è stata più frequente tra i pazienti che hanno ricevuto il solo "trattamento intraoperatorio standard" rispetto a quelli trattati con "trattamento intraoperatorio standard + ECCO₂R" (17/23 vs. 3/15; p = 0,004). L'uso dell'ECCO₂R ha migliorato il pH e la PaCO₂, mentre la pressione media dell'arteria polmonare (mPAP) è diminuita. Nei pazienti con gravità intraoperatoria intermedia, l'uso di ECCO₂R migliora gli scambi gassosi e riduce la necessità di ECMO.

Dipartimento di Chirurgia Generale e Specialistica

Francesco Alessandri: francesco.alessandri@uniroma1.it

Extracorporeal Carbon dioxide removal in the intraoperative management of the lung transplant

Francesco Alessandri, Franco Ruberto, Guglielmo Tellan, Pierangelo Di Marco, Federico Bilotta, Maria Luisa Borgia, Fabrizio Fattorini, Maurizio Bufi, Francesco Pugliese

Abstract

The use of extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO2R) is less invasive than extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), and intraoperative control of gas exchange could be feasible. The aim of this study in intermediate intraoperative severity patients undergoing LT was to assess the role of intraoperative ECCO2R on emergency ECMO requirement in patients. Thirty-eight consecutive patients undergoing lung transplantation (LT) with “intermediate” intraoperative severity were analyzed and compared in a case-matched cohort observational study. The “intermediate” intraoperative severity was defined as the development of intraoperative severe respiratory acidosis with maintained oxygenation function (i.e., pH <7.25, PaCO₂ >60 mmHg, and PaO₂/FiO₂ >150), not associated with hemodynamic instability. Of these 38 patients, twenty-three patients were treated by receiving “standard intraoperative treatment,” while 15 patients were treated by receiving “standard intraoperative treatment + ECCO2R.”

ECMO requirement was more frequent among patients that received “standard intraoperative treatment” alone than in those treated with “standard intraoperative treatment + ECCO2R” (17/23 vs. 3/15; p = 0.004). The use of ECCO2R improved pH and PaCO₂ while mean pulmonary artery pressure (mPAP) decreased.

In intermediate intraoperative severity patients, the use of ECCO2R improve gas exchanges and reduces the ECMO requirement.

Department: General and Specialist Surgery

Francesco Alessandri: francesco.alessandri@uniroma1.it

Il ruolo dell'immunità innata nella progressione della Sclerosi Laterale Amiotrofica

Germana Coccozza, Inghilleri Maurizio, Aronica Eleonora, Giovanni Bernardini, Peng Ling, Richard Ransohoff, Angela Santoni, Cristina Limatola e Stefano Garofalo

Abstract

Sfruttando modelli murini di SLA familiare (hSOD1G93A e TDP43A315T), studiamo il ruolo delle cellule Natural Killer nell'insorgenza e nella progressione della malattia e nella modulazione del microambiente infiammatorio. Nel dettaglio, le cellule NK esercitano direttamente la loro attività citotossica contro i MN attraverso l'asse NKG2D-Mult-1. Inoltre, l'IFN- γ rilasciato dalle queste cellule: (i) aumenta il rilascio di CCL2 da parte dei neuroni danneggiati; (ii) riduce il numero di cellule Treg Foxp3+; (iii) modella la microglia verso un fenotipo pro-infiammatorio. Coerentemente, la deplezione delle cellule NK nei modelli murini di SLA, induce un fenotipo neuroprotettivo nella microglia, aumenta il numero di cellule Treg Foxp3 +, proteggendo i MN.

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer"

Stefano Garofalo: stefano.garofalo@uniroma1.it

The role of innate immunity in the progression of Amyotrophic Lateral Sclerosis

Germana Coccozza, Inghilleri Maurizio, Aronica Eleonora, Giovanni Bernardini, Peng Ling, Richard Ransohoff, Angela Santoni, Cristina Limatola e Stefano Garofalo

Abstract

In amyotrophic lateral sclerosis (ALS), both immune cells and glia contribute to motor neuron (MN) degeneration. Taking advantage of mouse models of familial-ALS (hSOD1G93A and TDP43A315T), we study the role of Natural Killer (NK) cells in the onset and progression of the disease, and in the modulation of inflammatory microenvironment. In detail, NK cells directly exert cytotoxic activity against MNs through the NKG2D-Mult-1 axis. Furthermore, IFN- γ released by NK cells: (i) increases the release of CCL2 by damaged neurons; (ii) reduces the number of Treg Foxp3+ cells; (iii) shapes microglia toward a pro-inflammatory phenotype. Consistently, NK cell depletion in ALS-mouse models, induces neuroprotective microglia phenotype, increases the number of Treg Foxp3+ cells, protecting the MNs..

Department: "Vittorio Erspamer" Physiology and Pharmacology

Stefano Garofalo: stefano.garofalo@uniroma1.it

Cannabis e cervello in via di sviluppo: studio delle conseguenze dell'esposizione prenatale ai cannabinoidi

Antonia Manduca

Abstract

La cannabis è la sostanza illecita più consumata dalle donne in gravidanza e durante l'allattamento. Studi clinici e preclinici hanno riportato che l'esposizione prenatale alla cannabis può interferire con il normale processo di sviluppo cerebrale del feto ed indurre effetti neurocomportamentali avversi a breve e lungo termine nella progenie. La prevalenza di tali effetti avversi potrebbe aumentare di pari passo con le recenti politiche globali di liberalizzazione e legalizzazione della cannabis e il maggior grado di accettazione sociale della sostanza. Per queste ragioni è fondamentale studiare le conseguenze a breve e lungo termine indotte dall'esposizione prenatale alla cannabis e far luce sui meccanismi neurobiologici alla base di tali effetti.

Attraverso l'integrazione di analisi comportamentali, farmacologiche e molecolari in modelli animali, Antonia Manduca studia i meccanismi alla base degli effetti indotti dall'esposizione materna alla cannabis nella prole di sesso maschile e femminile a diverse età dello sviluppo (dall'infanzia all'adolescenza fino all'età adulta), testando nuovi bersagli terapeutici sesso-specifici utili a mitigare i disturbi comportamentali mostrati dalla progenie esposta. Considerando che le politiche di liberalizzazione e legalizzazione della cannabis avanzano in tutto il mondo e che un numero presumibilmente elevato di bambini potrebbe essere esposto a danni derivanti dall'esposizione in gravidanza della sostanza, è di fondamentale importanza identificare i processi neurobiologici che mediano le differenze di genere nella vulnerabilità agli effetti dannosi della cannabis ed informare sui possibili rischi associati al consumo della sostanza durante periodi critici dello sviluppo.

Questa linea di ricerca è finanziata nell'ambito del Bando Sapienza SEED PNR 2022.

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer"

Antonia Manduca: antonia.manduca@uniroma1.it

Cannabis and the developing brain: insights into the consequences of prenatal cannabinoid exposure

Antonia Manduca

Abstract

Cannabis is the world's most widely used (illicit) drug among pregnant and breastfeeding women. There is evidence from human and animal studies that prenatal cannabis exposure influences offspring brain development and can have early and long-lasting impacts on their neurobehavioral functions. The prevalence of detrimental outcomes of prenatal cannabis exposure is likely to increase in tandem with the broadening of legalization and acceptance of the drug. As such, it is crucial to highlight the immediate and protracted consequences of prenatal cannabis exposure and to shed light on the neurobiological mechanisms underlying such effects.

By integrating detailed behavioral, pharmacological, and molecular observations in animal models, Antonia Manduca investigates the mechanisms underlying the detrimental effects of maternal cannabis exposure in male and female offspring at different developmental ages (from infancy through adolescence till adulthood) and explores sex-specific therapeutic strategies to mitigate the cannabis-triggered behavioral abnormalities in the progeny. Considering that cannabis legalization/decriminalization policies move forward worldwide and that conceivably large numbers of children will be prenatally exposed to its ingredients over the next decades, this research is important for unveiling neurobiological processes that mediate sex-specific vulnerability to the detrimental effects of maternal cannabis use and informing consumers of potential risks associated with cannabis use during critical periods. This line of research is currently funded by Sapienza SEED PNR research grant.

Department: "Vittorio Erspamer" Physiology and Pharmacology

Antonia Manduca: antonia.manduca@uniroma1.it

Ruolo della microglia nella plasticità sinaptica alla base delle memorie persistenti disadattative associate alla cocaina

Reverte Ingrid, Marchetti Claudia, Khan Azka, Pezza Sara, Scaringi Giorgia, Caprioli Daniele, Ragazzino Davide

Abstract

Stato dell'arte. L'abuso cronico di sostanze è caratterizzato dalla persistenza di memorie disadattive associate alla droga ed a neuroadattamenti sinaptici nel nucleo accumbens (NAc). In particolare, in seguito a ripetute esposizioni alla cocaina e ad un periodo di astinenza dalla droga si ha un progressivo accumulo di recettori AMPA permeabili al calcio (CP-AMPA) nel NAc. Questa forma di plasticità è stata collegata alla comparsa della sensibilizzazione alla droga e alla ricerca di droga indotta da stimoli ad essa precedentemente associati. Lo studio dei substrati molecolari alla base di questi adattamenti sinaptici si è a lungo focalizzato sulle molecole di segnalazione neuronale. Recentemente, le alterazioni nella segnalazione neuroimmunitaria sono state suggerite come un meccanismo attraverso il quale le droghe d'abuso inducono cambiamenti aberranti nella plasticità sinaptica e contribuiscono a comportamenti correlati all'abuso di sostanze. La microglia, popolazione cellulare con funzioni immunitarie nel sistema nervoso centrale, riveste un ruolo fondamentale per la maturazione dei circuiti durante lo sviluppo e la plasticità sinaptica nel cervello adulto. Nel presente studio indaghiamo il ruolo della microglia nella plasticità sinaptica aberrante alla base della formazione e della persistenza delle memorie disadattive associate alla droga. Metodi: Abbiamo addestrato i topi al "Cocaine-induced conditioned place preference (CPP)" e li abbiamo testati dopo 1 o 21 giorni di astinenza (AD). Durante l'astinenza abbiamo eliminato la microglia somministrando una dieta integrata con l'inibitore del recettore CSF1R (PLX5622) per 20 giorni. Abbiamo eseguito la colorazione di Golgi per misurare densità e morfologia delle spine dendritiche e abbiamo effettuato registrazioni di "whole-cell patch clamp" per determinare la presenza di CP-AMPA nel NAc. Risultati: Il CPP indotto dalla cocaina provoca un aumento della densità e del diametro delle spine dendritiche, ed un accumulo di CP-AMPA nel NAc a AD21. L'eliminazione della microglia durante l'astinenza previene questi meccanismi di plasticità. Inoltre, tale deplezione previene l'aumento dell'attività locomotoria mostrata dai topi trattati con la cocaina e la dieta di controllo ad AD21, ma non influenza la memoria di preferenza dalla CPP indotta da cocaina. Conclusioni: I nostri risultati suggeriscono che la microglia è coinvolta negli adattamenti sinaptici che si verificano nei neuroni del NAc durante l'astinenza da cocaina e nella sensibilizzazione locomotoria, ma non è necessaria per la memoria di associazione droga-contesto.

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer"

Ingrid Reverte: ingrid.reverte@uniroma1.it

Role of microglia on synaptic plasticity mechanisms underlying persistent cocaine-associated maladaptive memories

Reverte Ingrid, Marchetti Claudia, Khan Azka, Pezza Sara, Scaringi Giorgia, Caprioli Daniele, Ragozzino Davide

Abstract

Background. Chronic substance abuse is characterized by the persistence of maladaptive drug-associated memories and synaptic neuroadaptations in the nucleus accumbens (NAc). Specifically, after repeated exposure to cocaine and a period of abstinence there is a progressive accumulation of calcium permeable-AMPA receptors (CP-AMPA). This form of plasticity has been linked to the emergence of drug-sensitization and cue-induced drug-seeking. The study of the molecular substrates underlying these synaptic adaptations has long focused on neuronal signaling molecules. Recently, alterations in neuroimmune signaling have been suggested as a mechanism through which drugs of abuse induce aberrant changes in synaptic plasticity and contribute to substance abuse-related behaviors. Indeed, microglia, the immune cells of the central nervous system, are critical players for circuit maturation during development and synaptic plasticity in the adult brain. In the current study we investigated the role microglia in aberrant synaptic plasticity underlying the formation and persistence of drug-associated maladaptive memories. **Methods:** We trained mice in the cocaine-induced conditioned place preference (CPP) and tested them after 1 or 21 days of abstinence (AD). During abstinence we depleted microglia by administering a diet supplemented with the CSF1R-inhibitor PLX5622 (20 days). We then performed Golgi staining to measure dendritic spine density and whole-cell patch clamp recordings to determine the presence of CP-AMPA in the NAc. **Results:** We found that cocaine-induced CPP induces an increase in spine density, spine head diameter and CP-AMPA accumulation in the NAc at AD21. Microglia depletion during abstinence prevented the increase in dendritic spine density and diameter and reduced the presence of CP-AMPA at AD21. Besides, microglia depletion prevented the increase in locomotor activity displayed by cocaine control mice at AD21, but it did not affect the preference memory of cocaine-CPP. **Conclusions:** Our results suggest that microglia are involved in the synaptic adaptations occurring in NAc synapses during abstinence from cocaine and locomotor sensitization but are not necessary for the memory of the drug-context association.

Department: "Vittorio Erspamer" Physiology and Pharmacology

Ingrid Reverte: ingrid.reverte@uniroma1.it

La trasmissione sinaptica come bersaglio terapeutico nel trattamento delle patologie del neurosviluppo

Gabriele Ruffolo, Alessandro Gaeta, Lilian Lissner, Beatrice Cannata, Camilla Pinzaglia, Eleonora Palma

Abstract

Gli studi elettrofisiologici sono un passo fondamentale verso la comprensione della funzione sinaptica sia nella fisiologia, che nella patologia. Purtroppo, realizzare questo tipo di studi su tessuti umani è a volte complicato dalla scarsa disponibilità di materiale chirurgico fresco e dalle difficoltà tecniche dovute alla limitata sopravvivenza dei neuroni ex vivo, che riduce in modo significativo le possibilità di sperimentazione.

Per superare queste limitazioni, il nostro gruppo di ricerca si è specializzato in una tecnica, il microtrapianto di membrane umane in oociti di *Xenopus*, che permette di fatto di trapiantare sulla loro membrana i recettori nativi contenuti nel tessuto di origine. Inoltre, la sopracitata tecnica funziona anche utilizzando tessuti autoptici e ciò permette di ampliarne ulteriormente le potenzialità.

Il microtrapianto è particolarmente utile nel campo dello studio delle patologie rare del neurosviluppo, caratterizzate da un'incidenza minore di 1:5000, per le quali spesso non si dispone di tessuti sufficienti da sfruttare a scopo di ricerca.

Quindi, combinando il potenziale del microtrapianto e lo studio con altre metodiche di elettrofisiologia, stiamo correntemente affrontando due principali linee di ricerca.

La prima studia il meccanismo dello shift fisiologico del potenziale di inversione delle correnti GABA. Indubbiamente, la maturazione della neurotrasmissione inibitoria è oggi argomento incluso nei libri di testo ma, d'altra parte, meno è noto sulle conseguenze del fallimento di questo meccanismo chiave del neurosviluppo. Attraverso i nostri studi, abbiamo osservato che diversi disordini del neurosviluppo, come la sclerosi tuberosa, la sindrome di Dravet e la sindrome di Rett, sono caratterizzati da un'alterazione della trasmissione GABAergica. In questi casi, infatti, la funzione sinaptica assomiglia a quella di un cervello "immaturo" e quindi perturba l'equilibrio tra segnali eccitatori ed inibitori, innescando le crisi epilettiche e i problemi cognitivi tipici di questi pazienti.

La seconda linea di ricerca si focalizza sul fenomeno della "neuroinfiammazione". Recenti studi hanno contribuito a definire come questo fenomeno costituisca una delle caratteristiche principali dello sviluppo cerebrale patologico e, inoltre, come sia in grado di destabilizzare la funzione sinaptica. Il nostro obiettivo in questo caso è definire in dettaglio come mediatori pro-infiammatori e anti-infiammatori riescono a modulare la neurotrasmissione, per poter individuare composti esogeni o endogeni che siano in grado di prevenire l'influenza negativa della neuroinfiammazione sulla trasmissione sinaptica.

Quindi, i risultati dei nostri studi approfondiranno la conoscenza di questi due fenomeni patofisiologici e apriranno la strada a nuove terapie che mirino non solo ad alleviare i sintomi dei pazienti, ma a correggere quelle alterazioni che compromettono il normale neurosviluppo per rallentare, o fermare, la progressione della malattia.

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Ersamer"

Gabriele Ruffolo: gabriele.ruffolo@uniroma1.it

Targeting synaptic transmission for the treatment of rare epileptic neurodevelopmental disorders

Gabriele Ruffolo, Alessandro Gaeta, Lilian Lissner, Beatrice Cannata, Camilla Pinzaglia, Eleonora Palma

Abstract

Electrophysiological studies are a fundamental step towards the understanding of synaptic function in both physiology and pathology. Unfortunately, studies on human tissues are limited by the availability of surgical material and, even when this is available, technical difficulties due to the limited survival of the neurons *ex vivo* culture significantly reduce the possibilities to perform fruitful experiments.

To overcome these limitations, our research group has specialized in a technique, the membrane microtransplantation in *Xenopus* oocytes, which allows to inject cell membranes into the oocytes to directly transplant the native receptors contained in the tissues. Furthermore, we determined that tissues from autopsies can also be used to perform the microtransplantation, thus further expanding our possibilities.

The advantages of this technique are particularly useful in the study of rare neurodevelopmental diseases, which are characterized by an incidence lower than 1:5000, which often leads to the problem of human tissue availability.

By combining the potential of the microtransplantation technique to the study with other electrophysiological approaches, we are currently focusing on two main research topics.

The first study line revolves around the concept of the physiological shift of GABA currents reversal potential. Indeed, the maturation of the inhibitory neurotransmission is nowadays included in the physiology textbooks but, on the other hand, less is known about the consequences of the failure of this key developmental mechanism. In our studies, we observed that several neurodevelopmental disorders, such as Tuberous Sclerosis complex, Dravet syndrome and Rett syndrome, are characterized by an altered GABAergic neurotransmission. In these cases, synaptic function resembles that of a “pre-natal”, immature brain, thus disturbing the equilibrium between excitatory and inhibitory signals, triggering seizures, and contributing to cognitive impairment of these patients.

The second research thread follows the pathways of neuroinflammation. Recent studies have conclusively labeled it as a hallmark of pathological brain development and as a further element concurring to synaptic dysregulation. Our goal in this regard, is to define the role of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators on the modulation of neurotransmission and to characterize endogenous or exogenous compounds able to prevent the negative influence of neuroinflammation on synaptic function.

Hence, the results of our investigations will contribute to better characterize these two pathophysiological phenomena and pave the way to alternative therapies aiming not only to quench the symptoms of the patients suffering from neurodevelopmental disorders, but to target the factors that interfere with the normal neurodevelopment in order to slow down, or prevent, the progression of the disease.

Department: "Vittorio Erspamer" Physiology and Pharmacology

Gabriele Ruffolo: gabriele.ruffolo@uniroma1.it

La sindrome del leaky-gut induce cambiamenti neuroplastici nel sistema nervoso enterico durante i disordini dell'asse intestino-cervello e le malattie infiammatorie intestinali: un focus sulla glia enterica

Luisa Seguella, Silvia Basili Franzin, Aurora Zilli, Irene Palenca, Alessandro Del Re, Chiara Corpetti, Giuseppe Esposito

Abstract

La sindrome dell'intestino permeabile è particolarmente rilevante nella patogenesi delle malattie infiammatorie intestinali (IBD) e dei disturbi dell'asse intestino-cervello, come la malattia dell'intestino irritabile (IBS). Le alterazioni della funzione barriera intestinale innescano una risposta immunitaria nella mucosa e alterano il microambiente all'interno del sistema nervoso enterico (ENS). Questo determina una infiammazione di basso grado che è stata anche correlata allo sviluppo di disturbi comportamentali e neurodegenerativi, inclusi fenotipi depressivi e ansiosi, morbo di Parkinson, e malattie extra-intestinali come la sindrome metabolica. Si ipotizza che l'aumentata traslocazione dei microbi e dei loro prodotti attraverso la barriera intestinale abbia un impatto negativo sui circuiti intestino-cervello che controllano il metabolismo energetico o il comportamenti innescando una risposta neuroinfiammatoria locale e la disfunzione dei neuroni enterici.

Nell'ENS, l'omeostasi è regolata dalla glia enterica attraverso una comunicazione bidirezionale con i neuroni, le cellule immunitarie e il microbiota intestinale. La glia enterica monitora costantemente il proprio ambiente extracellulare e mostra attività fisiologica con lo scopo di modulare le funzioni intestinali locali e le risposte immunitarie. Insulti pro-infiammatori e agenti patogeni possono innescare un fenotipo gliale protettivo e reattivo che ha il potenziale per esacerbare le risposte infiammatorie locali e produrre effetti deleteri sulle cellule vicine. Una gliosis reattiva enterica si osserva anche durante i processi di neuroinvasione dovuti ad agenti neurotossici che violano la barriera epiteliale intestinale. Ciò sembra facilitare l'ascensione della disfunzione neuronale al cervello, influenzando così la sopravvivenza neuronale, la neurogenesi, e la trasmissione sinaptica.

Nel mio laboratorio studiamo come la segnalazione neuropatologica innescata dalla sindrome dell'intestino permeabile si riverberi attraverso il sistema nervoso e come la glia enterica contribuisca alla disfunzione dell'ENS e ai cambiamenti neuroplastici centrali nel contesto di IBD, disturbi intestinali funzionali, morbo di Parkinson, e sindromi metaboliche. Stiamo inoltre sviluppando nuove strategie farmacologiche per ripristinare la permeabilità intestinale e sopprimere la gliosi enterica reattiva attraverso l'ingegnerizzazione di probiotici in grado di produrre fattori immunomodulatori in-situ, come ALIAmidi ed endocannabinoidi, sotto lo stimolo di integratori alimentari specifici.

I nostri esperimenti mirano a comprendere le regole fondamentali della comunicazione cellula-cellula tra l'intestino e il cervello e a chiarire i meccanismi molecolari che contribuiscono ai cambiamenti nell'output della rete enterica. Utilizziamo varie tecniche, tra cui saggi di immunofluorescenza e immunoistochimica, modelli di malattie intestinali e saggi fisiopatologici in vivo, ex vivo e in vitro, e strategie farmacologiche su colture di tessuti e cellule, colture di batteri e probiotici ingegnerizzati, analisi metabolomica e metagenomica del microbiota.

Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer"

Luisa Seguella: luisa.seguella@uniroma1.it

Leaky-gut syndrome drives neuroplastic changes within the enteric nervous system during gut-brain disorders and inflammatory bowel disease: a focus on the enteric glia

Luisa Seguella, Silvia Basili Franzin, Aurora Zilli, Irene Palenca, Alessandro Del Re, Chiara Corpetti, Giuseppe Esposito

Abstract

Leaky-gut syndrome is particularly relevant in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases (IBD) and gut-brain axis disorders, such as irritable bowel disease (IBS). The disruption of intestinal barrier functions triggers a mucosal immune response and alters the microenvironment within the enteric nervous system (ENS). This leads to glial cell proliferation, nerve damage, and neurodegeneration in the enteric plexus associated with distinct alterations in the intestinal microbiome and brain metabolome. Further prolongation of low-grade inflammation induced by leaky-gut was linked to behavioral and neurodegenerative disorders, including depressive- and anxiety-like phenotypes, Parkinson's disease, and extra-intestinal diseases, such as metabolic syndrome. Based on this evidence, it is postulated that the increased translocation of microbes and their products across the impaired intestinal barrier negatively impacts the gut-brain circuits that control either energy metabolism or behaviors by establishing local neuroinflammation and enteric neuron dysfunction.

Homeostasis within the ENS is regulated by enteric glia through intercellular communication with neurons, immune cells, and the intestinal microbiota. Enteric glia constantly monitor their extracellular environment and exhibit physiological activity in response to extracellular signals such as neurotransmitters, microorganisms, and cytokines that function to modulate local intestinal functions and immune responses. Proinflammatory insults and pathogens may also trigger a protective, reactive glial phenotype that has the potential to exacerbate local inflammatory responses and produce deleterious effects on neighboring cells. Enteric glia also adopt a pro-inflammatory phenotype during neuroinvasion processes that occur when neurotoxic agents violate the intestinal epithelial barrier. This appears to facilitate the ascension of neuronal dysfunction to the brain, thereby affecting neuronal survival, neurogenesis, and synaptic transmission.

In our lab, we study how neuropathological signaling triggered by leaky-gut syndrome reverberates through the nervous system and how enteric glia contribute to ENS dysfunction and changes to central processing in the context of IBD, gut-brain disorders, Parkinson's disease, and metabolic syndromes. We are also developing new pharmacological strategies to restore intestinal permeability and suppress reactive enteric gliosis through engineering probiotics able to produce in-situ immuno-modulatory factors, such as ALIAmides and endocannabinoids, under the boost of specific diet supplements.

Our experiments are designed to allow us to understand the fundamental rules that govern cell-to-cell communication between the intestine and brain, and to elucidate the molecular mechanisms that contribute to changes in enteric network output. We use a diverse array of techniques including, immunofluorescence and immunohistochemistry assays, intestinal disease models, and in vivo, ex vivo, and in vitro pathophysiological assays and pharmacological strategies on tissue and cell cultures, bacteria and engineered probiotics cultures, metabolomic and metagenomic analysis of microbiota.

Department: "Vittorio Erspamer" Physiology and Pharmacology

Luisa Seguella: luisa.seguella@uniroma1.it

Nanomedicina e composti naturali per lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche nel trattamento del medulloblastoma HH-dipendente

Lucia Di Marcotullio

Abstract

Il medulloblastoma (MB) è il più comune tumore cerebrale infantile per il quale a oggi non esistono cure efficaci e definitive. Molti studi condotti negli ultimi anni sono stati diretti all'identificazione di terapie molecolari specifiche per il trattamento del MB basate sull'inibizione della via di Hedgehog (HH), una delle principali vie di sviluppo la cui aberrante attivazione è responsabile del 30% dei casi di MB. Particolare attenzione è stata rivolta alla scoperta di inibitori capaci di bloccare la via di HH agendo a valle sul fattore trascrizionale GLI1, il più potente effettore del signaling di HH. In questo contesto, il nostro gruppo di ricerca, in collaborazione con il team diretto dal Prof. Botta, ha identificato il Glabrescione B (GlaB), un composto naturale presente nei semi di *Derris glabrescens* (Leguminosae), come la prima piccola molecola capace di contrastare fortemente l'attività oncogenica di HH, attraverso l'inibizione diretta dell'interazione GLI1/DNA. Il GlaB inibisce in maniera significativa la crescita tumorale HH-dipendente in modelli in vitro e in vivo di MB, emergendo quindi come un buon candidato per ulteriori ottimizzazioni e studi pre-clinici. Al fine di superare la scarsa solubilità in acqua del GlaB e per aumentarne la sua efficacia terapeutica, abbiamo esaminato diverse strategie di dissoluzione. I nostri dati mostrano che una nuova molecola anfifilica il mPEG5kDa-colano, incrementa la solubilità del GlaB diverse centinaia di volte, a differenza dei surfattanti commercialmente disponibili. Il GlaB incapsulato nel mPEG5kDa-colano è capace di oltrepassare la barriera emato-encefalica e inibire significativamente la crescita tumorale HH-dipendente sia in vitro, sia in vivo, a concentrazioni inferiori rispetto al GlaB non incapsulato. Recentemente, abbiamo inoltre sviluppato formulazioni per la somministrazione intranasale veicolando il GlaB in liposomi. I risultati ottenuti mostrano che il GlaB incapsulato in queste strutture vescicolari inibisce fortemente l'attività trascrizionale di GLI1 e blocca la crescita di MB. Nel complesso, i risultati della nostra ricerca rivelano le eccellenti proprietà anti-tumorali del GlaB per il trattamento del MB HH-dipendente e forniscono rilevanti implicazioni per il trasferimento del GlaB nella pratica clinica.

Dipartimento di Medicina molecolare

Paola Infante: paola.infante@uniroma1.it

Natural product and nanomedicine for novel therapeutic strategy for the treatment of HH-dependent medulloblastoma

Lucia Di Marcotullio

Abstract

Medulloblastoma (MB) is a highly aggressive pediatric tumor of the cerebellum for which effective therapies are not available. In the last decades many efforts have been dedicated to the identification of molecularly specific therapy for MB, focusing on the targeting of Hedgehog (HH) signaling, a developmental pathway whose aberrant reactivation is responsible for the occurrence of about 30% of MB cases, thus representing a very promising therapeutic target. Particular focus has been placed on the development of HH inhibitors acting at downstream level by blocking GLI1, the final and the most powerful effector of HH signaling. In this scenario, we discovered Glabrescione B (GlaB), a natural compound found in *Derris glabrescens* (Leguminosae) seeds, as the first small molecule able to strongly impair the HH oncogenic activity by directly inhibiting GLI1/DNA interaction. GlaB robustly counteracts the HH-dependent tumor growth in in vitro and in vivo models of MB, standing as a good candidate for further optimization and pre-clinical studies. In order to overcome the poor water solubility of GlaB and to enhance its therapeutic efficacy, we explored several dissolution strategies. We found that a novel PEG based amphiphilic molecule (mPEG5kDa-cholane), enhances the solubility of GlaB several hundred times, unlike commercially available surfactants. GlaB encapsulated in mPEG5kDa-cholane is able to cross the blood-brain-barrier and has a greater effect in inhibiting HH-dependent cell proliferation both in vitro and in vivo when compared to non-formulated GlaB, by improving GlaB biological effects at lower concentrations. Recently, we have developed GlaB-loaded liposomes formulations for intranasal administration. GlaB-loaded liposomes strongly inhibited transcriptional activity of GLI1 and blocked MB growth. Overall, our findings reveal the excellent anti-tumor properties of GlaB encapsulated in mPEG5kDa-cholane and liposomes, for the treatment of HH-driven MB and provide relevant implications for the translation of GlaB into clinical practice.

Department: Molecular Medicine

Paola Infante: paola.infante@uniroma1.it

Carcinoma mammario e geni BRCA: una prospettiva di genere

Valentina Silvestri, Virginia Valentini, Agostino Bucalo, Ludovica Celli, Giulia Conti, Mohamed El hachmi, Laura Ottini

Abstract

Il carcinoma mammario, pur essendo considerato una patologia esclusivamente femminile, può insorgere anche negli uomini, se pur più raramente. Considerata la sua rarità, il carcinoma mammario maschile è poco studiato e la sua gestione clinica è basata sulla controparte femminile, e ciò determina una peggiore prognosi per gli uomini rispetto alle donne.

Il nostro studio sul carcinoma mammario maschile ha lo scopo di fare luce sulle caratteristiche di genere legate alla patologia e si è focalizzato sui geni BRCA1 e BRCA2 (BRCA), noti per essere coinvolti nella suscettibilità genetica al carcinoma mammario.

Il ruolo delle mutazioni BRCA appare diverso nei due sessi, con BRCA1 coinvolto principalmente nelle donne mentre BRCA2 negli uomini.

Abbiamo recentemente caratterizzato lo spettro dei tumori diagnosticati negli uomini portatori di mutazioni nei geni BRCA, utilizzando un'ampia casistica internazionale. Abbiamo dimostrato che rispetto a gli uomini con mutazioni in BRCA1, gli uomini con mutazioni in BRCA2 hanno una probabilità circa 3 volte maggiore di avere una o più neoplasie, in particolare cancro alla mammella, ma anche alla prostata e al pancreas. Abbiamo inoltre stimato i rischi di insorgenza di cancro nei portatori di mutazioni in BRCA, osservando che le stime di rischio variano in base al gene e/o al genere. Oltre al carcinoma mammario, le mutazioni nei geni BRCA1 e BRCA2 sono associate ad un rischio di cancro al pancreas e allo stomaco aumentato da 2 a 4 volte in entrambi i sessi, e le mutazioni nel gene BRCA2 ad un rischio di cancro alla prostata aumentato di circa 2 volte.

Stiamo ora caratterizzando i tumori mammari associati alle mutazioni nei geni BRCA nei due sessi, relativamente all'infiltrato immunitario, una caratteristica potenzialmente legata al genere. Sono emerse differenze clinicamente rilevanti nei livelli di infiltrato immunitario, in particolare nella frazione dei macrofagi M2, noti per essere marcatori di peggiore prognosi, che risulta significativamente più abbondante nei tumori mammari femminili associati a BRCA1 e nei tumori mammari maschili associati a BRCA2.

Nel complesso, i nostri dati potranno essere la base per lo sviluppo di linee guida genere-specifiche per la gestione dei pazienti con tumori associati a BRCA e per aumentare la consapevolezza sull'oncologia di genere.

Dipartimento di Medicina molecolare

Valentina Silvestri: valentina.silvestri@uniroma1.it

Breast cancer and BRCA genes: a gender perspective

Valentina Silvestri, Virginia Valentini, Agostino Bucalo, Ludovica Celli, Giulia Conti, Mohamed El hachmi, Laura Ottini

Abstract

Gender plays a major role in breast cancer (BC); although often mistakenly considered as a female disease, it may also occur in men.

Male BC is rare, much less investigated, and with a higher mortality compared with BC in women. Increasing evidence suggested gender-specific differences in BC, in terms of biological and clinical behavior.

Increased BC risk is mainly associated with germline BRCA1 and BRCA2 (BRCA) pathogenic variants (PVs), however, the role of BRCA PVs in BC susceptibility is significantly different in the two sexes, with BRCA1 PVs mainly involved in women while BRCA2 PVs in men.

While it's well known that BRCA PVs in female carriers are associated with hereditary breast and ovarian cancers, data on male BRCA PV carriers are limited. We characterized the spectrum of cancers diagnosed in male BRCA PV carriers. Men affected by one or more cancers, mainly breast, prostate, and pancreatic cancers, were 3-fold more likely to be BRCA2, rather than a BRCA1, PV carriers.

Using the largest international dataset available, we also estimated gender-specific cancer risks in female and male BRCA PV carriers. In addition to BC, BRCA1 and BRCA2 PVs are associated with 2 to 4-fold increased risks of pancreatic and stomach cancers in both sexes, and BRCA2 PVs with 2-fold increased prostate cancer risk.

To further characterize breast tumors based on BRCA PVs and gender, we are currently performing a transcriptomic-based profiling with the aim to provide key insights on BC immunobiology, a known gender-related issue. Our ongoing analysis highlighted differences in the abundance of tumor infiltrating immune cells, particularly M2 macrophages, previously associated with poor prognosis in BC.

Overall, our data may inform future gender-specific recommendations for the management of patient with BRCA-associated cancers. Our studies may also increase a gender-oriented BC awareness and inform future studies addressing the gender perspective in cancer research.

Department: Molecular Medicine

Valentina Silvestri: valentina.silvestri@uniroma1.it

La corona proteica delle nanoparticelle lipidiche decorate con DNA riduce il sequestro da parte delle cellule immunitarie in vivo

Giulimondi Francesca, Giulio Caracciolo, Daniela Pozzi, Luca Digiacomo, Erica Quagliarini

Abstract

Negli approcci terapeutici basati sulla veicolazione genica, i sistemi di rilascio non virali, come i liposomi cationici, rappresentano un'alternativa promettente per la loro semplicità d'uso e la facile complessazione con DNA polianionico per formare lipoplessi. Tuttavia, il loro potenziale utilizzo in vivo è spesso ostacolato a causa della clearance da parte delle cellule del sistema immunitario. Nonostante le conoscenze avanzate acquisite finora, non siamo ancora in grado di prevedere il comportamento in vivo dei lipoplessi. Infatti, una volta introdotti nella circolazione sistemica, uno strato di biomolecole definito "corona proteica" in quanto arricchito in proteine plasmatiche, si assorbe spontaneamente sulla loro superficie. La corona proteica determina una nuova "identità biologica", che controlla il tempo di circolazione sistemica, la distribuzione corporea e la risposta fisiologica [1] [2]. Pertanto, la piena comprensione delle interazioni tra lipoplessi e proteine plasmatiche è fondamentale per controllare la loro identità biologica in vivo. Sulla base di queste considerazioni, abbiamo progettato e caratterizzato due formulazioni di lipoplessi a multicomponente: (i) complessi caratterizzati da una carica superficiale positiva che contengono la maggior parte del DNA nel nucleo della vescicola denominati "plain lipoplexes" (PL); e (ii) complessi carichi negativamente la cui superficie è decorata con DNA e, quindi, definiti "DNA-decorated lipoplexes" (DDL). Quindi, abbiamo esposto i lipoplessi alle proteine plasmatiche ed esplorato la loro capacità di eludere le cellule immunitarie in vitro, ex vivo e in vivo (Figura 1). Abbiamo dimostrato che l'esposizione dei DDL a basse concentrazioni di plasma umano determina la formazione di una corona proteica carente di opsonine in grado di prevenire efficacemente il sequestro da parte dei leucociti nel sangue intero, e dei monociti, macrofagi e neutrofili nella milza di topi C57BL/6 [3]. Combinando i risultati ottenuti, abbiamo concluso che l'esposizione dei DDL a basse concentrazioni di proteine plasmatiche porta alla formazione di un rivestimento proteico biomimetico. Di conseguenza, prevediamo che questa strategia possa aprire nuove strade per la progettazione di nanovettori per la veicolazione di DNA caratterizzati da tempi di circolazione prolungati in vivo.

Dipartimento di Medicina molecolare

Francesca Giulimondi: francesca.giulimondi@uniroma1.it

Protein corona of DNA-decorated lipid nanoparticles reduces sequestration by immune cells in vivo

Giulimondi Francesca, Giulio Caracciolo, Daniela Pozzi, Luca Digiacomo, Erica Quagliarini

Abstract

In gene-based therapeutic approaches, non-viral delivery systems, such as cationic liposomes, represent an attractive alternative for their simplicity of use, large-scale production, and easy complexation with polyanionic DNA to form lipoplexes. Nevertheless, their potential use in vivo is often hindered due to the immune system clearance. Despite the advanced knowledge acquired, we are still unable to predict the in vivo behaviour of lipoplexes. Once injected into systemic circulation, lipoplexes elicit the adsorption, on their surface, of a layer of biomolecules defined 'protein corona' (PC) for the protein enrichment. The PC leads to a new "biological identity", which controls their systemic circulation time, body distribution and physiological response [1] [2]. Therefore, full understanding of lipoplexes-protein interactions is mandatory to control their biological identity in vivo. Based on these considerations, we designed and characterized two multicomponent lipoplexes formulations: (i) positively charged complexes that contain most of the DNA in the vesicle core referred to as "plain lipoplexes" (PLs); and (ii) negatively charged complexes whose surface is decorated with DNA and, therefore, defined "DNA-decorated lipoplexes" (DDLs). Then, we exposed lipoplexes to plasma proteins and explored the ability of protein-coated lipoplexes to evade immune cells in vitro, ex vivo and in vivo (Figure 1). We show that exposing DDLs to low human plasma (HP) concentration leads to the formation of an opsonin-deficient PC that efficiently prevents sequestration by leukocyte subpopulations in whole blood of healthy donors, by monocytes and neutrophils, and in the spleen of C57BL/6 mice [3]. Combining evidence from the lipoplexes' characterization, cellular uptake in THP-1, and capture by circulating leukocytes in whole blood, we conclude that exposing DDLs to low protein concentrations leads to the formation of stealth and biosafe protein coating. Consequently, we envision that this strategy may open new avenues for DNA-loaded nanocarriers with prolonged circulation time in vivo.

Department: Molecular Medicine

Francesca Giulimondi: francesca.giulimondi@uniroma1.it

Contrastare l'oncogenesi mediante un ncRNA? Una prima strategia basata su un dominant negative RNA per contrastare la Transizione Epatelio-Mesenchimale

Elisabetta Vulpis, Luisa Loconte, Agnese Peri, Rosa Molfetta, Giulio Caracciolo, Laura Masuelli, Luana Tomaipitina, Giovanna Peruzzi, Sara Petillo, Maria Teresa Petrucci, Francesca Fazio, Lucilla Simonelli, Cinzia Fionda, Alessandra Soriani, Cristina Cerbo

Abstract

Recentemente abbiamo sviluppato una prima strategia basata sull'RNA che interferisce con una funzione del lncRNA HOTAIR correlata con l'epatocarcinoma. Una forma dominant negative di HOTAIR è stata prima progettata computazionalmente per poi dimostrare sperimentalmente come possa compromettere il processo di transizione epitelio-mesenchimale. La crescita esponenziale della conoscenza di diverse classi di RNA non codificanti (ncRNA) e dei loro diversi ruoli funzionali, ha suscitato un grande interesse nella comunità scientifica negli ultimi decenni. Al di là del Dogma Centrale della Biologia, è ormai chiaramente noto che non tutti gli RNA codificano per prodotti proteici e che possono esercitare un più ampio repertorio di funzioni biologiche. Per questo, negli ultimi anni, è stato dato un grande impulso allo sviluppo di strategie basate sui ncRNA con potenziali capacità terapeutiche e, oggi, diverse molecole di RNA sono state sperimentalmente convalidate ed effettivamente sfruttate in ambito clinico per contrastare diverse patologie.

In questo contesto, abbiamo recentemente progettato un approccio per contrastare la EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) basato sull'uso di una forma dominant negative del lncRNA HOTAIR.

Questo primo approccio basato sul lncRNA riportato al fine di contrastare l'EMT, sfrutta un modulo del lncRNA HOTAIR (HOTAIR-sbid) che è rappresentato dal dominio di legame di SNAIL ma è privo del dominio di legame di EZH2. Meccanicisticamente, HOTAIR-sbid agisce come dominante negativo su HOTAIR endogeno nella funzione di regolazione dell'attività di SNAIL, poiché si lega a SNAIL ma non è in grado di mediare l'interazione tra il fattore trascrizionale sequenza-specifico SNAIL e il modificatore generale della cromatina EZH2. Questo, a sua volta, compromette la repressione mediata da H3K27me3/EZH2 dei geni epiteliali bersagliati da SNAIL.

Inoltre, l'espressione HOTAIR-sbid compromette la motilità cellulare, l'invasività, la crescita ancoraggio-indipendente nelle cellule di epatocarcinoma e nella EMT indotta dal TGF β .

Dipartimento di Medicina molecolare

Sabrina Garbo: sabrina.garbo@uniroma1.it

Tackling oncogenesis by ncRNA? A first dominant negative strategy to impair Epithelial-to-Mesenchymal transition

Battistelli Cecilia, Garbo Sabrina, Riccioni Veronica, Montaldo Claudia, Santangelo Laura, Vandelli Andrea, Strippoli Raffaele, Tartaglia Gian Gaetano, Tripodi Marco, Cicchini Carla

Abstract

We recently validated a first innovative RNA-based strategy interfering with a pivotal function of the tumor-related lncRNA HOTAIR. A dominant negative HOTAIR form was computationally designed and proved to impair Epithelial-to-mesenchymal transition for the first time. The growing knowledge on several classes of non-coding RNAs (ncRNAs), and their different functional roles, has aroused a great interest in the scientific community. Beyond the Central Dogma of Biology, it is clearly known that not all RNAs are coding for protein products, and they exert a broader repertoire of biological functions. For this reason, in recent years, a great boost was given to ncRNA-based strategies with potential therapeutic abilities, and nowadays, the use of RNA molecules is experimentally validated and actually exploited into the clinics to counteract several diseases. In this context we recently designed, an approach to counteract EMT (Epithelial to Mesenchymal Transition) based on the use of a dominant-negative form of the lncRNA HOTAIR. This first reported lncRNA-based approach to counteract EMT exploits a module of the lncRNA HOTAIR (HOTAIR-sbid) that includes the SNAIL-binding domain but is depleted of the EZH2-binding

domain. Mechanistically, HOTAIR-sbid acts as a dominant-negative of the endogenous HOTAIR function in regulating SNAIL activity since it binds to SNAIL but is unable to mediate the interaction between the sequence-specific transcriptional factor SNAIL and the general chromatin modifier EZH2. This, in turn, impairs H3K27me3/EZH2-mediated repression of epithelial SNAIL-target genes. Functionally, HOTAIR-sbid expression impairs cellular motility, invasiveness, anchorage-independent growth in HCC cells, and responsiveness to TGF β -induced EMT. The successful output obtained holds promises of translational potential in the light of the limited off-target effects foreseen.

Department: Molecular Medicine

Sabrina Garbo: sabrina.garbo@uniroma1.it

Impatto dei ligandi di NKG2D associati a vescicole extracellulari sull'immunosorveglianza tumorale mediata dalle cellule Natural Killer

Elisabetta Vulpis, Luisa Loconte, Agnese Peri, Rosa Molfetta, Giulio Caracciolo, Laura Masuelli, Luana Tomaipitina, Giovanna Peruzzi, Sara Petillo, Maria Teresa Petrucci, Francesca Fazio, Lucilla Simonelli, Cinzia Fionda, Alessandra Soriani, Cristina Cerbo

Abstract

Il Mieloma Multiplo (MM) è una malattia ematologica incurabile caratterizzata dall'espansione clonale di plasmacellule maligne terminalmente differenziate nel midollo osseo e da disfunzione immunologica. Le cellule Natural Killer (NK) sono dei linfociti citotossici appartenenti all'immunità innata che svolgono un ruolo chiave nell'immunosorveglianza del MM. NKG2D è un recettore attivatorio che lega due famiglie di molecole, MIC e ULBP, tipicamente indotte su cellule danneggiate, trasformate o infettate ed espressi sulla superficie cellulare come proteine transmembrana o ancorate attraverso GPI. La secrezione dei ligandi di NKG2D attraverso taglio proteolitico o in associazione a vescicole extracellulari (EV) è una modalità utilizzata dal tumore per controllare il livello di espressione in superficie e un meccanismo per evadere dalla sorveglianza immunitaria NKG2D-mediata. Utilizzando come modello cellulare una linea di MM trasfettata con i ligandi di NKG2D (NKG2DL), abbiamo studiato come tali ligandi possono influenzare la funzionalità delle cellule NK. I nostri risultati dimostrano che: i) NKG2DL appartenenti alle famiglie MIC e ULBP sono espressi sulla superficie delle EV; ii) la stimolazione persistente delle cellule NK con EV esprimenti NKG2DL causa la riduzione dell'espressione in superficie di NKG2D sia "in vitro" sia "in vivo" e inficia la funzionalità NKG2D-mediata; iii) NKG2DL possono essere trasferiti dalle EV alle cellule NK causando il fratricidio. Inoltre, è interessante notare come NKG2DL ancorati alla membrana attraverso il GPI (MICA*008, ULBP1, ULBP3) sono trasferiti in maniera più efficiente dalle vescicole alle cellule NK rispetto ai ligandi transmembrana (MICA*019, MICB, ULBP2); iv) considerando la rilevanza del MM come sistema modello per lo studio delle interazioni tra tumore cellule NK, abbiamo osservato un arricchimento delle vescicole esprimenti MICA e ULBP1 nel midollo osseo dei pazienti affetti da MM. Collettivamente, questi risultati dimostrano che l'accumulo di NKG2DL associati a EV nel microambiente tumorale possono favorire la soppressione dell'attività delle cellule NK sia attraverso la riduzione dell'espressione di NKG2D sia attraverso l'induzione del fratricidio di cellule NK che hanno acquisito NKG2DL dalle EV. Inoltre, questi dati forniscono il razionale per modulare la secrezione delle EV per impedire l'immuno-evasione delle cellule di MM.

Dipartimento di Medicina molecolare

Elisabetta Vulpis: elisabetta.vulpis@uniroma1.it

Impact of extracellular vesicle-associated NKG2D ligands on NK cell-mediated cancer immunosurveillance

Elisabetta Vulpis, Luisa Loconte, Agnese Peri, Rosa Molfetta, Giulio Caracciolo, Laura Masuelli, Luana Tomaipitina, Giovanna Peruzzi, Sara Petillo, Maria Teresa Petrucci, Francesca Fazio, Lucilla Simonelli, Cinzia Fionda, Alessandra Soriani, Cristina Cerbo

Abstract

Multiple Myeloma (MM) is a malignancy of terminally differentiated plasma cells (PCs) located in the bone marrow and is still an incurable disease characterized by immune dysfunction. Natural Killer (NK) cells are innate cytotoxic lymphoid cells that play a key role in the MM immunosurveillance. NKG2D is an activating receptor that binds to MIC and ULBP molecules typically induced on damaged, transformed or infected cells and expressed on the cell surface as transmembrane or GPI-anchored proteins. The secretion of NKG2D ligands (NKG2DLs) through protease-mediated cleavage or by extracellular vesicle (EV) is a mode to control their cell surface levels and a mechanism used by cancer cells to evade NKG2D-mediated immunosurveillance. By using as model a human NKG2DL-transfected MM cell line we investigated how the NKG2DLs associated to EVs could affect NK cell-mediated functions. Our findings show that: i) NKG2DLs belonging to MIC and ULBP families are all expressed on the surface of EVs; ii) persistent stimulation mediated by NKG2DL+EVs causes NKG2D downmodulation “in vitro” and “in vivo” leading to impaired NKG2D-mediated functions; iii) NKG2DLs can be transferred by vesicles to NK cells causing fratricide. Notably, GPI-anchored ligands (i.e: MICA*008, ULBP1, ULBP3) are transferred more efficiently from vesicles to NK cells than transmembrane ones (i.e: MICA*019, MICB, ULBP2); iv) focusing on MM as relevant model of tumor-NK cell interactions, we found enrichment of EVs expressing MICA and ULBP1 in the bone marrow of a cohort of patients

Collectively these findings demonstrate that the accumulation of NKG2DLs associated to EVs in the tumor microenvironment could favor the suppression of NK cell activity either by NKG2D down-modulation or by fratricide of NK cell dressed with EV-derived NKG2DLs and will provide the rationale for targeting EV secretion in order to overcome MM immune evasion.

Department: Molecular Medicine

Elisabetta Vulpis: elisabetta.vulpis@uniroma1.it

Qualità della risposta T al vaccino a mRNA anti-SARS-CoV-2 in PLWH sotto ART

Eeva Tortellini, Maria Antonella Zingaropoli, Giulia Mancarella, Raffaella Marocco, Anna Carraro, Meriem Jhamour, Mariasilvia Guardiani, Federica Dominelli, Valentina Perri, Patrizia Pasculli, Anna Napoli, Aurelia Gaeta, Fabio Mengoni, Paola Zuccalà, Valeria Belvisi, Blerta Kertusha, Alberico Parente, Cosmo Del Borgo, Vincenzo Vullo, Maria Rosa Ciardi, Claudio Maria Mastroianni, Miriam Lichtner

Abstract

Introduzione: la qualità e la durata dell'immunità al vaccino contro SARS-CoV-2 devono ancora essere chiarite nelle persone che convivono con l'HIV (PLWH). Pertanto, lo scopo dello studio è stato quello di indagare la risposta umorale e T-cellulare alla terza dose di vaccino mRNA.

Metodi: Le risposte umorale e T-cellulare sono state valutate nei PLWH prima (T0), a 2 (T1) e a 6 mesi (T2) dalla terza dose. Dopo stimolazione con peptide S delle cellule mononucleate del sangue periferico, mediante citometria a flusso sono state identificate le cellule T che producono tutte le possibili combinazioni di IFN γ , IL2 e TNF α . Sono state definite responding quelle che producono almeno una delle tre citochine in esame e triple-positive quelle che le producono tutte e tre simultaneamente. I PLWH sono stati stratificati in base alla conta di CD4 e alla risposta umorale in responder(R) e non-responder(NR). Come gruppo di controllo sono stati arruolati donatori sani (HD).

Risultati: sono stati arruolati 37 PLWH (mediana della conta attuale di CD4 [IQR] 547 [308-714] cellule/ μ l) tutti in terapia antiretrovirale (ART) e 18 HD.

Complessivamente, la valutazione dei livelli di anti-S non ha mostrato differenze significative tra PLWH e HD, sia a T0 che a T1, e la valutazione longitudinale ha rivelato un aumento significativo a T1 nei PLWH ($p < 0.0001$), che è rimasto stabile a T2 ($p < 0.0001$). Relativamente alla risposta T, non è stata osservata alcuna differenza statisticamente significativa nella percentuale di cellule responding tra PLWH e HD. Stratificando i primi a T0, sono state osservate percentuali inferiori di responding nel gruppo con < 200 cellule/ μ l rispetto a quello con > 200 cellule/ μ l (CD4: 0.4 [0.2-0.8] e 2.2 [0.6-6.3], rispettivamente, $p = 0.0331$; CD8: 0.2 [0.1-0.6] e 1.7 [0.5-3.9], rispettivamente, $p = 0.0055$) così come nei NR rispetto ai R (CD4: 0.3 [0.1-0.5] e 2.0 [0.7-5.9], rispettivamente, $p = 0.0052$; CD8: 0.3 [0.1-0.4] e 1.7 [0.5-5.0], rispettivamente, $p = 0.0064$). A T1, invece, le percentuali di responding nei PLWH con < 200 cellule/ μ l e nei NR erano paragonabili rispettivamente a quelli con > 200 cellule/ μ l e ai R e lo stesso risultato è stato trovato a T2.

Tuttavia, diversamente dagli HD, a T0, T1 e T2, nei PLWH il profilo di espressione di IFN γ , IL2 e TNF α era caratterizzato, indipendentemente dalla conta di CD4, da una maggiore espressione di TNF α , nonché da una percentuale inferiore di cellule T triple-positive, indicando un'alterazione immunologica persistente nonostante il successo dell'ART.

Conclusioni: una risposta specifica era presente nella maggior parte dei partecipanti già dopo la seconda dose, ma la dose di richiamo ne ha aumentato il tasso e l'entità. Tuttavia, quella cellulare sembra essere qualitativamente diversa rispetto a quella degli HD. Pertanto, una migliore comprensione della dinamica e della qualità della risposta T è ancora necessaria per capire la corretta strategia di vaccinazione e in generale la risposta immunitaria nelle PLWH sotto ART.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Eeva Tortellini: eeva.tortellini@uniroma1.it

Quality of T-Cell Response to SARS-CoV-2 mRNA Vaccine in ART-Treated PLWH

Eeva Tortellini, Maria Antonella Zingaropoli, Giulia Mancarella, Raffaella Marocco, Anna Carraro, Meriem Jhamour, Mariasilvia Guardiani, Federica Dominelli, Valentina Perri, Patrizia Pasculli, Anna Napoli, Aurelia Gaeta, Fabio Mengoni, Paola Zuccalà, Valeria Belvisi, Blerta Kertusha, Alberico Parente, Cosmo Del Borgo, Vincenzo Vullo, Maria Rosa Ciardi, Claudio Maria Mastroianni, Miriam Lichtner

Abstract

Background: the quality and duration of immunity to severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) vaccine in people living with HIV (PLWH) needs to be clarified. Therefore, we investigated specific humoral and T-cell response to the third dose of mRNA vaccination in this population.

Methods: humoral and T-cell responses were evaluated in PLWH before (T0), after 2 (T1) and after 6 months (T2) from the third dose of vaccine. By intracellular cytokine flow cytometry assay, upon S peptide libraries stimulation in peripheral blood mononuclear cells, we identified T-cells producing all possible combinations of IFN γ , IL2 and TNF α . We named those producing any of them as responding T-cells and those simultaneously producing all 3 as triple-positive T-cells. PLWH were stratified according to CD4 T-cell count and according to humoral response into responders (R) and non-responders (NR). As control group, healthy donors (HD) were enrolled.

Results: thirty-seven PLWH (median current CD4 T-cell count [IQR] 547 [308–714] cells/ μ l) all on antiretroviral therapy (ART) and 18 HD were enrolled.

Overall, the cross-sectional evaluation of anti-S antibody levels showed no significant differences between PLWH and HD both at T0 and T1, and the longitudinal evaluation revealed a significant increase at T1 in PLWH ($p < 0.0001$), that remained stable at T2 ($p < 0.0001$).

Collectively, concerning T-cell response, no statistically significant differences were found in the percentages of responding T-cells comparing PLWH to HD. At T0, stratifying PLWH, lower percentages of responding T-cells in PLWH with < 200 cells/ μ l compared to those with > 200 cells/ μ l were observed (CD4: 0.4 [0.2-0.8] and 2.2 [0.6-6.3], respectively, $p = 0.0331$; CD8: 0.2 [0.1-0.6] and 1.7 [0.5-3.9], respectively, $p = 0.0055$) as well as in NR group compared to R one (CD4: 0.3 [0.1-0.5] and 2.0 [0.7-5.9], respectively, $p = 0.0052$; CD8: 0.3 [0.1-0.4] and 1.7 [0.5-5.0], respectively, $p = 0.0064$). At T1, the percentages of responding T-cells in PLWH with < 200 cells/ μ l and in NR group were respectively comparable to those with > 200 cells/ μ l and R group and the same result was found at T2. However, at T0, T1 and T2, in PLWH, the pattern of co-expression of IFN γ , IL2 and TNF α was characterized, independently of CD4 T-cell count, by a higher expression of TNF α as well as a lower percentage of triple-positive T-cells, indicating a persistent immunological signature despite successful ART.

Conclusion: in ART-treated PLWH a specific response was present in most of the participants already after the second dose, but the booster dose increased the rate and the magnitude of it. However, the cellular one seems to be qualitatively different compared to HD. Therefore, a fundamental understanding of the dynamics of T-cell quality is still needed in order to determine the best vaccination strategy for COVID-19 and in general the capability of immune response in HIV ART-treated PLWH.

Department: Public Health and Infectious Diseases

Eeva Tortellini: eeva.tortellini@uniroma1.it

Interazione tra vescicole extracellulari e organoidi intestinali umani per lo studio della patogenicità e del potenziale tumorigenico del parassita nematode Anisakis

Bellini Ilaria, Scribano Daniela, Arcà Bruno, Ambrosi Cecilia, Sarshar Meysam, Pronio Anna Maria, Palamara Anna Teresa, D'Amelio Stefano, Cavallero Serena.

Abstract

Stato dell'arte: L'anisakiasi è una zoonosi causata dal consumo di pesce crudo o poco cotto infestato dalle larve, allo stadio infestante L3, del nematode marino *Anisakis* spp. Anche se l'uomo risulta un ospite accidentale, l'ingestione di una singola larva è in grado di determinare segni clinici della patologia che possono sfociare in reazioni allergiche, lesioni ulcerose, infiammazione cronica e granulomi (Audicana et al., 2008 Clin Microbiol Rev. 21, 360). Recentemente, sempre più pubblicazioni mostrano casi di pazienti con tumori a livello gastrico ed intestinale in concomitanza di anisakiasi (Sonoda et al., 2015 Surg Today. 45, 1321; Murata et al., 2018 BMC Infect Dis. 4 619; Kita et al., 2019 Int J Surg Case Rep. 60, 209), ma nonostante questo dato allarmante, la letteratura atta ad investigare la risposta infiammatoria, immunitaria ed il potenziale tumorigenico nell'uomo risulta estremamente scarsa. Inoltre, ad oggi, sono poche le ricerche scientifiche basate sull'utilizzo di modelli in vitro in grado di ricreare il microambiente in cui il parassita agisce durante l'infezione nell'uomo e sullo studio dei suoi potenziali messaggeri di patogenicità (Speciale et al., 2017 Parasitol Res. 116, 2471; Carballeda-Sangiao et al., 2020 PLoS Negl Trop Dis. 14, e0008462).

Obiettivo: l'obiettivo di questo progetto è quello di approfondire lo studio dell'interazione *Anisakis*-uomo, tramite l'utilizzo di un approccio di trascrittomica comparativa utilizzando: i) gli organoidi umani intestinali, un modello innovativo in grado di auto-organizzarsi e riflettere struttura e funzioni dell'organo da cui deriva e ii) le vescicole extracellulari (EVs), un nuovo messaggero di patogenicità di *Anisakis*. Le EVs sono delle nanoparticelle lipidiche di 100-1000 nm, coinvolte nella comunicazione cellula-cellula e interspecie, avendo un nuovo ruolo anche nell'interazione ospite-patogeno. Il loro contenuto è caratterizzato da elementi quali lipidi, acidi nucleici, proteine e miRNAs. In particolare, quest'ultimi sono in grado di andare a colpire meccanismi fondamentali essendo coinvolti in sistemi di regolazione complessi e modulazione dell'espressione genica dell'ospite.

Risultati: In primis, sono stati identificati i miRNAs selettivamente presenti all'interno degli EVs di *Anisakis*, e alcuni di essi, come ad esempio lin-4-5p e miR-100a-5p, hanno mostrato target genici molto interessanti coinvolti in processi come la proliferazione cellulare, l'inibizione apoptotica e l'induzione tumorale (Cavallero et al; 2022 Sci Rep. 12, 966). Successivamente, dati preliminari derivanti dall'analisi di trascrittomica comparativa, effettuata su organoidi intestinali umani esposti alle EVs di *Anisakis*, hanno rivelato la disregolazione di geni coinvolti in vie di segnalazione potenzialmente coinvolte nello sviluppo di un microambiente tumorale.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Ilaria Bellini: ilaria.bellini@uniroma1.it

Exploring pathogenicity and tumorigenic potential of the parasitic nematode *Anisakis* using human intestinal organoids and extracellular vesicles

Bellini Ilaria, Scribano Daniela, Arcà Bruno, Ambrosi Cecilia, Sarshar Meysam, Pronio Anna Maria, Palamara Anna Teresa, D'Amelio Stefano, Cavallero Serena.

Abstract

State of art: Anisakiasis is a zoonosis caused by consumption of raw fish parasitized with *Anisakis* spp third stage larvae (L3). Even if humans are accidental hosts, only one L3 is sufficient to induce mild to severe symptoms progressively leading to allergic reactions, erosive ulcers, chronic inflammation and granuloma formation (Audicana et al., 2008 Clin Microbiol Rev. 21, 360). Furthermore, reports regarding patients affected by gastric and intestinal tumors in co-occurrence with anisakiasis are increasing from endemic countries (Sonoda et al., 2015 Surg Today. 45,1321; Murata et al., 2018 BMC Infect Dis. 2018 4, 619; Kita et al., 2019 Int J Surg Case Rep. 60, 209). Despite its relevance for public health, investigations on inflammatory and immune response and tumorigenic potential are still very scarce. Additionally, to date few studies aimed to use in vitro models able to recount the microenvironment in which the parasite act during infection in humans and efforts about understanding messengers of pathogenicity are at their infancy (Speciale et al., 2017 Parasitol Res 116,2471; Carballeda-Sangiao et al., 2020 PLoS Negl Trop Dis. 14, e0008462).

Objective: the objective of this project is to deeply investigate *Anisakis*-human interactions through a comparative transcriptomic approach using: i) the human intestinal organoids, a bi or three-dimensional cutting-edge model capable of self-organization, self-renewal, and exhibiting the architecture and functionality of the organ of origin and ii) a newly discovered *Anisakis* messenger of pathogenicity, the extracellular vesicles (EVs). EVs are nano-scale particles of 100-1000 nm involved in cell-cell and inter-species communication, having a new role in host-pathogen interaction. EVs content is characterized by key elements such as lipids, nucleic acids, proteins and miRNAs, which are able to affect pivotal host pathways, involved in a complex regulatory network and modulating host's gene expression.

Results: Firstly, identification of miRNAs selectively packaged in *Anisakis* EVs were performed and interestingly, several miRNAs such as lin-4-5p and miR-100a-5p targets genes potentially involved in cell proliferation, apoptosis inhibition and tumors induction (Cavallero et al; 2022 Sci Rep. 12, 966). Secondly, preliminary data of comparative transcriptomics carried out on human intestinal organoids exposed to *Anisakis* EVs, showed a dysregulation of genes involved in pathways potentially responsible for the induction of a tumor microenvironment.

Department: Public Health and Infectious Diseases

Ilaria Bellini: ilaria.bellini@uniroma1.it

COVID-19 e Comunità Sapienza: strategie ed interventi di Sanità Pubblica

Renzi Erika, Massimi Azzurra, Baccolini Valentina, Migliara Giuseppe, De Vito Corrado, Marzuillo Carolina, Villari Paolo

Abstract

La Sezione di Igiene del Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive fin dalle prime fasi della pandemia si è impegnata nello sviluppo di strategie ed interventi di sanità pubblica volte al contrasto dell'infezione da SARS-CoV-2 con un focus sulla salute e la sicurezza della Comunità Sapienza.

Sono state sviluppate, in collaborazione con l'Ufficio Speciale di Protezione, Prevenzione e Alta Vigilanza, strategie di prevenzione primaria e secondaria per la gestione del COVID-19. È stata realizzata una campagna comunicativa attraverso la diffusione di un bundle con l'obiettivo di sensibilizzare la Comunità all'adesione alle misure preventive non farmacologiche disponibile al link:

<https://www.uniroma1.it/it/notizia/quattro-passi-la-sicurezza-della-comunita-della-sapienza>. Inoltre, per la gestione dei casi COVID-19 è stata realizzata una procedura di contact-tracing rivolta agli studenti e al personale.

A partire da marzo 2021, a seguito della ripresa delle attività in presenza, la Sezione, in collaborazione con la Governance e il Policlinico Umberto I, si è occupata dell'organizzazione di una Campagna di Screening per SARS-CoV-2 mediante test biomolecolari gratuiti rivolti a studenti e personale fragile. Lo Screening è stato attivo da marzo 2021 ad aprile 2022, sono stati eseguiti un totale di 8,959 tamponi biomolecolari nel I periodo di attività (marzo – giugno 2021) e 12.007 nel II periodo di attività (settembre 2021 - aprile 2022), di questi 460 tamponi sono risultati positivi.

Durante la campagna di Screening (periodo I), è stato realizzato uno studio cross-sectional per indagare l'esitazione vaccinale per le vaccinazioni COVID-19 (<https://doi.org/10.3390/vaccines9111292>), che ha coinvolto 5,784 studenti e ha evidenziando che gli studenti mostravano un'esitazione vaccinale più bassa rispetto alla media della popolazione generale.

Sempre nell'ambito della Campagna di Screening, sono stati condotti due studi caso-controllo (I e II periodo) per indagare i fattori di rischio per l'acquisizione dell'infezione da SARS-CoV-2 negli studenti di Sapienza. I risultati degli studi caso controllo (<https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1010130>) condotti su un campione di 120 (I periodo) e 366 studenti (II periodo) hanno evidenziato che gli universitari che avevano frequentato le attività didattiche in presenza sembravano meno esposti all'infezione da SARS-CoV-2 (II periodo: aOR 0.34 95% IC 0.15-0.77). E' inoltre emerso che aver avuto un contatto con un caso COVID-19 oppure con una persona con segni/sintomi riconducibili a COVID-19 (I periodo: aOR 8.39, 95% IC 2.38–29.54; II periodo: aOR 6.51, 95% IC 3.48-12.18), aver effettuato solo il ciclo primario di vaccinazione COVID-19 (II periodo: aOR 2.94, 95% IC 1.24-6.96) e aver frequentato discoteche (II periodo: aOR 4.07, 95% IC 1.52-10.90) nelle due settimane precedenti al tampone sembravano più esposti all'acquisizione dell'infezione da SARS-CoV-2.

Un ulteriore studio caso-controllo (<https://doi.org/10.3390/ijerph192114376>) condotto tra gli studenti di Sapienza segnalati all'Alta Vigilanza, ha confermato che gli studenti che avevano frequentato i locali di Sapienza erano risultati essere meno esposti all'infezione (aOR 0.29, 95% IC 0.08–0.97).

Le attività sviluppate dalla Sezione di Igiene hanno dimostrato che Sapienza è un ambiente sicuro anche grazie alle politiche di sanità pubblica rivolte al contrasto del COVID-19 implementate per la ripresa delle attività in presenza.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Erika Renzi: erika.renzi@uniroma1.it

COVID-19 and Sapienza Community: Public Health strategies and interventions

Renzi Erika, Massimi Azzurra, Baccolini Valentina, Migliara Giuseppe, De Vito Corrado, Marzuillo Carolina, Villari Paolo

Abstract

The Hygiene Section of the Department of Public Health and Infectious Diseases since the early stages of the pandemic has been committed to the development of public health strategies and interventions aimed at countering SARS-CoV-2 infection with a focus on the health and safety of the Sapienza Community. In collaboration with the Special Office for Prevention Protection and High Vigilance (High Vigilance), primary and secondary prevention strategies for the management of COVID-19 have been developed. First of all, a communication campaign was carried out through the dissemination of a bundle with the aim of increasing community awareness of adherence to non-pharmacological preventive measures available at the link: <https://www.uniroma1.it/it/notizia/quattro-passi-la-sicurezza-della-comunita-della-sapienza>. In addition, for the management of COVID-19 cases, a contact-tracing procedure was carried out for Sapienza students and staff.

Starting in March 2021, after the recovery of in-person activities, in collaboration with University Governance and the Policlinico Umberto I in Rome, the Hygiene Section was involved in the organization of a SARS-CoV-2 testing program consisting of free biomolecular tests for students and frail staff. The screening campaign was implemented from March 2021 to April 2022, with a total of 8,959 swabs taken in the I period of activity (March-June 2021) and 12,007 biomolecular swabs in the II period of activity (September 2021-April 2022), with a total of 460 positive tests.

During the SARS-CoV-2 testing program, a cross-sectional study was conducted to investigate vaccine hesitancy for COVID-19 vaccination. The study (<https://doi.org/10.3390/vaccines9111292>) involved 5,784 Sapienza students in the first period of the screening activities and reported that the students surveyed showed less vaccine hesitancy for COVID-19 vaccination than the general population, as reported in the literature.

In addition, as part of the screening testing program, two case-control studies (period I and II) were conducted to identify the risk factors for acquiring SARS-CoV-2 infection. Results of case-control studies (<https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1010130>) conducted on a sample of 120 students (period I) and 366 students (period II) showed that university students who had attended lectures in-person appeared to be less exposed to SARS-CoV-2 infection (II period: aOR 0.34 95% CI 0.15-0.77). It was also found that having had contact with a case of COVID-19 or a person with signs/symptoms suggestive of COVID-19 (I period: aOR 8.39, 95% CI 2.38-29.54; II period: aOR 6.51, 95% CI 3.48-12.18), having had only the primary cycle of COVID-19 vaccination (II period: aOR 2.94, 95% CI 1.24-6.96) and having attended clubs (II period: aOR 4.07, 95% CI 1.52-10.90) in the two weeks before testing increased the likelihood of SARS CoV-2 infection.

At the same time, a further case-control study (<https://doi.org/10.3390/ijerph192114376>) among students reported as positive to the High Vigilance surveillance system, confirmed that students who had attended in-person educational activities were less exposed to COVID-19 (aOR 0.29, 95% CI 0.08-0.97).

In conclusion, the activities developed by the Hygiene Section have shown that Sapienza is a safe environment, also due to the public health policies aimed at countering SARS-CoV-2 infection that have been implemented for the return of in-person activities.

Department: Public Health and Infectious Diseases

Erika Renzi: erika.renzi@uniroma1.it

Istruzioni per infettare: studio del comportamento competitivo tra batteri intestinali in organoidi

Scribano Daniela, Sarshar Meysam, Pronio Annamaria, Zagaglia Carlo, Ambrosi Cecilia, Palamara Anna Teresa

Abstract

Il tratto gastrointestinale umano è colonizzato da una complessa comunità di microrganismi, il microbiota, che svolge funzioni fondamentali tra cui l'induzione dello sviluppo del sistema immunitario, la regolazione dell'integrità della barriera intestinale e la sintesi di molecole cruciali per la salute umana. Batteri patogeni, patogeni opportunisti e patobionti sono in grado di colonizzare il tratto intestinale competendo contro la flora residente attraverso l'espressione di specifici fattori di virulenza. D'altra parte, il ruolo dei ceppi commensali, tra cui anche i probiotici, è quello di contrastare la colonizzazione da parte dei ceppi patogeni mediante il fenomeno noto come colonization resistance, mantenendo così l'omeostasi. Gli organoidi intestinali offrono un modello "in vivo-like" della superficie epiteliale intestinale per studiare come si gioca questa competizione. Quindi, abbiamo confrontato la capacità del ceppo probiotico di Escherichia coli Nissle 1917 di contrastare l'infezione da parte del ceppo di un ceppo di E. coli enteropatogeno (EPEC, ceppo E2348/69) in organoidi intestinali. Sono stati condotti esperimenti di co-infezione di organoidi intestinali murini coltivati in 2D (contatto apicale) ed in 3D (contatto baso-laterale). A vari tempi, gli organoidi sono stati lisati per la conta dei batteri aderenti o processati per le marcature in fluorescenza. I risultati hanno mostrato una maggiore capacità del ceppo Nissle di aderire alla porzione apicale delle cellule intestinali, riducendo così la capacità di colonizzazione da parte del ceppo EPEC. Inoltre, abbiamo osservato per la prima volta l'abilità dell'EPEC di aderire alla regione baso-laterale dell'epitelio e questa interazione non era influenzata dalla presenza del ceppo Nissle. I risultati hanno dimostrato che gli organoidi intestinali sono il modello in vitro più adatto per valutare la capacità di specifici ceppi probiotici di proteggere il tessuto intestinale dalla colonizzazione da parte di ceppi patogeni. Inoltre, questo modello offre la possibilità di studiare nuovi determinanti di virulenza che consentono ai patogeni intestinali di interagire con la regione baso-laterale dell'epitelio stesso.

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Daniela Scribano: daniela.scribano@uniroma1.it

Instructions for infection: a study of the competitive scenario between intestinal bacteria using organoids

Scribano Daniela, Sarshar Meysam, Pronio Annamaria, Zagaglia Carlo, Ambrosi Cecilia, Palamara Anna Teresa

Abstract

The human gastrointestinal tract is colonized by a complex ecological community of microorganisms, known as microbiota, responsible for vital functions, including the induction of immune system development, regulation of intestinal barrier integrity and synthesis of crucial molecules for human health. Bacterial pathogens, opportunistic pathogens and pathobionts are able to colonize the intestinal tract by outcompeting the resident flora through the expression of specific virulence factors. On the other hand, the role of beneficial strains, such as probiotics, is to restrain invading pathogens from conquering a specific niche by the colonization resistance phenomenon, thereby improving human health. Intestinal organoids represent an “in vivo-like” model of the intestinal epithelial surface to study where this competition battle is played. Hence, we compared the efficacy of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 to prevent enteropathogenic *E. coli* (EPEC, strain E2348/69) infection in intestinal organoids. Time course co-infection experiments were performed on 2D and 3D cultured mouse intestinal organoids mimicking the apical and the basolateral contact, respectively. At the selected time points organoids were either lysed for bacterial counting or stained for fluorescence experiments. Results showed an enhanced capability of Nissle strain to adhere to the apical side of intestinal cells, thereby reducing EPEC attachment. Furthermore, we observed for the first time the ability of EPEC to contact intestinal tissues from the basal side and this interaction was not affected by the presence of the Nissle strain. In conclusion, results demonstrated that intestinal organoids are the most suitable in vitro model to test the efficiency of specific probiotic strains in protecting intestinal tissues from pathogens. Moreover, they offer the possibility to unveil new virulence traits enabling intestinal pathogens to interact with the basal side of the epithelium.

Department: Public Health and Infectious Diseases

Daniela Scribano: daniela.scribano@uniroma1.it

Valutazione della vitalità delle lesioni in ambito forense

Nicola Di Fazio

Abstract

L' Istituto di Medicina Legale dell'Università Sapienza di Roma è da sempre coinvolto in plurimi e fiorenti ambiti di ricerca inerenti alla patologia forense grazie all' relativo altissimo numero di autopsie annue.

Una simile mole di dati permette di effettuare studi casistici e sperimentali ad ampio spettro, consentendo di arricchire i dati provenienti dalla semplice indagine autoptica con studi radiologici, laboratoristici, genetici ed immunoistochimici e di effettuare un confronto multicentrico con altri atenei.

Nello specifico, un filone di ricerca attualmente attivo è costituito dallo studio della cosiddetta vitalità delle lesioni, ovvero l'analisi dei dati macroscopici, istopatologici, immunoistochimici e genomico-metabolomici tesa a rispondere al frequente e fondamentale interrogativo circa l'ascrivibilità di una lesione a un'epoca antecedente o successiva al decesso e, talora, attribuire validità causale a una specifica lesione ai fini della morte dell'individuo.

Rispondere a un simile interrogativo rappresenta una sfida per il medico-legale, e un elemento di indubbio interesse a fini di giustizia.

Un eccellente marker di vitalità tissutale ampiamente utilizzato è costituito dalla Glicoforina A, antigene di membrana specifico dei globuli rossi, dimostratosi altamente specifico e resistente alla degradazione putrefattiva a intervalli post-mortali estremamente elevati.

Un ulteriore argomento di interesse è certamente identificabile nella diagnosi di vitalità delle lesioni da calore, fino alla carbonizzazione, in virtù della ricerca anticorpo-mediata di proteine tipiche del danno da calore, quali le Heat Shock Proteins, molecole citoplasmatiche a bassissima latenza temporale di espressione.

Pertanto, grazie alla collaborazione con numerose altre università italiane ed europee, l'approfondimento di markers immunoistochimici per la diagnosi e datazione di lesioni costituisce un ambito a cui attualmente il nostro Istituto dedica la propria attenzione al fine di garantire un livello di avanguardia tecnico-scientifica adeguato all'ateneo più grande d'Europa.

Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore

Nicola Di Fazio: nicola.difazio@uniroma1.it

Skin lesion vitality assessment in forensic science

Nicola Di Fazio

Abstract

The Department of Medico-Legal Science of the Sapienza University of Rome has always been involved in many flourishing areas of research related to forensic pathology, thanks to the relatively very high number of autopsies per year. Such an amount of data makes it possible to carry out case studies and wide-spectrum experiments, allowing to enrich the data coming from the simple autopsy investigation with radiological studies, to carry out a multicentric comparison with other universities. In particular, an active research strand is the study of the so-called vitality of lesions, namely the analysis of macroscopic, histopathological, immunohistochemical, and genomic data-metabolomics to answer the frequent and fundamental question about the attribution of an injury to a time before or after death and, sometimes, to attribute causal validity to a specific injury for the death of the individual.

Answering this question is a challenge for the medical examiner and an element of undoubted interest in justice.

An excellent marker of tissue vitality widely used is constituted from the Glycophorin A, a red cells membrane antigen, demonstrated highly specific and resistant to the putrefactive degradation at extremely high post-fatal intervals.

A further topic of interest is certainly identifiable in the diagnosis of the vitality of heat lesions, up to carbonization, by antibody-mediated research of proteins typical of heat damage, such as heat shock proteins, and cytoplasmic molecules with very low temporal latency of expression. Therefore, thanks to the collaboration with numerous other Italian and European universities, the deepening of immunohistochemical markers for the diagnosis and dating of lesions is an area to which our Institute currently devotes its attention to ensure a level of technical and scientific cutting-edge adequate to the largest university in Europe.

Department: Anatomical, Histological, Forensic and Locomotor System Sciences

Nicola Di Fazio: nicola.difazio@uniroma1.it

Fratture complesse dell'epifisi prossimale dell'omero trattate con un costrutto biomeccanicamente validato di fili filettati bloccati

Vittorio Candela, Gianluca Cinotti, Daniele De Meo, Giuseppe Giannicola, Stefano Gumina, Pietro Persiani, Ciro Villani, Carmine Zoccali

Abstract

Le placche a stabilità angolare ed il chiodo endomidollare sono i dispositivi più comunemente utilizzati per la fissazione delle fratture tre frammenti della testa omerale, a seconda delle caratteristiche della frattura (integrità della cerniera mediale e delle colonne laterale e mediale), età del paziente e grado di osteoporosi). La letteratura indica che l'utilizzo di questi sistemi di fissazione comporta una percentuale di complicanze maggiori (necrosi avascolare, mancato consolidamento e sintering) che varia dal 9% al 40%. Recentemente, abbiamo pubblicato i risultati a lungo termini in seguito a fissazione delle fratture complesse della testa omerale attraverso un sistema di fili filettati bloccati preceduti da una riduzione con mini approccio deltopettorale (2,5 cm); tali risultati sono sovrapponibili a quelli della placca a stabilità angolare e del chiodo endomidollare; tuttavia, il tasso di complicanze maggiori è risultato essere piuttosto inferiore. Il mantenimento dell'ematoma periostale e del focolaio fratturativo, insieme alla conservazione del bone stock della testa omerale (senza perforazioni multiple della testa dell'omero) e del tessuto midollare potrebbe spiegare il minor tasso di complicanze maggiori. Anche il tasso di infezioni superficiali e profonde è inferiore, probabilmente a causa della ridotta estensione dell'approccio chirurgico e del tempo operatorio più breve. Inoltre, è plausibile che la rimozione precoce del dispositivo di fissaggio possa facilitare la guarigione ossea.

Il sistema di fissazione proposto crea un costrutto in grado di limitare la traslazione e il collasso della testa omerale nel periodo postoperatorio. Tuttavia, nessuna indagine biomeccanica ha mai convalidato questo costrutto. Abbiamo quindi eseguito un'analisi incrementale agli elementi finiti dei meccanismi di cedimento tenendo conto dell'evoluzione del gap distance e dello stress all'interfaccia osso-impianto di questo costrutto al fine di validare l'affidabilità del sistema e valutare l'eventuale esistenza di una migliore configurazione dei fili filettati bloccati.

Il costrutto studiato è risultato biomeccanicamente valido; consente solo micromovimenti (un millesimo della dimensione caratteristica dell'omero) che non sono in grado di provocare rotazione e traslazione della testa omerale. Inoltre, la struttura genera sollecitazioni di stress accettabili sulle aree sensibili della testa omerale fratturata

Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore

Vittorio candela: vittorio.candela@uniroma1.it

Treatment of complex humeral head fractures with a biomechanics validated construct of blocked threaded wires

Vittorio Candela, Gianluca Cinotti, Daniele De Meo, Giuseppe Giannicola, Stefano Gumina, Pietro Persiani, Ciro Villani, Carmine Zoccali

Abstract

Locking plates and intramedullary nail are the most commonly used devices for the fixation of three-part humeral head fractures, each of which should be employed depending on the characteristics of the fracture (integrity of the medial hinge and of the lateral and medial columns), patient age and osteoporosis degree. Literature data indicate that the use of these fixation systems involves a percentage of major complications (avascular necrosis, non-union and sintering) that ranges from 9% to 40%. Recently, fixation of complex three-part humeral head fractures through a system of blocked threaded wires (BTW) and a mini (2,5 cm) deltopectoral approach has been reported to lead to similar clinical and radiological outcomes with respect to locking plate and nail; but, major complication rate was quite lower. The maintenance of periosteal and fracture hematoma, together with the preservation of proximal humeral bone stock (with no multiple perforations of the humeral head) and of the medullary tissue could explain the lower rate of major complications. Rate of superficial and deep infections was also lower, probably due to the reduced extent of the surgical approach and to the shorter operating time. In addition, it is plausible that the early removal of the fixation device might facilitate bone healing.

The proposed fixation system creates a BTW construct able to limit translation and collapse of the humeral head in the postoperative period. However, no biomechanical investigation has ever validated this construct.

We performed a finite element incremental analysis of failure mechanisms accounting for the evolution of gap distance and stress at the bone-implant interface of this BTW construct for three-part proximal humeral fractures in order to validate the system reliability and to evaluate the existence of better performing configurations of BTW.

The studied construct was found to be biomechanically valid; it only allows micromovements (one-thousandth of the characteristic humerus size) that are not able to cause humeral head rotation and translation. Furthermore, the construct generates acceptable pressure stresses on sensible areas of the fractured humeral head.

Department: Anatomical, Histological, Forensic and Locomotor System Sciences

Vittorio candela: vittorio.candela@uniroma1.it

Scoprire l'infinitamente piccolo tramite la Microscopia Elettronica

Selenia Miglietta

Abstract

Due ricercatori dell'Università Berlino Ernst Ruska e Max Knoll, rispettivamente un fisico ed un ingegnere elettrico, crearono il primo prototipo di microscopio elettronico nel 1931.

Esistono due tipi di microscopi elettronici comuni: quello a trasmissione e quello a scansione.

La microscopia elettronica ha una vasta gamma di applicazioni pratiche, la capacità di visualizzare la struttura microscopica di un campione a una risoluzione più elevata rispetto alla microscopia ottica gli conferisce un ruolo unico e con un grandissimo potenziale nella ricerca scientifica e nelle applicazioni industriali.

La microscopia elettronica applicata alla biomedicina è utile per comprendere i meccanismi molecolari alla base di processi fisiologici e patologici di una malattia, osservare la struttura 3D di tessuti biologici o cellule, determinare la struttura delle proteine e osservare virus e batteri. È una tecnica che viene spesso utilizzata e applicata anche per scopi industriali intervenendo nello sviluppo di nuovi prodotti.

I microscopi elettronici rivelano meraviglie nascoste che sono più piccole di quanto l'occhio umano possa vedere. Osservare il mondo attraverso i microscopi elettronici può rendere visibile l'invisibile, espandere i nostri orizzonti trasformando le nostre percezioni.

Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore

Selenia Miglietta: selenia.miglietta@uniroma1.it

Discovering the infinitely small through Electron Microscopy

Selenia Miglietta

Abstract

Berlin Technical University researchers Ernst Ruska and Max Knoll – a physicist and an electrical engineer, respectively – created the first prototype electron microscope in 1931.

There are two common types of electron microscopes: transmission electron microscopes and scanning electron microscopes.

Electron microscopy has a several range of applications in practice. The ability to view the microscopic structure of a specimen at a higher resolution than what is possible with optical microscopy gives it a unique role and a great potential in scientific research or in industry applications.

Electron microscopy applied to biomedicine is useful for understanding the molecular mechanisms underlying the physiological and pathological processes of a disease, observing the 3D structure of biological tissues or cells, determine the structure of proteins and observe viruses in a biological context. This technique is often used for industrial purposes to assist in developing new products and throughout the manufacturing process.

Electron microscopes reveal hidden wonders that are smaller than the human eye can see. Observing the world through electron microscopes can make the invisible visible, expand our horizons transforming our perceptions

Department: Anatomical, Histological, Forensic and Locomotor System Sciences

Selenia Miglietta: selenia.miglietta@uniroma1.it

Trascrittomica Spaziale: un punto d'incontro tra l'istologia e la biologia molecolare

D'Ercole Chiara, D'Angelo Paolo, Ruggieri Veronica, Cristina Parisi, Giordani Lorenzo, Madaro Luca

Abstract

Il muscolo striato è una struttura altamente organizzata composta da domini anatomici ben definiti con compiti integrati ma distinti. Finora, la mancanza di una correlazione diretta tra l'architettura del tessuto e l'espressione genica ha limitato la nostra comprensione di come ogni unità risponda a contesti fisio-patologici. In questo lavoro mostriamo come l'uso combinato della Trascrittomica Spaziale e dell'immunofluorescenza possa colmare questa lacuna, consentendo l'identificazione di domini funzionali del muscolo e la caratterizzazione della loro risposta alle perturbazioni esterne.

Dipartimento di Scienze anatomiche, istologiche, medico-legali e dell'apparato locomotore

Luca Madaro: luca.madaro@uniroma1.it

Spatial Transcriptomics: a meeting point between histology and molecular biology

D'Ercole Chiara, D'Angelo Paolo, Ruggieri Veronica, Cristina Parisi, Giordani Lorenzo, Madaro Luca

Abstract

Striated muscle is a highly organized structure composed of well-defined anatomical domains with integrated but distinct tasks. Until now, the lack of direct correlation between tissue architecture and gene expression has limited our understanding of how each unit responds to physio-pathological contexts. In this work we show how the combined use of Spatial Transcriptomics and immunofluorescence can fill this gap, enabling the identification of functional domains of muscle and the characterization of their response to external perturbations.

Department: Anatomical, Histological, Forensic and Locomotor System Sciences

Luca Madaro: luca.madaro@uniroma1.it

Ruolo del metabolismo degli aminoacidi nel potenziale metastatico delle cellule tumorali mammarie e polmonari

Alessio Paone, Sara Di Russo, Francesca Romana Liberati, Amani Bouzidi, Serena Rinaldo, Francesca Cutruzzolà

Abstract

Introduzione. Le metastasi rappresentano la manifestazione più drammatica e pericolosa dei tumori. Il processo metastatico è complesso, ed inizia quando numerose cellule tumorali lasciano continuamente il tumore primario e penetrano nel flusso ematico. Alcune di queste cellule vengono riconosciute dal sistema immunitario ed eliminate, altre arrivano fino ai microcapillari dell'organo bersaglio, aderiscono alle pareti di questi vasi per poi attraversarle invadendo il tessuto dell'organo e proliferando danno vita ad una metastasi. Noi studiamo uno specifico momento di questo processo, cioè quando le cellule tumorali "extravasano", cioè lasciano i vasi sanguigni per invadere il parenchima dell'organo bersaglio. Siamo partiti da una vecchia domanda ancora senza risposta: perché cellule provenienti dal tumore al seno o al polmone formano metastasi principalmente nel cervello? Abbiamo osservato che le cellule tumorali rilasciano continuamente specifiche citochine infiammatorie, in particolare l'interleuchina 8, questa proteina è in grado di allentare la stretta connessione tra le cellule endoteliali dei microvasi cerebrali. L'endotelio dei vasi cerebrali assieme ai periciti e agli astrociti nel cervello formano quella che viene definita barriera emato encefalica (BBB), cioè quella barriera altamente selettiva che separa il cervello dal resto dell'organismo e lo difende bloccando il passaggio di cellule e molecole. Le citochine rilasciate dalle cellule tumorali inducono l'apertura della BBB, gli aminoacidi neurotrasmettitori presenti in abbondanza nel cervello fluiscono quindi nei micro-capillari dove vengono utilizzati dalle cellule tumorali per aumentare la loro capacità migratoria; queste cellule, stimulate dagli aminoacidi, sono così in grado di attraversare agevolmente la BBB e di invadere il parenchima cerebrale.

Risultati. Abbiamo dimostrato che inibendo la capacità delle cellule tumorali di importare aminoacidi neurotrasmettitori come serina, glicina e glutammato, rilasciati nei capillari del cervello come descritto, si determina un blocco della capacità migratoria di queste cellule. La carenza di aminoacidi produce nella cellula una riduzione dei livelli di ATP e NADPH che attivano la AMP chinasi; questo sensore metabolico a sua volta inibisce la polimerizzazione dell'actina alla periferia della cellula bloccando la formazione dei lamellipodi, le strutture che permettono alle cellule di muoversi. Questi esperimenti in cellula sono stati validati in vivo: iniettando cellule tumorali specializzate nella carotide dei topi queste formano efficacemente metastasi nel cervello, trattando questi animali con un inibitore che blocca l'importo della glicina nelle cellule tumorali si osserva una drammatica riduzione delle metastasi cerebrali.

Conclusioni. Questo progetto apre nuove prospettive terapeutiche per il trattamento di pazienti affetti da tumore al seno o al polmone. Infatti, utilizzando questi inibitori che bloccano l'importo di aminoacidi nelle cellule tumorali potremmo essere in grado di ridurre fortemente la probabilità che questi pazienti sviluppino metastasi cerebrali, che rappresentano in ogni caso la manifestazione più drammatica e pericolosa di questo tipo di patologia.

Dipartimento di Scienze biochimiche "Alessandro Rossi Fanelli"

Alessio Paone: alessio.paone@uniroma1.it

Role of amino acid metabolism in the metastatic potential of breast and lung cancer cells

Alessio Paone, Sara Di Russo, Francesca Romana Liberati, Amani Bouzidi, Serena Rinaldo, Francesca Cutruzzolà

Abstract

Introduction. Metastasis formation represents a critical step in tumor progression. Numerous tumor cells constantly leave the primary tumor and enter the circulation. Some of these cells are detected by the immune system and removed, while others reach the microcapillaries of the target organ, adhere to the walls of these vessels, and then cross them, infiltrating the organ's tissue and growing to form a metastasis. We are studying a specific moment of this process: the "extravasation", when the cells leave the blood vessels to invade the parenchyma of the target organ. We began with an old unanswered question: why do breast and lung cancer cells form metastasis mostly in the brain? We noticed that tumor cells continually release certain inflammatory cytokines, including interleukin 8, which is able to weaken the connections between the endothelial cells of the brain microvessels. The endothelium of the cerebral arteries, along with the pericytes and astrocytes in the brain, forms the blood-brain barrier (BBB), which is the highly selective barrier that divides the brain from the rest of the body and protects it by preventing the passage of cells and molecules. After the weakening of the BBB, the neurotransmitter amino acids, present in abundance in the brain, flow into the micro capillaries, and can be used by the tumor cells to increase their migratory capacity. Stimulated by the neurotransmitter amino acids, the tumor cells are thus able to easily cross the BBB and invade the brain parenchyma.

Results. We have demonstrated that reducing the ability of tumor cells to uptake neurotransmitter amino acids such as serine, glycine, and glutamate, which are released into brain capillaries as described, inhibits the migratory potential of these cells. Lack of amino acids causes an intracellular drop in ATP and NADPH, which activates the enzyme AMP kinase, which in turn blocks the polymerization of the actin at the periphery of the cell by preventing the formation of lamellipodia, the structures that enable cells to move. These experiments in cellula have been validated in vivo: by injecting specialized tumor cells into the carotid artery of a mouse, we have observed that they effectively form brain metastases. By treating these animals with an inhibitor that blocks the uptake of glycine in the tumor cells, we have observed a significant reduction of the formation of brain metastases.

Conclusions. This project opens up new therapeutic perspectives: by employing these inhibitors that decrease the quantity of amino acids in cancer cells, we may be able to significantly lower the risk that breast or lung cancer patients would develop brain metastases, the most dramatic and lethal manifestation of this pathology.

Department: "Alessandro Rossi Fanelli" Biochemical Sciences

Alessio Paone: alessio.paone@uniroma1.it

Studi di interazioni proteina-proteina mediate da proteine adattatrici di interesse patologico

Angelo Toto, Stefano Gianni, Francesca Cutruzzolà, Alessio Paone, Romano Silvestri, Giuseppe La Regina, Antonio Coluccia

Abstract

Introduzione: Le interazioni tra proteine sono un evento fondamentale nella cellula, garantendo la corretta trasduzione di un gran numero di segnali molecolari in risposta a diversi stimoli. Una grande porzione di interazioni proteina-proteina (PPI) sono mediate da proteine adattatrici. Esse rappresentano una classe di proteine che agiscono come intermediari tra molecole di segnalazione e le loro proteine bersaglio, . Esercitano la loro funzione riconoscendo leganti specifici nell'ambiente cellulare grazie alla presenza di domini di interazione proteina-proteina, come SH2, SH3, domini PDZ, senza possedere alcuna attività catalitica. Grb2 è una proteina adattatrice essenziale per una varietà di funzioni di base e agisce come intermediario critico in diverse vie di segnalazione oncogeniche. Grb2 ha una struttura modulare, caratterizzata da un dominio SH2 fiancheggiato da due domini SH3. La funzione di Grb2 è stata correlata alla patogenesi di diverse neoplasie umane ed è stato trovato sovraespresso in diversi tumori. Gab2 è uno dei principali interattori di Grb2. È una proteina scaffold che organizza diverse vie di segnalazione, agendo come piattaforma per l'assemblaggio di reti di interazione complesse. Gab2 è stato trovato sovraespresso in diverse patologie tumorali.

Metodi: Abbiamo studiato la reazione di legame tra Grb2 e un peptide che imita una porzione specifica di Gab2 utilizzando il Trasferimento di Energia di Risonanza Fluorimetrica (FRET) combinato con tecniche di cinetica rapida e ultrarapida, (stopped-flow e temperature-jump). La reazione è stata seguita in un ampio spettro di condizioni sperimentali (variando pH, temperatura e forza ionica) monitorando la variazione del segnale di fluorescenza durante il legame. I contributi di singoli residui negli eventi di legame sono stati individuati tramite mutagenesi sito-specifica.

Risultati: Abbiamo determinato la presenza di una rete energetica nella porzione C-SH3 di Grb2 durante il legame con Gab2 utilizzando l'analisi di ciclo di mutante doppio, un potente approccio quantitativo basato sulla mutagenesi in congiunzione con esperimenti cinetici. I dati hanno rivelato la presenza di una rete energetica diffusa che modula l'affinità tra il dominio SH3 e Gab2. Un certo numero di potenziali molecole inibitrici è stato identificato tramite virtual screening e utilizzato in esperimenti in vitro e in cellula.

Dipartimento di Scienze biochimiche "Alessandro Rossi Fanelli"

Angelo Toto: angelo.toto@uniroma1.it

Studies of protein-protein interactions mediated by adapter proteins of pathological interests

Angelo Toto, Stefano Gianni, Francesca Cutruzzolà, Alessio Paone, Romano Silvestri, Giuseppe La Regina, Antonio Coluccia

Abstract

Introduction: Interactions between proteins is a fundamental event in the cell, ensuring the correct transduction of a large number of molecular signals in response to several stimuli. A large portion of protein-protein interactions (PPIs) are mediated by adapter proteins, a class of signaling molecules that act as intermediaries between signaling molecules and their target proteins. This class of proteins is characterized by the presence of protein-protein interaction domains, such as SH2, SH3, PDZ domains, exerting their function by recognizing and recruiting specific ligands in the cellular environment, without possessing any catalytic activity. Grb2 is an adapter protein essential for a variety of basic cellular functions and acts as a critical downstream intermediary in several oncogenic signaling pathways. Grb2 has a modular structure, characterized by one SH2 domain flanked by two SH3 domains. Grb2 signaling has been implicated in the pathogenesis of several specific human malignancies, and it has been found overexpressed in different tumors. Gab2 is one of the main interactors of Grb2. It is a scaffolding protein that organizes several signaling pathways, acting as a platform for the assembly of complex interaction networks. Gab2 was found overexpressed in several cancer pathologies.

Methods: We studied the binding reaction between Grb2 and a peptide mimicking a specific portion of Gab2 by Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) combined with fast and ultrafast kinetic techniques, such as stopped-flow and temperature jump methodologies. The reaction was followed in a wide spectrum of experimental conditions (for example varying pH, temperature and ionic strength) by monitoring the change in fluorescence signal upon binding. Contributions of single residues in the binding events were pinpointed by site-directed mutagenesis.

Results: We determined the presence of an energetic network in the C-SH3 domain of Grb2 upon binding with Gab2 by double mutant cycle analysis, a powerful quantitative approach based on mutagenesis in conjunction with kinetic experiments. Data revealed the presence of a sparse energetic network that modulates the affinity between the SH3 domain and Gab2. A number of potential inhibitor molecules were identified by virtual screening and employed in *in vitro* and *in cellula* experiments.

Department: "Alessandro Rossi Fanelli" Biochemical Sciences

Angelo Toto: angelo.toto@uniroma1.it

Studi strutturali e funzionali per lo sviluppo 'structure-based' di nuovi farmaci tripanocidi

Annarita Fiorillo

Abstract

Introduzione: Leishmaniosi e tripanosomiasi sono zoonosi trasmesse da insetti vettori causate da parassiti dei generi *Leishmania* e *Trypanosoma*. Si stima che, complessivamente, questi parassiti colpiscono 20 milioni di persone nel mondo, provocando 100.000 morti ogni anno. Tali infezioni sono incluse nell'elenco delle malattie neglette in quanto sono diffuse nella fascia tropicale e sub-tropicale in alcuni dei paesi più poveri del mondo. Tuttavia la leishmaniosi è endemica in tutto il bacino del Mediterraneo e il cambiamento climatico sta favorendo la diffusione dell'insetto vettore, estendendo il rischio di esposizione umana a regioni precedentemente fuori dal raggio della malattia. I trattamenti attualmente disponibili sono molto insoddisfacenti a causa della scarsa efficacia, dell'elevata tossicità e della crescente resistenza, pertanto vi è un urgente bisogno di nuove classi terapeutiche.

Lo structure-based drug discovery è un potente approccio utilizzato nelle prime fasi dello sviluppo di farmaci il cui successo dipende fortemente dall'attenta selezione e dalla profonda caratterizzazione strutturale del target molecolare.

Il presente studio si focalizza su due target che hanno un ruolo essenziale nell'omeostasi redox e nella proliferazione: la tripanotione reduttasi (TR) e l'ornitina decarbossilasi (ODC). TR è un target ampiamente riconosciuto per lo sviluppo di farmaci tripanocidi ma, nonostante i notevoli sforzi compiuti negli ultimi anni, ad oggi nessuno dei lead proposti è stato ancora a studi preclinici, a causa dell'attività subottimale o del problema della tossicità. ODC è un target consolidato per gli agenti antiproliferativi in generale ma nel caso di *leishmania* mancano le informazioni strutturali necessarie per l'approccio structure-based.

Metodi: Su TR è stato effettuato uno screening cristallografico fragment-based presso la piattaforma XChemin UK, tecnica all'avanguardia che, identificando piccoli ligandi ("frammenti") con nuovi scaffold molecolari e nuove modalità di azione, fornisce una mappatura dettagliata degli "hot spot" di interazione e supporta la progettazione razionale di composti efficaci. Inoltre, è stata eseguita la prima dettagliata caratterizzazione strutturale di ODC da *Leishmania* spp. Tramite l'integrazione di tecniche complementari come XRD, SAXS e cryo-EM.

Risultati: Lo screening ha identificato alcuni frammenti particolarmente adatti all'ottimizzazione mediante le strategie di merging e linking, nonché un nuovo sito allosterico di TR. Questi risultati, integrati in uno studio SAR in collaborazione con l'Università di Bologna e tuttora in corso, hanno portato alla progettazione e sintesi di potenti inibitori di TR attivi nel range basso-micromolare. La caratterizzazione strutturale di ODC ha rivelato l'esistenza di regioni sia strutturate che destrutturate che distinguono il target dalla sua controparte umana, ponendo le basi per la progettazione di inibitori selettivi.

Dipartimento di Scienze biochimiche "Alessandro Rossi Fanelli"

Annarita Fiorillo: annarita.fiorillo@uniroma1.it

Structural And Functional Studies For Structure-Based Trypanocidal Drug Discovery

Annarita Fiorillo

Abstract

Introduction: Leishmaniasis and trypanosomiasis are vector borne zoonosis transmitted by parasites from *Leishmania* and *Trypanosoma* spp. It is estimated that, overall, these parasites affect 20 million of people worldwide, causing 100.000 deaths every year. These infections are included in the list of the neglected tropical diseases and are diffused in some of the poorest countries in the world. However, leishmaniasis is endemic in the whole Mediterranean basin and climate change is promoting the spreading of the insect vector, expanding the risk of human exposure to regions previously out of the range of the disease. Currently available treatments are very unsatisfying due to poor efficacy, high toxicity and increasing resistance, thus there is an urgent need for new classes of therapeutics.

Structure-based drug discovery is a powerful approach to the early stages of drug development, strongly relying on the careful selection and the deep structural characterization of the target.

We focused on two drug targets with a critical role in redox homeostasis and proliferation: trypanothione reductase (TR), and ornithine decarboxylase (ODC). TR is an assessed target for trypanocidal drug discovery but, despite considerable effort spent in the last years, none of the leads proposed has been yet promoted to preclinical trials, due to sub-optimal activity or toxicity issue. ODC is a well-known target for antiproliferative agents in general, but no structural information is available for ODC from leishmania parasites.

Methods: We carried out a crystallographic fragment screening on TR at the XChem facility in UK, a state-of-the-art approach in drug discovery that can identify small ligands ("fragments") with new molecular scaffolds as well as new modes of action, giving a detailed mapping of the interaction hot-spots and aiding the design of effective compounds. Moreover, we performed the first structural characterization of ODC from *Leishmania* spp. by complementary techniques such as XRD, SAXS and cryo-EM.

Results: The screening identified some fragments particularly suited to follow-up optimization by linking and merging strategy as well as a new allosteric site. These results, integrated in an ongoing SAR study in collaboration with Bologna University, led to the design and synthesis of potent inhibitors of TR active in the low micromolar range. The structural characterization of ODC revealed the existence of both folded and unfolded regions that distinguish the target from its human counterpart, laying the basis for the design of selective inhibitors.

Department: "Alessandro Rossi Fanelli" Biochemical Sciences

Annarita Fiorillo: annarita.fiorillo@uniroma1.it

Il ruolo del miR-802 nel segnale dell'insulina ed il suo impatto nella sindrome di Down

Antonella Tramutola, Eugenio Barone, Fabio Di Domenico, Marzia Perluigi

Abstract

Introduzione. La sindrome di Down (SD) è caratterizzata da deficit neurologico, che include una progressiva perdita delle capacità di apprendimento e della memoria. Queste disfunzioni cognitive sono associate ad alterazioni molecolari frequenti anche nella malattia di Alzheimer (AD), quali l'accumulo della proteina β amiloide, l'insorgenza d'insulino-resistenza a livello cerebrale e l'over-espressione di alcuni microRNAs (miRNAs). In particolare, il miR-802, codificato sul cromosoma 21, sembra avere un ruolo chiave nella via di trasduzione del segnale dell'insulina in malattie metaboliche, quali il diabete e l'obesità caratterizzate dallo sviluppo di insulino-resistenza. Sulla base di queste evidenze, lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare l'espressione del miR-802 nella SD ed il suo ruolo nelle alterazioni del segnale dell'insulina a livello celebrale.

Metodi. Gli esperimenti per valutare l'espressione genica del miR-802 sono stati condotti su campioni autoptici di corteccia prefrontale prelevata da soggetti con SD e relativi controlli, nonché in un modello murino della SD, i topi Ts65Dn a 3 e a 9 mesi di età. Inoltre, attraverso un'analisi bioinformatica abbiamo identificato potenziali geni target del miR-802 e tra questi ci siamo, poi, focalizzati su geni che codificano per proteine della via di trasduzione del segnale dell'insulina (PTEN e GSK-3 β), la cui trascrizione è stata valutata in vitro in cellule SHSY-5Y che over-esprimono il miR-802.

Risultati. I risultati ottenuti mostrano un'elevata espressione del miR-802 nei soggetti con SD rispetto ai controlli e nel cervello dei topi Ts65Dn a 9 mesi d'età. L'over-espressione del miR-802 si associa ad una riduzione dei livelli di mRNA e di proteina di GSK-3 β , sia nei soggetti con SD che nei topi Ts65Dn. Inoltre, gli esperimenti in vitro supportano il ruolo del miR-802 nella regolazione di GSK-3 β . Questi risultati suggeriscono che aumentati livelli di espressione del miR-802 sono evidenti nel cervello di soggetti con SD e promuovono una riduzione dell'espressione di GSK-3 β , nota per il suo ruolo nel segnale dell'insulina e nella regolazione della plasticità sinaptica.

Dipartimento di Scienze biochimiche "Alessandro Rossi Fanelli"

ANTONELLA TRAMUTOLA: antonella.tramutola@uniroma1.it

Role of miR-802 in brain insulin signaling and its impact on Down syndrome

Antonella Tramutola, Eugenio Barone, Fabio Di Domenico, Marzia Perluigi

Abstract

Introduction. Down syndrome (DS) individuals are characterized by a variety of pathological phenotypes that manifest with wide variability in the different tissues. At the level of the central nervous system, the accelerated aging phenotype is associated with the risk to develop Alzheimer-like dementia. A central aspect of neurodegeneration is the close association between metabolic disorders and cognitive decline. Multiple studies have suggested a link between metabolic disorder and microRNAs (miR), small non-coding RNAs acting as post-transcriptional regulators of a plethora of genes. Among triplicated miRNAs on chromosome 21, we focus on miR-802 because recent studies demonstrated its association with development on insulin resistance in obesity and diabetes. Considering these findings and based on the “gene dosage hypothesis” of DS, the goal of the study is to decipher how miR-802 may contribute to aberrant insulin signaling (IS) and, in parallel to the risk to develop dementia early in life in DS.

Methods. The miR-802 expression, protein levels and activation state of main components of the IS were evaluated (i) in the brain of autaptic cases from DS, DSAD and age-matched controls and (ii) in the brain of euploid and Ts65Dn mice (a model of DS). Further, using bioinformatic tools we identified miR-802 predicted target genes that are involved in the IS (PTEN and GSK-3 β).

Results and Conclusions. The IS alterations worsen in the transition from DS to DS/AD and similar findings were collected in Ts65Dn mice where IS dysregulation persists with aging where neurodegeneration becomes significant. Intriguingly, these latter changes were driven by the over-expression of miR-802, which negatively regulates PTEN and GSK-3 β mRNA in the brain. In this picture, the identification of specific targets modulated by miR-802 and involved in IS pathway, will provide molecular basis to develop novel therapeutic strategies to prevent/delay the onset of brain insulin resistance in DS.

Department: "Alessandro Rossi Fanelli" Biochemical Sciences

ANTONELLA TRAMUTOLA: antonella.tramutola@uniroma1.it

Come contrastare la neuroinfiammazione alla base di molte malattie neurodegenerative

Rita Businaro, Federica Armeli, Beatrice Mengoni, Andrea Missimei, Matteo Rizzi, Ilenia Ottocento

Abstract

Molte evidenze sperimentali individuano nella neuroinfiammazione il principale meccanismo eziopatogenetico alla base dello sviluppo e della progressione di diverse malattie neurodegenerative, tra cui il morbo di Alzheimer (AD) e il morbo di Parkinson (PD). La neuroinfiammazione dipende principalmente dall'attivazione delle cellule gliali del sistema nervoso centrale. La microglia svolge le funzioni che a livello sistemico appartengono ai monociti-macrofagi, cellule sentinella dell'immunità innata, e costituisce la prima linea di difesa nel sistema nervoso centrale. Le cellule microgliali, quando attivate, rilasciano mediatori pro-infiammatori mentre, una volta eliminata la noxa patogena, rilasciano mediatori anti-infiammatori in grado di spegnere la risposta infiammatoria. Il danno acuto inizialmente attiva la microglia polarizzandola verso un fenotipo M1, con produzione di citochine pro-infiammatorie come IL-1 β e TNF- α , mentre, quando il danno viene circoscritto, si verifica la polarizzazione della microglia verso un fenotipo M2 antinfiammatorio, con rilascio di citochine antinfiammatorie come IL-4, IL-10 e TGF- β e attivazione dei meccanismi di riparo. Al contrario, l'infiammazione cronica induce l'iperattivazione della microglia, creando un microambiente infiammatorio che promuove la morte neuronale. La nostra ricerca è focalizzata sui fattori che promuovono lo switch funzionale della microglia verso un fenotipo antinfiammatorio M2. Il sistema endocannabinoide (ECBS) è una rete pleiotropica di mediatori pro-omeostatici endogeni che dirigono e controllano l'omeostasi fisiologica e i processi cognitivi. L'endocannabinoide più conosciuto è l'anandamide, idrolizzato dall'ammide idrolasi degli acidi grassi. La segnalazione ECBS è mediata dai recettori CB1 e CB2. Il legame con CB2, localizzato principalmente sulla microglia, promuove una risposta antinfiammatoria. La deregolamentazione dell'ECBS nell'AD è associata alla formazione di placche amiloidi. È stato dimostrato che la formazione di aggregati amiloidi è correlata alla disfunzione dell'autofagia, un processo pro-omeostatico che controlla la degradazione e il riciclo delle proteine mal ripiegate e degli organelli malfunzionanti. La compromissione dell'autofagia influisce sulla risposta immunitaria innata, amplificando l'infiammazione. Lo scopo del nostro studio è valutare la capacità di aumentati livelli di ECB di indurre i) una risposta antinfiammatoria polarizzando le cellule della microglia verso un fenotipo M2; ii) l'autofagia per ridurre le placche amiloidi. La nostra ricerca si avvale di linee cellulari umane e murine di macrofagi e microglia, nonché di macrofagi isolati da buffy coats ottenuti da volontari sani. L'espressione dell'mRNA e delle proteine dei markers M1 e M2, è stata analizzata mediante RT-PCR e immunofluorescenza in cellule pretrattate con URB597, un inibitore di FAAH, il principale enzima che catabolizza l'anandamide, e incubate con LPS o peptide A β . Cervelli di topi Tg2576 trattati con URB597 sono stati analizzati mediante immunostochimica e western blot per valutare l'espressione dei fattori coinvolti nell'autofagia. Poiché abbiamo precedentemente descritto l'attività anti-infiammatoria, simil-endocannabinoide di diversi alimenti, ci proponiamo di identificare le molecole bioattive, dotate di proprietà antinfiammatorie e antiossidanti, in estratti green e prodotti di scarto da filiere agricole sostenibili. Le cellule microgliali, pretrattate con estratti green, sono state incubate con LPS o peptide A β e la loro polarizzazione è stata valutata mediante l'espressione di citochine e di marcatori M1 e M2 mediante real-time PCR, ELISA, immunofluorescenza, western blot. Le molecole attive sono state identificate mediante analisi metabolomica.

Dipartimento di Scienze biotecnologiche medico-chirurgiche

Federica Armeli: federica.armeli@uniroma1.it

Counteracting neuroinflammation underlying neurodegenerative diseases

Rita Businaro, Federica Armeli, Beatrice Mengoni, Andrea Missimei, Matteo Rizzi, Ilenia Ottocento

Abstract

Much research results suggest that the main mechanism underlying several chronic neurodegenerative diseases, including Alzheimer's Disease (AD) and Parkinson Disease (PD), is neuroinflammation. Evidence suggests that neuroinflammation takes place mainly following activation of CNS (central nervous system) glial cells. Microglia performs the functions that at a systemic level belong to monocyte-macrophages, the sentinel cells of the innate immunity. These cells are characterized by the release of pro-inflammatory mediators at the beginning of their recruitment and then by the ability to switch off the inflammatory response, after eradicating the cause of the injury. Microglial activity is the first line of defense within the CNS, through cytokine-mediated processes. Acute CNS injury initially activates microglia by polarization towards the M1 phenotype, with production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α , while, when the injury resolves, microglia polarizes toward an anti-inflammatory M2 phenotype, with release of anti-inflammatory cytokines such as IL-4, IL-10 and TGF- β . In contrast, chronic inflammation induces hyperactivation of microglia, leading to an inflammatory milieu that promotes neuronal death. Our research is focused on factors promoting a functional switch of microglia towards a M2 anti-inflammatory phenotype. Endocannabinoid system (ECBS) is a pleiotropic network of endogenous pro-homeostatic mediators that master and control cognitive and physiological processes. The most well-known endocannabinoid is anandamide, hydrolyzed by fatty acid amide hydrolase. The ECBS signaling is mediated by CB1 and CB2 receptors. The binding to CB2, localized mainly on microglia, promotes an anti-inflammatory response. Deregulation of ECBS in AD is associated with the formation of amyloid plaques. It has been shown that the formation of amyloid aggregates is related to the dysfunction of autophagy, a pro-homeostatic process that controls the degradation and recycling of misfolded proteins and malfunctioning organelles. Impairment of autophagy affects innate immune response, amplifying inflammation. The aim of our study is to assess the ability of increased ECBS levels to induce i) an anti-inflammatory response by polarizing microglia cells towards an M2 phenotype; ii) an autophagic flux in order to reduce amyloid plaques. Our research takes advantage of human and murine established macrophage and microglia cell lines as well as of macrophages from healthy volunteers buffy coats. mRNA and protein expression of M1 and M2 markers, were analyzed by RT-PCR and immunofluorescence in cells pretreated with URB597, an inhibitor of FAAH, the main enzyme that catabolizes anandamide, and incubated with LPS or A β peptide. Brains of URB597-treated Tg2576 mice were analyzed by immunohistochemistry and by western blot to evaluate the expression of factors involved in autophagy. Since we have already shown the endocannabinoid-like activity of several foods, we aim at evaluating the anti-inflammatory and antioxidant properties of bioactive molecules obtained from green extracts and waste products of sustainable agricultural supply chains. Microglial cells, pre-treated with green extracts, were incubated with LPS or A β peptide and their polarization was evaluated by cytokines and M1 and M2 markers expression by real-time PCR, ELISA, immunofluorescence, western blots. The active molecules have been identifying by metabolomics.

Department: Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies

Federica Armeli: federica.armeli@uniroma1.it

In pazienti con adenocarcinoma polmonare le cellule stromali derivate da tessuto adiposo e da tessuto polmonare in sono in grado di produrre un microambiente simile

Elena De Falco, Antonella Bordin, Xhulio Dhorì, Vittorio Picchio, Claudia Cozzolino, Elisabetta De Marinis, Erica Floris, Noemi Maria Giorgiano, Paolo Rosa, Antonella Calogero

Abstract

Il cancro altera sia il tessuto locale che quello distante influenzando il microambiente. A questo proposito, l'interazione con la frazione stromale è considerata critica in quanto quest'ultima può favorire o ostacolare la progressione della malattia. Di conseguenza, la modalità con cui il tumore può alterare nicchie distanti delle cellule stromali non è ancora chiara, soprattutto nelle fasi iniziali. In questo breve resoconto tentiamo di comprendere meglio la biologia di cross-talk. Nel nostro "ambiente sperimentale stromale autologo", abbiamo scoperto che le cellule staminali mesenchimali derivate dal tessuto adiposo a distanza (AMSC mediastinico) ottenute da pazienti con adenocarcinoma polmonare sostengono la proliferazione e la capacità clonogenica dell'A549 e delle cellule di adenocarcinoma polmonare primario umano in modo simile alla controparte polmonare stromale autologa (LMSC). Questo effetto non si osserva nelle malattie polmonari benigne come l'amartoccondroma. Il secretoma generato dall'AMSC a distanza ha rivelato una sovrapposizione con il corrispondente microambiente maligno delle LMSC in autologo. Tra gli 80 fattori solubili analizzati con l'array, un piccolo pool di 5 molecole, tra cui IL1-beta, IL-3, MCP-1, TNF-alfa ed EGF, sono, era comunemente up-regolate in AMSC e LMSC del compartimento maligno rispetto al microambiente benigno. L'analisi bioinformatica ha rivelato che queste citochine erano strettamente e funzionalmente interconnesse alla fibrosi polmonare e alla proinfiammazione e che miR-126, 101, 486 e let-7-g erano i loro bersagli principali. Di conseguenza, abbiamo scoperto che nei tessuti del carcinoma polmonare e nei campioni di sangue dello stesso gruppo di pazienti impiegati, miR-126 e miR-486 mostravano i livelli di espressione più elevati rispettivamente nel tessuto e nel sangue. Quando il miR-126-3p è stato silenziato nelle A549 trattate con mezzi condizionati derivati da AMSC da pazienti con adenocarcinoma polmonare, la proliferazione cellulare è diminuita rispetto ai mezzi di controllo.

Dipartimento di Scienze biotecnologiche medico-chirurgiche

Antonella Bordin: antonella.bordin@uniroma1.it

Remote adipose tissue-derived stromal cells of patients with lung adenocarcinoma generate a similar malignant microenvironment of the lung stromal counterpart

Elena De Falco, Antonella Bordin, Xhulio Dhorì, Vittorio Picchio, Claudia Cozzolino, Elisabetta De Marinis, Erica Floris, Noemi Maria Giorgiano, Paolo Rosa, Antonella Calogero

Abstract

Cancer alters both local and distant tissue by influencing the microenvironment. In this regard, the interplay with the stromal fraction is considered critical as this latter can either foster or hamper the progression of the disease. Accordingly, the modality by which tumor may alter distant niches of stromal cells is still unclear, especially at early stages. In this short report we attempt to better understand the biology of this cross talk. In our “autologous stromal experimental setting”, we found that remote adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (mediastinal AMSC) obtained from patients with lung adenocarcinoma sustain proliferation and clonogenic ability of A549 and human primary lung adenocarcinoma cells similarly to the autologous stromal lung counterpart (LMSC). This effect is not observed in lung benign diseases as the hamartochondroma. The secretome generated by remote AMSC revealed overlapping to the corresponding malignant microenvironment of the autologous local LMSC. Among the plethora of 80 soluble factors analysed by arrays, a small pool of 5 upregulated molecules including IL1-beta, IL-3, MCP-1, TNF-alfa and EGF, was commonly shared by both malignant-like autologous A- and LMSC derived microenvironments vs those benign. The bioinformatic analysis both revealed that these proteins were strictly and functionally interconnected to the lung fibrosis and proinflammation and that miR-126, 101, 486 and let-7-g were their main targets. Accordingly, we found that in lung cancer tissues and blood samples from the same set of patients here employed, miR-126 and miR-486 displayed the highest expression levels in tissue and blood, respectively. When the miR-126-3p was silenced in A549 treated with AMSC-derived conditioned media from patients with lung adenocarcinoma, cell proliferation decreased compared to control media.

Department: Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies

Antonella Bordin: antonella.bordin@uniroma1.it

L'attività di legame del miR-223 al promotore del gene Flotillina-1 ne induce l'espressione e la funzione nella regolazione del differenziamento mieloide

De Marinis Elisabetta, Gentile Martina, Quattrocchi Alberto, Zaza Alessandra, Nervi Clara

Abstract

I programmi di sviluppo di cellule staminali somatiche e il destino maturativo/differenziativo delle cellule staminali ematopoietiche, sono profondamente influenzati da segnali epigenetici e dai microRNA (miRNA), la cui alterazione funzionale può causare trasformazione neoplastica. I miRNA mediano principalmente il silenziamento post-trascrizionale degli mRNA bersaglio. Tuttavia, i miRNA possono legare sequenze di DNA a loro complementari su siti genomici specifici e partecipare alla regolazione della struttura cromatinica. In questo contesto, abbiamo precedentemente dimostrato che il miR-223 induce la granulomonocitopoiesi agendo sia a livello nucleare che citosolico. L'attività nucleare dei miRNA può rappresentare un nuovo paradigma per la funzione degli RNA non codificanti nella regolazione della proliferazione, scelta di lineage e maturazione/differenziamento delle cellule staminali somatiche.

Utilizzando cellule mieloidi indotte al differenziamento granulocitario dal trattamento con acido retinoico (RA), abbiamo determinato a livello dell'intero genoma, le sequenze genomiche legate dal miR-223 nucleare e la presenza, in questi siti, di modifiche istoniche legate all'attivazione (H3K4me3) e/o repressione (H3K27me3) della trascrizione. Tra le sequenze legate dal miR-223, abbiamo selezionato il promotore del gene Flotillina-1 (FLOT1), in cui è presente la modifica istonica attivatoria H3K4me3. FLOT1 codifica per una proteina associata alle "zattere lipidiche", ma il suo ruolo nell'ematopoiesi normale e neoplastica è per lo più sconosciuto.

In progenitori ematopoietici isolati da sangue periferico e da cordone ombelicale di donatori sani, indotti al differenziamento granulomonocitario abbiamo riscontrato che i livelli di espressione di FLOT1 mRNA e proteina sono altamente indotti. L'espressione di FLOT1 risulta significativamente alterata in campioni di sangue di pazienti con leucemia mieloide acuta (AML).

La sovrespressione di FLOT1 in progenitori mieloidi aumenta i livelli di CSF1R e il suo reclutamento nelle "zattere lipidiche" dopo la stimolazione con il fattore di crescita; il silenziamento di FLOT1 riduce l'espressione del CD11b e CD14, marcatori di differenziamento granulomonocitario, nelle cellule trattate con RA.

Questi dati indicano il miR-223 quale mediatore chiave di pathways che regolano la trascrizione della cromatina durante la mielopoiesi e identificano il promotore del gene FLOT1 come un nuovo bersaglio della sua attività nucleare. I livelli e la funzione di FLOT1 risultano correlati alla mielopoiesi e appaiono de-regolati nelle AML, aprendo così a nuove conoscenze sui meccanismi molecolari di leucemogenesi e a nuove prospettive terapeutiche.

Dipartimento di Scienze biotecnologiche medico-chirurgiche

Elisabetta De Marinis: elisabetta.demarinis@uniroma1.it

The gene promoter binding activity of miR-223 induces Flotillin-1 expression and function to regulate myeloid differentiation

De Marinis Elisabetta, Gentile Martina, Quattrocchi Alberto, Zaza Alessandra, Nervi Clara

Abstract

Developmental cell programs, including hematopoietic stem cells lineage-specification and fate, are deeply regulated by epigenetic signals and microRNAs (miRNAs). Alteration of their function can induce neoplastic transformation. miRNAs mainly mediate the post-transcriptional gene silencing of target mRNAs. However, miRNAs bind also complementary DNA sequences at specific gene sites and participate in the epigenetic regulation of chromatin structure. In this context, our group previously demonstrated that miR-223 acts at both nuclear and cytosolic level to regulate granulocytic differentiation. The nuclear activity of miRNAs represents a new paradigm for non-coding RNA function in somatic stem cell proliferation, cell lineage specification and differentiation.

Our research group determined at the whole genome level in myeloid cells undergoing retinoic acid (RA)-induced granulocytic differentiation, the genomic sequences bound by nuclear miR-223 and concurrently characterized by activating (H3K4me3) and/or repressing (H3K27me3) histone marks. Among the complementary sequences bound by miR-223, we selected Flotillin-1 (FLOT1) gene promoter, accompanied by a substantial increase in the positive H3K4me3 mark and paralleled by increased expression. FLOT1 encodes a lipid-rafts associated protein, whose role in normal and neoplastic hematopoiesis is mostly unknown.

We found FLOT1 mRNA and protein levels highly induced in hematopoietic progenitors undergoing granulo-monocytic differentiation, isolated from of healthy donors' peripheral blood and cord blood. FLOT1 expression is significantly altered in blood samples from acute myeloid leukemia patients.

Overexpression of FLOT1 in myeloid progenitors enhances CSF1R levels and its recruitment to functional lipid rafts after growth factor stimulation, whereas FLOT1 silencing reduces the expression of CD11b and CD14 in RA-treated cells.

These data suggest miR-223 as a regulator of active chromatin-based pathways and identify FLOT1 gene promoter as a novel target of its nuclear activity. MiR-223 and FLOT1 levels and functions are related to myelopoiesis and appear de-regulated in AMLs, thus opening novel insights into molecular mechanisms leading to leukemia and for the design of intervention strategies.

Department: Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies

Elisabetta De Marinis: elisabetta.demarinis@uniroma1.it

L'attivazione dell'autofagia in cellule stromali cardiache preserva un fenotipo cardioprotettivo in condizioni di stress metabolico

Vittorio Picchio, Antonella Bordin, Elena Cavarretta, Claudia Cozzolino, Erica Floris, Leonardo Schirone, Sonia Schiavon, Luca D'Ambrosio, Antonella Calogero, Giuseppe Biondi-Zoccai, Elena De Falco, Roberto Carnevale, Giacomo Frati, Sebastiano, Sciarretta, Isotta Chimenti

Introduzione: Le cellule stromali cardiache contribuiscono all'omeostasi e alla riparazione tissutale. Le loro proprietà cardioprotettive e angiogeniche possono essere ridotte in condizioni patologiche. Le condizioni dismetaboliche sono importanti fattori patogenetici per le malattie cardiovascolari, inclusa la fibrosi cardiaca. Condizioni come il diabete o la sindrome metabolica, sono caratterizzate, tra l'altro, da una ridotta capacità di attivare l'autofagia.

Obiettivo: Studiare se l'attivazione dell'autofagia possa opporsi all'attivazione pro-fibrotica delle cellule stromali mesenchimali cardiache residenti (CMSC), come potenziale strategia per ridurre la progressione della fibrosi cardiaca in condizioni di insulto metabolico.

Metodi: Le CMSC residenti sono stati isolati da tessuto atriale murino o umano. Le cellule murine sono state sottoposte a iperglicemia, e caratterizzate per il loro fenotipo sotto modulazione farmacologica (trealosio) o genetica (over-espressione di ATG7) dell'autofagia. Le cellule umane sono state isolate da 38 pazienti con cardiomiopia ischemica, stratificati per diagnosi di diabete di tipo 2 (DM2) o sindrome metabolica (METS), o nessuna delle due.

Risultati: Le CMSC murine in iperglicemia mostrano flusso autofagico ridotto e una significativa riduzione della frazione di cellule non fibrotiche. L'induzione dell'autofagia mediante over-espressione di ATG7 ha mantenuto un profilo paracrino cardioprotettivo, anti-infiammatorio e pro-angiogenico delle CMSC esposte all' iperglicemia, e ha preservato in modo significativo la vitalità delle CMSC, che sono state successivamente esposte a deprivazione di nutrienti, recuperando la resistenza allo stress compromessa dall'iperglicemia.

Le CMSC umane derivate da pazienti METS o DM2 hanno mostrato un profilo paracrino alterato rispetto alle cellule di controllo, con una significativa riduzione nel rilascio di VEGF e di Endoglin.

Le DM2-CMSC hanno fornito un ridotto supporto alle cellule endoteliali in un test di angiogenesi, e mostrato ridotta autofagia dopo stress, e aumentato stress ossidativo. Il trattamento con un cocktail contenente trealosio e inibitori delle NOX4/5 ha aumentato il rilascio di VEGF ed Endoglin da parte di cellule CMSC derivate da sia da pazienti METS che DM2, recuperando anche il supporto angiogenico alle cellule endoteliali da parte delle DM2-CMSC.

Conclusioni: L'autofagia può essere specificamente attivata nelle cellule stromali cardiache, e la sua stimolazione preserva un fenotipo benefico delle CMSC in iperglicemia. Inoltre, le CMSC umane derivate da pazienti Mets e DM2 presentano un'attivazione autofagica compromessa, con caratteristiche paracrine e fenotipiche pro-fibrotiche. Il potenziamento dell'autofagia in queste cellule sembra ripristinare in parte un fenotipo benefico, soprattutto in cellule derivate da pazienti DM2, suggerendo una possibile strategia terapeutica contro la fibrosi cardiaca nei pazienti dismetabolici.

Dipartimento di Scienze biotecnologiche medico-chirurgiche

Vittorio Picchio: vittorio.picchio@uniroma1.it

Autophagy enhancement can preserve a cardioprotective phenotype in cardiac stromal cells under metabolic stress

Vittorio Picchio, Antonella Bordin, Elena Cavarretta, Claudia Cozzolino, Erica Floris, Leonardo Schirone, Sonia Schiavon, Luca D'Ambrosio, Antonella Calogero, Giuseppe Biondi-Zoccai, Elena De Falco, Roberto Carnevale, Giacomo Frati, Sebastiano, Sciarretta, Isotta Chimenti

Introduction: Cardiac stromal cells embrace multiple phenotypes and are a contributory factor in tissue homeostasis, repair, and disease. Their beneficial homeostatic properties (e.g. cardioprotective, angiogenic) can be decreased by microenvironment cues. Dysmetabolic conditions are strong pathogenic contributors to cardiovascular diseases, including cardiac fibrosis. These conditions, such as diabetes or metabolic syndrome, are characterized, among others, by a reduced capacity to activate autophagy in multiple cell types.

Objective: We aimed to establish whether autophagy modulation could oppose pro-fibrotic activation and specification of resident cardiac mesenchymal stromal cells (CMSCs), as a potential strategy to interfere with mechanisms of cardiac fibrosis progression under metabolic stress and dysmetabolic conditions.

Methods: Resident CMSCs were isolated from murine or human atrial tissue. Murine cells were subjected to hyperglycemia, and then characterized for their phenotype under pharmacological (trehalose) or genetic (ATG7 over-expression) modulation of autophagy. Human cells were derived from 38 patients with ischemic cardiomyopathy, stratified based on the diagnosis of type 2 diabetes (DM2) or metabolic syndrome (METS), or none as control; they were characterized at baseline, and subjected to pharmacological (trehalose) activation of autophagy to assess phenotype retrieval.

Results: Murine CMSCs under hyperglycemia display reduced autophagic flux, and significant reduction in the fraction of non-activated cells. Autophagy induction by ATG7-overexpression maintained a cardioprotective, anti-inflammatory, and pro-angiogenic paracrine profile of CMSCs exposed to hyperglycemia for 1 week. Furthermore, autophagy induction by ATG7-overexpression during hyperglycemia can significantly preserve cell viability in CMSCs, which were subsequently exposed to nutrient deprivation, reducing hyperglycemia-induced impairment of cell resistance to stress.

Human CMSCs derived from METS or DM2 patients displayed an impaired paracrine profile distinct from control cells, with a significant reduction in vascular endothelial growth factor (VEGF) and Endoglin release. DM2-CMSCs showed reduced support to endothelial cells in an angiogenesis assay, and autophagy impairment after nutrient deprivation (reduced ATG7 and LC3-II proteins). Treatment with a trehalose-containing cocktail increased VEGF and Endoglin release by both METS- and DM2-CMSCs, also recovering the angiogenic support to endothelial cells by DM2-CMSCs.

Conclusions: Our results show for the first time that autophagy can be specifically activated in CMSCs, and its stimulation preserves viability and a beneficial phenotype of CMSCs under hyperglycemia. Moreover, human CMSCs derived from Mets and DM2 patients present impaired autophagy activation, with altered paracrine and phenotypic features. Boosting of autophagy in these cells appears to partly restore a beneficial phenotype, mostly in DM2-CMSCs, suggesting a possible therapeutic strategy against cardiac fibrosis in dysmetabolic patients.

Department: Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies

Vittorio Picchio: vittorio.picchio@uniroma1.it

La disbiosi intestinale: una nuova chiave di lettura per l'alterata omeostasi farmacologica tiroidea

Camilla Virili, Ilaria Stramazzo, Silvia Capriello, Roberto Carnevale, Marco Centanni

Abstract

Malgrado quella con levotiroxina sodica sia una delle terapie maggiormente utilizzate al mondo, il mancato raggiungimento del target terapeutico coinvolge circa il 50% dei pazienti trattati. Ciò può derivare da una inadeguata compliance del paziente, dall'interazione con altri farmaci ma anche dall'interferenza di possibili patologie gastrointestinali concomitanti. La calibrazione terapeutica individualizzata vede quali eventi centrali la corretta stima del fabbisogno ormonale, basata sulle caratteristiche antropometriche del paziente, ed il corretto assorbimento della levotiroxina assunta per os, che avviene in percentuali variabili nel duodeno, nel digiuno e nell'ileo. Le patologie intestinali possono dunque condizionare la dinamica farmacologica della tiroxina orale e l'aumento del fabbisogno ormonale. Malgrado un appropriato iter diagnostico, tuttavia, in circa il 20% dei pazienti che presentano un aumentato fabbisogno di T4, non si riesce ad approdare ad una chiara diagnosi eziopatogenetica. Recentemente, è stata posta l'attenzione sulla pleiotropicità degli effetti della disbiosi e dell'aumentata permeabilità intestinale sul funzionamento di organi e sistemi anche distanti dall'apparato gastrointestinale. Le più comuni patologie tiroidee sono caratterizzate da una condizione di alterata permeabilità intestinale ("leaky gut") ed i batteri intestinali sono coinvolti nel metabolismo e catabolismo di composti, tra cui gli ormoni tiroidei. E' stato infatti dimostrato che alcuni ceppi batterici possiedono attività enzimatiche di tipo glucuronidasico e solfatasico che potrebbero modulare la quantità di ormone tiroideo riassorbito nell'ileo attraverso la ricircolazione enteroepatica dell'ormone.

Scopo del nostro lavoro è quindi la comparazione della composizione batterica fecale e la valutazione della permeabilità intestinale in pazienti in trattamento levotiroxinico con fabbisogno ormonale normale o significativamente superiore alla dose attesa sulla base delle caratteristiche antropometriche. Saranno selezionati quindi 50 pazienti che presentino un fabbisogno di tiroxina calcolato sulla base del peso e dell'età pari a 1.3 ± 0.15 mcg/Kg peso/die e 50 pazienti con dosaggio giornaliero superiore al 25% rispetto al fabbisogno teorico calcolato sulla base dei rispettivi dati antropometrici. In seguito alla raccolta del campione fecale, all'estrazione del DNA batterico e al sequenziamento tramite piattaforma Illumina MiSeq, verrà effettuata un'analisi bioinformatica e biostatistica al fine di individuare eventuali differenze negli indici di α - e β -diversità (ricchezza e uniformità delle specie, distanza filogenetica) nei gruppi di pazienti in esame.

Gli stessi pazienti saranno anche sottoposti a valutazione di LPS e zonulina sierici, metaboliti che consentono di stimare indirettamente la permeabilità della barriera intestinale. L'identificazione di specifici strains batterici in grado di variare il riassorbimento enteroepatico dell'ormone tiroideo potrebbero contribuire significativamente alla ottimizzazione del trattamento tiroxinico, grazie anche alle attuali possibilità di modulazione dell'ambiente intestinale tramite la somministrazione di prebiotici e probiotici.

Dipartimento di Scienze biotecnologiche medico-chirurgiche

Camilla Virili: camilla.virili@uniroma1.it

Intestinal dysbiosis: a novel piece in the puzzle of the increased levothyroxine requirement

Camilla Virili, Ilaria Stramazzo, Silvia Capriello, Roberto Carnevale, Marco Centanni

Abstract

Although levothyroxine sodium is one of the more prescribed drug worldwide, failure to achieve the therapeutic target involves about 50% of the treated patients. This may ensue from an inadequate patient adherence, from an interaction with other drugs but also from the interference of concomitant gastrointestinal disorders. The effects of an inappropriate thyroxine treatment, often initially hidden, may result in non-negligible sequelae. The individualized therapeutic calibration requires the correct estimate of the hormonal need, based on the anthropometric characteristics of the patient, and the correct absorption of the oral levothyroxine, which occurs in variable percentages in the duodenum, jejunum and ileum. Intestinal disorders (celiac disease, lactose intolerance, IBD, etc.) can therefore affect the bioavailability of oral levothyroxine and the increased hormone requirements has recently been demonstrated in these diseases.

Despite an appropriate diagnostic workup, however, in about 20% of patients with an increased need for T₄, it is not possible to reach a definite etiopathogenetic diagnosis. Recently, attention has been focused on the pleiotropic effects of dysbiosis and increased intestinal permeability as well as on the functioning of organs and systems far from the gastrointestinal tract. For instance, autoimmune thyroid disorders are characterized by a "leaky gut"; and intestinal flora is involved in the metabolism and catabolism of different compounds, including thyroid hormones: in fact, it has been demonstrated that some bacterial strains possess enzymatic glucuronidase and sulfatase activities which could impact on the amount of thyroid hormone reabsorbed in the ileum through the enterohepatic recirculation.

The aim of our work is to compare faecal bacterial composition and intestinal permeability indexes in hypothyroid patients treated with levothyroxine, showing normal or increased hormone requirement. Therefore, we will enroll 50 patients with a thyroxine requirement of 1.3 ± 0.15 mcg/Kg weight/day and 50 patients with a daily dose increased at least by 25% as compared to the theoretical requirement without explanation. Following the collection of faecal samples, the extraction of bacterial DNA and the sequencing by the Illumina MiSeq platform, a bioinformatics and biostatistical analysis will be performed in order to identify, if any, differences in the α - and β -diversity indexes (richness and uniformity of species, phylogenetic distance) in the study groups. In the same patients, we will evaluate serum levels of both LPS and zonulin, which are an indirect measure of the intestinal barrier permeability. The identification of specific bacterial strains able to affect the faecal elimination and/or the enterohepatic reabsorption of the thyroid hormone could significantly improve the optimization of thyroxine treatment, taking also into account the current opportunities to modulate the resident flora and intestinal permeability through the prescription of prebiotics and probiotics.

Department: Medico-Surgical Sciences and Biotechnologies

Camilla Virili: camilla.virili@uniroma1.it

La Facoltà di Farmacia e Medicina presenta le attività di ricerca scientifica dei Dipartimenti di afferenza.

Highlighting the Research Activity of the Sapienza Faculty of Pharmacy and Medicine.

Aula Magna del Rettorato

22 e 23 febbraio 2023

Per ulteriori informazioni: [La Facoltà di Farmacia e Medicina presenta le attività di ricerca scientifica dei Dipartimenti di afferenza. Highlighting the Research Activity of the Sapienza Faculty of Pharmacy and Medicine.](#)

Iscrizione: [modulo di iscrizione](#)

Facoltà di Farmacia e Medicina

<https://web.uniroma1.it/farmaciamedicina>

Dipartimento Chimica e tecnologie del
farmaco

https://web.uniroma1.it/dip_ctf

Dipartimento Chirurgia Generale e
Specialistica

<https://web.uniroma1.it/dcgs>

Dipartimento Fisiologia e Farmacologia
"Vittorio Erspamer"

<https://web.uniroma1.it/dff>

Dipartimento Medicina molecolare

<https://web.uniroma1.it/dmm>

Dipartimento Sanità pubblica e malattie
infettive

<https://dspmi.uniroma1.it>

Dipartimento Scienze anatomiche,
istologiche, medico-legali e
dell'apparato locomotore

<https://web.uniroma1.it/saimlal>

Dipartimento Scienze biochimiche
"Alessandro Rossi Fanelli"

<http://dsb.uniroma1.it>

Dipartimento Scienze biotecnologiche
medico-chirurgiche

<https://web.uniroma1.it/dsbmc>