

**IRCCS SAN RAFFAELE PISANA**

## **LINEA 1**

**Fattori preclinici determinanti l'efficacia della riabilitazione**

## AREA DI RICERCA PARKINSON E DISTURBI DEL MOVIMENTO

### ***Caratterizzazione del pattern del microbiota in pazienti con malattia di Parkinson (PD) naive, con differente fenotipo clinico e valutazione prospettica del microbiota dopo trattamento farmacologico***

La malattia di Parkinson (PD) è una malattia neurodegenerativa caratterizzata da sintomi motori e non motori. Dal punto di vista anatomopatologico la malattia è caratterizzata da depositi di Alpha-synucleina che sono stati identificati in pazienti PD a tutti i livelli dell'asse intestino-cervello, inclusi il sistema autonomo centrale ed il sistema nervoso enterico.

Le interazioni dell'asse intestino-cervello sono significativamente modulate dal microbiota, attraverso meccanismi neuroimmunoendocrini ed immunologici, ed attraverso una via neurale diretta. La disregolazione dell'asse intestino-cervello in PD potrebbe essere associata con disfunzioni gastro-intestinali che frequentemente precedono i sintomi motori, supportando l'ipotesi che il processo patologico si diffonda dall'intestino al cervello. Scheperjans et al. hanno infatti riportato alterazioni nella composizione del microbiota nel PD e la sua associazione con fenotipi clinici diversi (prevalentemente tremorigeni o acinetico-rigidi).

Un importante componente del microbiota è rappresentata dai batteri del piccolo intestino e recenti studi hanno mostrato una crescita eccessiva dei batteri del piccolo intestino (SIBO) nei pazienti parkinsoniani.

La disbiosi intestinale ed i SIBO potrebbero determinare un aumento della permeabilità intestinale, causando di conseguenza un'eccessiva stimolazione del sistema immunologico e dei meccanismi di infiammazione, portando alla formazione dei depositi di alfa-sinucleina.

L'alterazione quantitativa e qualitativa del microbiota potrebbe influenzare la progressione e la severità della malattia.

Nella malattia di Parkinson, ricerche recenti mostrano un'alterazione sia quantitativa che qualitativa nella composizione del microbiota intestinale. Uno studio di Scheperjans e collaboratori ha evidenziato un'associazione tra il fenotipo acinetico-rigido e l'abbondanza di Enterobacteriaceae.

Nella malattia di Parkinson potrebbe essere presente uno specifico pattern di microbiota intestinale, presente già nelle fasi prodromiche della malattia. Stabilire la tipologia di microbiota nel PD appena diagnosticato consentirebbe non solo la diagnosi preclinica, ma anche una tipizzazione fenotipica con importanti conseguenze dal punto di vista diagnostico e terapeutico. E' inoltre importante stabilire come si modifica il microbiota nel corso della malattia e la relazione tra terapie farmacologiche utilizzate, risposta alle terapie e sviluppo di eventuali complicanze.

Il progetto di ricerca prevede l'arruolamento di 40 pazienti PD naive (20 con fenotipo tremorigeno e 20 con fenotipo acinetico rigido) e l'analisi del microbiota verso controlli sani di pari età e sesso, al fine di confermare il pattern differente tra i due fenotipi clinici ed i controlli sani.

Successivamente si ripete l'analisi del microbiota negli stessi pazienti dopo introduzione della terapia farmacologica:

- a 12 mesi con IMAO-B+ dopamino agonisti
- a 24 mesi con IMAO-B + dopamino agonisti ed eventuale introduzione L-Dopa.

Tutti i pazienti vengono sottoposti inoltre a valutazione clinica specifica per malattia di Parkinson nelle tre visite previste (T0, 12 e 24 mesi).

Nel corso del primo anno a partire da una revisione della letteratura, si è ritenuto necessario avviare una prima attività di ricerca sul pattern del microbiota su pazienti parkinsoniani fluttuanti con e senza perdita di peso, al fine di caratterizzare le eventuali differenze tra pazienti Naive e pazienti fluttuanti.

In questa fase preliminare sono stati analizzati campioni di feci in 10 pazienti che hanno perso peso e 10 pazienti che non hanno perso peso (appaiati per età, sesso e durata di malattia) e 8 controlli sani (appaiati per età e sesso).

Lo studio ha messo in evidenza un differente pattern del microbiota tra controlli sani e pazienti affetti da Malattia di Parkinson, e tra gli stessi pazienti (con un incremento dei biomarkers pro infiammatori nei pazienti che non hanno perso peso). Questo studio preliminare è stato svolto in collaborazione con l'Unità di ricerca di Microbioma Umano dell'Ospedale Pediatrico Bambino. Presso i laboratori dell'IRCCS San Raffaele sono conservati (in frigoriferi a -80°) campioni di feci dei 20 pazienti affetti da Malattia di Parkinson e degli 8 controlli sani, per eventuali comparazioni e valutazioni qualitative e quantitative tra pazienti fluttuanti e Naive.

Dopo questa prima fase è iniziata la raccolta dei campioni di feci nei pazienti Naive; sono stati raccolti 9 campioni (5 femmine e 4 maschi): 7 con Parkinson tremorigeno e 2 con forma acinetico rigida.

Nel corso del 2019 si continueranno a raccogliere campioni dei pazienti Naive, al fine di arrivare al Target previsto di 40 pazienti. Sarà effettuata una analisi del microbiota negli stessi pazienti dopo introduzione della terapia farmacologica:

- a 12 mesi con IMAO-B+ dopamino agonisti

- a 24 mesi con IMAO-B + dopamino agonisti ed eventuale introduzione L-Dopa

Tutti i pazienti verranno sottoposti inoltre a valutazione clinica specifica per m. di Parkinson nelle tre visite previste (T0, 12 e 24 mesi).

Ci si attende di poter effettuare una tipizzazione pre-clinica del microbiota, di poter avere una conferma del pattern del microbiota correlato al fenotipo in fase precoce di malattia e di poter effettuare una analisi delle modificazioni del microbiota sia nelle varie fasi della malattia, sia in relazione alle terapie farmacologiche.

### ***Indagine retrospettiva sulle persone con amputazione di arto inferiore con protesizzazione presso le Officine Ortopediche ITOP di Palestrina***

L'amputazione di arto, soprattutto a carico dell'arto inferiore, costituisce ancora un grave problema sanitario, nonostante i progressi della medicina interna, ed in particolare della diabetologia.

L'incidenza di amputazione degli arti inferiori varia da 46,1 a 9600 per 100000 abitanti nei pazienti diabetici rispetto a 5,8 – 31 per 100000 abitanti nella popolazione generale. I dati epidemiologici sono dunque molto eterogenei, probabilmente condizionati da parametri come l'etnia, la condizione sociale, le caratteristiche e la gravità della patologia di base. Non esistono, inoltre, protocolli standardizzati di presa in carico riabilitativa del paziente amputato, soprattutto per quel che concerne il controllo del dolore del moncone e l'arto fantasma.

L'outcome riabilitativo dei pazienti con amputazione è molto variabile e non sono disponibili fattori predittivi che supportino il medico riabilitatore nella scelta del percorso da intraprendere. Si ritiene utile una valutazione osservazionale su un vasto numero di pazienti amputati di arto inferiore di provenienza regionale, al fine di stabilire se vi sono fattori che possano influenzare l'outcome riabilitativo.

Sono oggetto di indagine le correlazioni tra dati epidemiologici (età, sesso, diagnosi di base), livello dell'amputazione, presenza di dolore ed i risultati riabilitativi, come ad esempio lo scarso o assente utilizzo della protesi, la presenza o assenza di un cammino funzionale. La finalità è quella di stabilire se esiste una valutazione multi-parametrica di questo insieme di fattori che possa determinare il successo o meno del progetto riabilitativo di protesizzazione. Inoltre ci si propone di individuare sottogruppi di pazienti non idonei alla protesizzazione.

L'obiettivo primario è quello di verificare le possibili correlazioni tra gli indicatori socio-clinico-anagrafici e l'utilizzo della protesi con cammino domiciliare o extradomiciliare in comunità. L'obiettivo secondario consiste nel verificare la presenza di dolore e della sindrome dell'arto fantasma, verificando le eventuali correlazioni con gli altri dati in possesso; infine selezionare una popolazione di pazienti con arto fantasma disponibili ad eseguire un training riabilitativo in realtà virtuale, per verificare la fattibilità di un trattamento specifico innovativo (eventualmente in tele-riabilitazione).

Ci si attende di poter verificare l'esistenza di una valutazione multi-parametrica che possa predire il successo o meno del progetto riabilitativo di protesizzazione e che consenta di individuare sottogruppi di pazienti non idonei alla protesizzazione.

Si ritiene utile una valutazione osservazionale su un vasto numero di pazienti amputati di arto inferiore di provenienza regionale, al fine di stabilire se vi siano fattori che possano influenzare l'outcome riabilitativo.

Sono reclutati pazienti con amputazione di arto inferiore a livello di coscia o gamba, afferenti alle Officine Ortopediche ITOP; vengono invece esclusi i pazienti con amputazione di arto superiore e del piede.

Lo studio è di tipo osservazionale retrospettivo con l'integrazione dei dati raccolti tramite questionario proposto per via telefonica. I dati sono trattati da un database presente presso le Officine Ortopediche ITOP Palestrina (RM), che rispecchia le normative per la privacy ed include dati socio-demografici, diagnosi e livello di amputazione. Il questionario telefonico è composto da un set di domande che comprendono: il tipo di amputazione subita, la data dell'intervento, la causa che ha condotto all'amputazione, la presenza o meno dell'arto fantasma, la presenza o meno di dolore al moncone. Vengono inoltre somministrate telefonicamente la modified Rankin Scale e la Walking Handicap Scale.

Nel corso del 2018 è stata effettuata una revisione della letteratura esistente sugli indici di outcome riabilitativo funzionale nei pazienti amputati e dell'arto fantasma. Sono stati selezionati 360 pazienti amputati afferenti alle officine ortopediche Itop; tra questi 348 soddisfacevano i criteri di inclusione e sono stati sottoposti al questionario telefonico. Sono stati inoltre estratti i dati demografici, clinici e strumentali ed analizzati in ambiente MatLab ed Excel. È in corso l'analisi statistica per la discriminazione delle caratteristiche significative, che proseguirà nel 2019.

L'individuazione dei fattori predittivi di successo o meno del progetto riabilitativo di protesizzazione, che consentano di individuare sottogruppi di pazienti non idonei alla protesizzazione, permette di supportare il medico riabilitatore nella decisione di prescrivere o meno la protesi d'arto e stabilire il percorso riabilitativo più idoneo. Inoltre consente di evitare la prescrizione ed il confezionamento di protesi di arto che non verranno utilizzate, prevenendo un eccessivo carico funzionale e contenendo i costi per il Sistema Sanitario Nazionale.

### ***RES&REYBARTHEL - Indagine retrospettiva sui pazienti in regime di ricovero presso l'IRCCS San Raffaele-Pisana in fase sub-acuta.***

Le unità di riabilitazione post-acuzie (cod. 56) hanno lo scopo di trattare e riabilitare i pazienti nel periodo immediatamente successivo alla dimissione dalle strutture ospedaliere per acuti. Esse costituiscono i capisaldi dei percorsi riabilitativi. Il ricovero in ambiente riabilitativo post-acuzie, infatti, risulta fondamentale per il raggiungimento di un miglior recupero funzionale. L'ottimizzazione di questi percorsi rappresenta un obiettivo primario in tutte le strutture riabilitative. Uno dei parametri funzionali più importanti raccolti durante il ricovero nelle unità riabilitative è il Barthel Index (BI), che misura l'autonomia del paziente nelle attività di vita quotidiana di base. Il BI è quindi considerato una misura diretta delle condizioni funzionali del

paziente e costituisce un indice di idoneità valido per l'accesso alle unità riabilitative intensive. Accanto alla misura dell'autonomia, durante i ricoveri vengono raccolte moltissime informazioni circa il percorso riabilitativo, le comorbidità e le modalità di dimissione attraverso le Schede di Dimissione Ospedaliera (SDO), che presentano caratteristiche specifiche regionali. Il punteggio BI alla dimissione consente di sintetizzare l'esito dell'ospedalizzazione riabilitativa. Negli ultimi 10 anni sono stati sviluppati indici di impatto della riabilitazione sempre più complessi in risposta alla necessità di creare misure composte che controllino lo stato funzionale pre-morboso, pre-abililitazione ed il tasso di miglioramento funzionale. Il Rehabilitation Effectiveness (RES) è la percentuale di potenziale miglioramento funzionale effettivamente raggiunto. Il Rehabilitation Efficiency (REY) è il tasso di recupero funzionale ottenuto durante un lasso di tempo in riabilitazione (Shah et al, 1989).

Questo studio si propone di valutare in maniera retrospettiva i dati SDO di tutti i pazienti ammessi ai reparti di riabilitazione neuromotoria A,B e C IRCSS San Raffaele Pisana dal Gennaio 2006 al Dicembre 2017.

Lo studio intende verificare l'esistenza di correlazioni tra RES e REY con gli items disponibili nella SDO ed utilizzare tecniche di machine learning per l'individuazione di pattern di dati presenti nelle SDO, utilizzabili come dati predittivi in termini di efficienza ed efficacia.

Ci si attende di poter individuare nei dati presenti nelle Schede di Dimissione Ospedaliera correlazioni tra RES e REY del Barthel Index che permettano di predire l'andamento riabilitativo dei pazienti ed individuare dei fattori predittivi di successo o meno del progetto riabilitativo in pazienti in riabilitazione intensiva post-acuzie (codice 56).

Si ritiene utile una valutazione osservazionale su un vasto numero di pazienti afferenti alla riabilitazione intensiva (codice 56), al fine di stabilire se vi siano fattori in grado di influenzare l'outcome riabilitativo, ed applicare tecniche di machine learning.

Sono stati analizzati i dati demografici e clinici, nonché le scale disponibili nelle SDO. Le misure di outcome primarie durante la degenza riabilitativa sono RES e REY.

Vengono inclusi nello studio i pazienti affetti da emisindrome piramidale, malattia di Parkinson, patologie di interesse ortopedico, mentre vengono esclusi quei pazienti le cui SDO risultino non complete o non correttamente compilate.

L'attività del 2018 ha avuto come obiettivo la revisione della letteratura esistente sull'utilizzo di RES e REY. Sono state analizzate 4056 Schede di Dimissione, 3426 SDO soddisfacevano i criteri di inclusione. Sono quindi stati estratti i dati demografici, clinici e strumentali ed analizzati in ambiente MatLab ed Excel. È stata quindi eseguita l'analisi statistica per la discriminazione delle caratteristiche significative. È stato osservato che un punteggio basso al BI all'ingresso nelle unità di riabilitazione intensiva (cod. 56) era correlato ad una bassa efficacia in termini di potenziale miglioramento funzionale effettivamente raggiunto (RES), però correlato anche ad un alto tasso di recupero funzionale ottenuto durante il lasso di tempo in riabilitazione (REY). In altre parole un paziente con uno stato funzionale peggiore all'ingresso otteneva un recupero funzionale più rapido, ma una bassa percentuale di guadagno funzionale rispetto ad un paziente che all'ingresso presentava uno stato funzionale migliore. Inoltre la lunghezza del ricovero è stata associata ad una migliore efficacia e ad una peggiore efficienza, rispetto ai ricoveri brevi. È in corso l'interpretazione dei dati ottenuti alla luce di quelli presenti in letteratura.

### ***Studio osservazionale sulla complessità clinica in riabilitazione***

Le unità di riabilitazione post-acuzie (cod. 56) hanno lo scopo di trattare e riabilitare i pazienti nel periodo immediatamente successivo alla dimissione dalle strutture ospedaliere per acuti. All'interno delle riabilitazioni intensive vengono ricoverati un gruppo eterogeneo di pazienti sia dal

punto di vista della diagnosi di base (ad eziologia neurologica o ortopedica), sia dal punto di vista delle condizioni cliniche generali e del livello di autonomia.

Uno dei parametri funzionali più importanti raccolti durante il ricovero nelle unità riabilitative è il Barthel Index (BI), che misura l'autonomia del paziente nelle attività di vita quotidiana di base. Il BI è considerato una misura diretta delle condizioni funzionali del paziente e costituisce un indice di idoneità valido per l'accesso alle unità riabilitative intensive. I bisogni riabilitativi dei pazienti sono quindi estrapolati dallo stato di autonomia del paziente, attraverso il BI. La scala di Barthel, però, non consente di stabilire i reali bisogni riabilitativi, correlati alle comorbidità e allo stato clinico generale. Inoltre, venendo fornita per legge in ingresso, non riesce a discriminare i pazienti a rapida risoluzione di disautonomia da quelli con disautonomia persistente.

È stata quindi recentemente proposta una scala che permette di valutare la complessità clinico-riabilitativa: la Rehabilitation Complexity Scale – Extended (version 13th) (RCS-E) (Turner-Stokes et al 2012). L'RCS-E è stata tradotta e validata in italiano (Roda et al., 2017); essa valuta 5 domini: cura o rischio (ovvero il livello di assistenza necessaria al paziente per la cura personale e per mantenere un'adeguata sicurezza), bisogni infermieristici (necessità di essere accudito da un infermiere specializzato), bisogni di cure mediche (necessità della presenza di un medico), bisogni terapeutici (valuta il numero di discipline coinvolte nel progetto riabilitativo e l'intensità di trattamento), necessità di ausili. Attraverso questa scala è possibile valutare i reali bisogni riabilitativi del paziente in relazione alla complessità del quadro clinico, riabilitativo, cognitivo e funzionale. Rispetto alla Barthel Index la RCS-E è in grado di discriminare la severità e la complessità di un paziente rispetto ad un altro, pur tenendo conto del suo livello di autonomia.

In un recente lavoro di Hoffman et al. è stato osservato che nei pazienti con esiti di trauma l'RCS ed il BI erano in grado di correlare con la severità del trauma, ma solo RCS era in grado di discriminare il livello di necessità riabilitativa di questi pazienti. Inoltre lo score dell'RCS era correlato con la durata del ricovero riabilitativo e con le modalità di dimissione (Hoffman et al., 2013).

Questo studio si propone di valutare le necessità riabilitative correlate alla complessità, attraverso la somministrazione della scala Rehabilitation Complexity Scale – Extended (version 13th) (RCS-E). Gli score ottenuti sono messi in correlazione al sesso e all'età dei pazienti, al tipo di patologia oggetto della riabilitazione, al delta tra l'inizio della riabilitazione e l'evento acuto, allo stato funzionale e di autonomia registrato attraverso il Barthel Index ed al numero di comorbidità presenti. E' inoltre valutata la correlazione tra lo score RCS-E e la necessità di prolungare il ricovero riabilitativo oltre i termini stabiliti e la modalità di dimissione (a domicilio o presso altra struttura ospedaliera).

Lo studio intende:

- Verificare l'esistenza di correlazioni tra l'RCS-E in ogni singolo dominio della scala ed i dati epidemiologici e diagnostici;
- Stabilire fattori prognostici che permettano di prevedere le modalità di dimissione;
- Monitorare l'efficienza riabilitativa attraverso il confronto della complessità all'ingresso nella struttura riabilitativa, a 10 giorni ed in fase di dimissione.

Ci si attende di poter valutare, attraverso una scala, le correlazioni tra la complessità riabilitativa e l'outcome dei pazienti.

Vengono analizzati i dati demografici e clinici, nonché le scale disponibili nelle Schede di Dimissione Ospedaliera. Vengono somministrati la scala RCS-E ed il BI ai pazienti ammessi al reparto di riabilitazione neuromotoria B IRCSS San Raffaele – Pisana, con diagnosi di ictus ischemico ed emorragico, malattia di Parkinson, sclerosi multipla, postumi di intervento chirurgico ortopedico realizzato in elezione o post-traumatico, amputazione. La somministrazione delle scale

avviene all'ingresso del reparto di riabilitazione (T0), dopo  $10 \pm 2$  giorni dall'ingresso (T1) e alla dimissione (T2).

Nel corso del 2018 è stata effettuata la revisione della letteratura esistente sull'utilizzo della scala RCS-E e sugli indici di complessità clinica. Lo studio proseguirà nel 2019.

## **AREA DI RICERCA BIOBANCA – BIOTECNOLOGIE AVANZATE E BIOMARKER DISCOVERY**

### ***Biomarker discovery e implementazione di modelli di rischio per la definizione di protocolli di medicina predittiva.***

Le malattie cronic-degenerative rappresentano uno dei problemi più visibili di salute pubblica, a causa degli elevati valori di prevalenza ed incidenza nella popolazione e per la notevole complessità della loro gestione clinica, dovuta anche alla possibile contemporanea presenza di comorbidità. Per tali motivi, si sente sempre più forte l'esigenza di introdurre nella pratica clinica nuovi strumenti di medicina predittiva che permettano, da una parte, la valutazione del rischio individuale, dall'altra, l'adozione di protocolli diagnostici-terapeutici-riabilitativi che migliorino la qualità e l'appropriatezza della gestione clinica della malattia e delle sue complicanze. In questo complesso ed articolato contesto, l'innovazione nei processi clinici (caratterizzata dalla personalizzazione dei processi di cura per diagnosticare precocemente eventi avversi e per ottimizzare il trattamento), e l'innovazione nei sistemi e nelle metodologie per l'integrazione, gestione ed elaborazione dei dati biomedici e clinici rappresentano le basi fondamentali per lo sviluppo e l'implementazione di programmi assistenziali innovativi. A ciò si aggiunga la rapida crescita a cui si è assistito negli ultimi anni della quantità di dati biologici, biomedici ed epidemiologici prodotti non solo mediante le tecnologie "omics", ma anche attraverso l'impiego di fascicoli sanitari elettronici e strumenti di telemedicina, che rappresentano una fonte generosa di informazioni per una medicina predittiva (big-data).

Il progetto si basa sull'ipotesi che l'applicazione di nuove tecniche di apprendimento automatico (machine learning) possa facilitare analisi descrittive e predittive in maniera retrospettiva e generare ipotesi future, al fine di ottenere il massimo valore (conoscenza) dai dati disponibili (strutturati o non strutturati), trasformandoli in una solida base su cui costruire approcci di medicina precisione. Il progetto si pone all'interno del programma del Laboratorio BioDAT, che prevede l'esecuzione di studi di biomarker discovery e l'implementazione di modelli di rischio per la definizione di protocolli di medicina predittiva in pazienti con patologie cronic-degenerative. La scoperta di nuovi biomarcatori (biomarker discovery) è, infatti, essenziale nel disegno di sistemi decisionali clinici in grado di predire in maniera personalizzata il rischio di insorgenza di una specifica patologia e/o delle sue complicanze, nonché la mancata risposta ad un trattamento o la possibile insorgenza di effetti indesiderati, al fine di sviluppare nuovi approcci di medicina precisione in ambito terapeutico e/o riabilitativo.

Gli obiettivi specifici del progetto di ricerca corrente del Laboratorio BioDAT sono finalizzati, pertanto, all'individuazione di biomarcatori innovativi in grado di favorire la promozione di programmi di medicina individualizzati in pazienti con malattie cronic-degenerative, grazie anche alla realizzazione di approcci innovativi di analisi dei dati utili alla diagnosi, prognosi e trattamento delle patologie di interesse e delle comorbidità associate al fine di sviluppare soluzioni integrate per il processo decisionale medico.

Ci si aspetta pertanto di mettere a punto e validare nuovi strumenti decisionali di supporto ai professionisti sanitari per la pianificazione del management clinico di pazienti con malattie cronic-degenerative.

Il progetto, in coerenza con i programmi Nazionali e Comunitari, dedica una forte attenzione alla conversione delle nuove conoscenze/tecnologie in processi e servizi innovativi, che offrano opportunità ai professionisti sanitari per una migliore pianificazione del management clinico e, al tempo stesso, contribuiscano al miglioramento della vita dei cittadini.

I campioni biologici di pazienti con fattori di rischio o patologie croniche disabilitanti sono adeguatamente preservati nella BioBanca Interistituzionale Multidisciplinare (BioBIM). Le procedure di processazione e stoccaggio dei campioni biologici sono state strutturate in base a protocolli standard di riferimento e sono diversificate a seconda dei campioni che vengono trattati. In particolare, la BioBanca dell'Istituto prevede la conservazione dei seguenti tipi di campioni biologici tra cui: campioni ematologici, campioni urinari umani, altri liquidi biologici (es. liquidi ascitici, pleurici, saliva, ecc.), altri campioni biologici (espettorato, feci, ecc.), campioni tissutali umani, prodotti di estrazione (proteine, lipidi, acidi nucleici, ecc.) e linee cellulari umane.

Ad ogni campione biologico sono associati i dati del donatore che comprendono: la cartella clinica, la storia familiare, ed altri eventuali dati ritenuti di rilievo per studi specifici. La BioBIM è organizzata in modo da assicurare: la conservazione del campione per 20 anni, la qualità del campione biologico conservato, il corretto utilizzo dei campioni biologici depositati e la tutela della privacy del soggetto donatore. Gli aspetti metodologici includono l'uso di varie metodiche per l'analisi proteica e la biodistribuzione dei prodotti identificati. Sono inoltre condotte indagini di diagnostica molecolare per l'individuazione di varianti di sequenza utilizzabili come marcatori di diagnosi, progressione, prognosi e risposta alla terapia. Le informazioni ottenute sono integrate ed analizzate tramite avanzate tecnologie bioinformatiche che permettono la consultazione di banche dati on-line, l'estrazione delle informazioni di interesse dai "Big Data" mediante data mining e tecniche algoritmiche, senza perdere di vista alcuni aspetti regolatori in tema di privacy e consenso informato.

Per quanto riguarda in generale il progetto Biomarker Discovery e Banca Biologica, è stato effettuato un aggiornamento del codice SPREC, un sistema di classificazione dei campioni biologici che favorisce non solo l'adozione di procedure operative standard (SOP), ma permette anche di soddisfare le richieste da parte delle autorità di accreditamento o certificazione. Inoltre, è stato analizzato un nuovo metodo di istocultura Gelfoam® tridimensionale in grado non solo di mantenere l'espressione in vivo di antigeni specifici, ma anche di valutare la sensibilità di protocolli di immunoterapia in un contesto di medicina personalizzata.

Studi specifici sono stati eseguiti in collaborazione con gruppi di ricerca interni ed esterni all'IRCCS. In particolare, in collaborazione con il Centro Cefalee dell'IRCCS San Raffaele Pisana di Roma, è stata condotta un'analisi dettagliata del ruolo di alcune varianti geniche nella genesi delle WMH (white matter hyperintensities), un marcatore neuroradiologico recentemente associato con un rischio aumentato di ictus, demenza e morte. La rielaborazione finale dei dati evidenzia il coinvolgimento di uno specifico aplotipo nella formazione di WMH. Sulla base di questi risultati e a supporto di alcune delle evidenze sperimentali ottenute, sono state effettuate alcune revisioni della letteratura al fine di: 1) analizzare il coinvolgimento dello stress ossidativo nella patogenesi dell'emicrania e nella sua progressione verso la cronicizzazione; 2) analizzare la presenza di alcune varianti geniche coinvolte nel metabolismo di micro e macronutrienti, nonché le loro interazioni con alcune sostanze nutraceutiche; 3) identificare possibili biomarcatori circolanti utili al monitoraggio dell'attività di malattia e/o alla predizione della risposta a trattamenti innovativi.

In collaborazione con i Dipartimenti di Medicina dei Sistemi e di Ingegneria delle Imprese dell'Università di Roma Tor Vergata sono proseguiti gli studi di realizzazione/validazione di modelli decisionali clinici la cui architettura possa essere adattata a vari contesti sanitari e quesiti clinici. In particolare è stata effettuata la validazione esterna di un nomogramma recentemente proposto per la definizione del rischio di tromboembolismo venoso in corso di trattamento chemioterapico

in comparazione con il modello decisionale clinico sviluppato dal nostro gruppo di ricerca e basato su tecniche di intelligenza artificiale.

Infine, in collaborazione con il Laboratory of Tumor Immunology and Biology del National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, USA, sono proseguiti gli studi per l'analisi dell'espressione tissutale della proteina Brachyury (un fattore di trascrizione all'interno del complesso di geni T-box, induttore di transizione epitelio-mesenchimale), al fine di verificarne l'idoneità quale bersaglio molecolare in protocolli di immunoterapia.

Grazie alla possibilità di ampliamento della casistica, offerta dalla Banca Biologica Interistituzionale Multidisciplinare (Progetto BioBIM) dell'IRCCS San Raffaele Pisana, e alle numerose collaborazioni nazionali ed internazionali attive, si prevede di ampliare gli studi in corso allo scopo di individuare e validare l'applicabilità clinica di nuovi parametri biologici e dell'algoritmo implementato per la definizione di nuovi protocolli di medicina predittiva. Gli studi eseguiti in questi anni, infatti, hanno preso in considerazione il paziente oncologico, quale paradigma di una condizione di fragilità nella quale è necessario garantire una presa in carico globale del malato attraverso un approccio multidisciplinare e multidimensionale, che garantisca un inserimento precoce delle cure di supporto e della riabilitazione per la prevenzione ed il controllo dei sintomi legati alla malattia e/o alle terapie specifiche. Tuttavia, il modello implementato si è già dimostrato applicabile anche a quesiti diagnostici differenti, che necessitano di un'accurata previsione del rischio per la realizzazione di nuovi percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali e/o per l'applicazione di programmi terapeutici/riabilitativi individuali. Tra le attività previste si prevede, in particolare, la customizzazione del modello algoritmico in pazienti con emicrania allo scopo di verificarne l'applicabilità quale strumento decisionale clinico nella predizione della risposta farmacologica e per l'applicazione di programmi terapeutici personalizzati.

L'esperienza maturata attraverso le attività di ricerca sopra descritte, sostenuta dalle piattaforme tecnologiche sviluppate nel corso degli anni e dalla disponibilità di una Banca Biologica Interistituzionale Multidisciplinare (Progetto BioBIM), dotata di procedure operative standardizzate e delle più moderne tecniche ICT, sono una garanzia per l'esecuzione di studi specifici di biomarker discovery utili per la definizione di protocolli di medicina predittiva per il management clinico di pazienti con patologie cronico-degenerative. L'esteso campionamento in atto presso la BioBIM rappresenta, infatti, una fonte importante di numerose tipologie di matrici biologiche, in grado di favorire in tempi rapidi lo sviluppo di progetti di ricerca traslazionale, nei quali affiancare alle indagini diagnostiche tradizionali le metodiche più innovative su cui si basa la disciplina della "Biomarker Discovery".

Nella sua globalità il progetto potrebbe avere delle ricadute importanti sul SSN, soprattutto attraverso la messa a punto e validazione di strumenti decisionali clinici per la realizzazione di nuovi percorsi diagnostico-terapeutici assistenziali e/o per l'applicazione di programmi terapeutici/riabilitativi individuali in un contesto di medicina personalizzata.

## RICERCA TRASLAZIONALE

### Laboratorio di Neurobiologia Molecolare e Cellulare

#### ***Stimolazione della riparazione del DNA come approccio terapeutico innovativo per la malattia di Alzheimer: neuroni chimicamente derivati da fibroblasti di pazienti Alzheimer (AD) come nuovo modello***

La mancata riparazione di danni al DNA e la presenza di difetti nel funzionamento dei sistemi di riparazione del DNA sono implicati nella morte neuronale osservata in diverse malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Alzheimer (AD). Nei neuroni, i danni del doppio filamento (Double-Strand-Break -DSB) sono riparati dalla “not homologous end joining (NHEJ)”, un sistema di riparazione basato sul complesso della proteina chinasi DNA-dipendente (DNA-PK). Una riduzione dell’attività della NHEJ è stata osservata sia in cervelli di soggetti anziani che di pazienti con Alzheimer (AD) ed il trattamento con beta-amiloide di cellule neuronali causa l’inibizione dell’attività e della funzione della DNA-PK. La beta-amiloide esercita il suo effetto citotossico attraverso l’induzione di stress ossidativo e la generazione di ROS. I mitocondri rappresentano sia la fonte che il target principale dei ROS, la cui eccessiva produzione danneggia il DNA mitocondriale (mtDNA). La disfunzione mitocondriale è infatti uno dei primi segni osservati nei cervelli AD ma il ruolo causale nella patogenesi è tutt’ora poco chiaro. Studi recenti hanno inoltre rivelato la fondamentale importanza dei mitocondri nel differenziamento delle cellule staminali neurali (NSC), suggerendo che il mantenimento delle funzioni mitocondriali è essenziale anche per la neurogenesi. Infatti, è stato dimostrato un maggiore differenziamento delle NSC verso un fenotipo gliale in seguito all’accumulo di danno al mtDNA.

L’obiettivo principale del progetto è identificare il ruolo della riparazione del DNA nella patogenesi di AD, e di proporre l’aumento dell’attività della DNA-PK come nuovo approccio terapeutico per l’AD utilizzando un modello cellulare umano innovativo quale le colture cellulari neuronali umane derivanti da cellule somatiche mediante transdifferenziamento.

La preparazione dei mitocondri e la misurazione dei ROS mitocondriali sono state condotte usando kit commerciali (Beyotime e PerkinElmer, rispettivamente). In particolare, le immagini per la determinazione dei ROS nei mitocondri sono state analizzate utilizzando il software Harmony. L’analisi quantitativa delle proteine mediante Western blot, la localizzazione delle proteine mediante immunofluorescenza e il saggio in vitro di riparazione del DNA mediante NHEJ, sono stati condotti come descritto in De Chiara et al., *Front Aging Neurosci.* 2016 Oct 18; 8:242

Nel presente progetto è stato dimostrato che il trattamento di progenitori neurali umani con la beta-amiloide è in grado di indurre il danno del mtDNA e di modificare il differenziamento delle cellule staminali neurali verso il fenotipo gliale. In particolare, è stato dimostrato che i componenti della Non Homologous End Joining (NHEJ), il principale meccanismo di riparazione dei danni del doppio filamento del DNA (DSBs), quali Ku70, Ku80, DNA-PKcs, XRCC4, sono localizzati nei mitocondri e sono in grado di riparare il mtDNA. La riduzione dell’espressione di XRCC4 e l’inibizione della riparazione del mtDNA accresce gli effetti del trattamento con beta-amiloide sul differenziamento delle cellule staminali neurali. Al contrario, la stimolazione della attività della DNA-PKcs e quindi della riparazione del DNA mediante inositolo-6 fosfato (IP6) è in grado di ripristinare il differenziamento delle NSC e quindi, potenzialmente, la neurogenesi.

Nel complesso questi risultati indicano che la stimolazione della riparazione del mtDNA potrebbe contrastare la tossicità indotta da beta-amiloide e suggeriscono la riparazione del mtDNA come potenziale target terapeutico per le malattie neurodegenerative e per la neurogenesi.

## ***Neuroni chimicamente derivati da fibroblasti di pazienti affetti da demenza: nuovo modello per effettuare diagnosi differenziale***

Le demenze hanno un impatto considerevole in termini socio-sanitari sia perché un sempre maggior numero di famiglie ne è drammaticamente coinvolto, sia perché richiedono una qualificata rete integrata di servizi sanitari e socio-assistenziali per poter essere fronteggiate.

Le demenze, inoltre, rappresentano una delle maggiori cause di disabilità nella popolazione generale, ed in quella anziana in particolare. In Italia, il numero totale dei pazienti con demenza è stimato in oltre un milione, mentre l'attuale numero di malati affetti da malattia di Alzheimer si aggira intorno ai 600.000. Secondo alcune proiezioni, questi numeri potrebbero raddoppiare nei prossimi 30 anni.

Attualmente per le demenze le terapie farmacologiche, riabilitative e psico-educazionali consentono di gestire al meglio la crescente disabilità fisica e cognitiva associata alla progressione della malattia, ma si è ancora molto lontani dal raggiungimento di una buona assistenza ai pazienti ed ai loro familiari. Poiché attualmente non sono conosciuti trattamenti terapeutici risolutivi, l'identificazione di nuove strategie terapeutiche in grado di prevenire/modificare il corso di tali patologie è attualmente uno dei maggiori obiettivi della ricerca. In questo contesto è di fondamentale importanza identificare biomarcatori e sviluppare test diagnostici per seguire il decorso della patologia e, eventualmente, l'efficacia di nuove terapie.

Sulla base dei dati precedentemente ottenuti, l'obiettivo del progetto è confermare che la riduzione e la diversa distribuzione intracellulare delle proteine del complesso della DNA-PK siano associate ad una riduzione dell'efficienza di riparazione dei danni del doppio filamento del DNA ((Double-Strand-Break -DSB)) ed una diminuzione delle cinetiche di riparazione dei DSBs in cellule di pazienti con malattia di Alzheimer (AD) rispetto a cellule di soggetti di controllo. L'obiettivo è quello di valutare il sistema di riparazione del DNA mediante Non Homologous End Joining (NHEJ) come possibili biomarcatori in neuroni umani chimicamente indotti (ciNs), derivanti da cellule somatiche mediante transdifferenziamento.

Le cellule neuronali umane indotte chimicamente, neuroni (ciNs) derivanti da fibroblasti di pazienti affetti da malattia di Alzheimer familiare (FAD) sono state preparate come descritto in Hu et al., 2015.

I livelli extracellulari dei conformeri di Abeta sono stati misurati attraverso saggio ELISA (Hu et al., 2015). Gli studi di cinetica di riparazione del DNA sono stati effettuati come riportato in Narciso et al., 2006.

Sono stati effettuati studi di cinetica di riparazione del DNA in colture neuronali chimicamente indotte, derivanti da pazienti FAD e soggetti di controllo. E' stato riscontrato che la riduzione e la diversa distribuzione intracellulare delle proteine del complesso della DNA-PK, precedentemente identificate, sono associate ad una riduzione dell'efficienza di riparazione dei danni del doppio filamento del DNA (DSBs) ed una diminuzione delle cinetiche di riparazione dei DSBs in cellule FAD rispetto a cellule di soggetti di controllo. I ciNs provenienti da pazienti FAD mostrano rispetto ai controlli un aumento dei foci di gamma H2AX (noto marker del danno del DNA), indicando un difetto di riparazione dei DSBs.

E' stata valutata la relazione causale tra l'accumulo di beta-amiloide e l'inibizione del sistema di riparazione del DNA in ciNs, derivanti da pazienti FAD e da soggetti di controllo, misurando i livelli extracellulari di beta-amiloide mediante saggio ELISA. I ciNs provenienti da pazienti FAD mostrano rispetto ai controlli una elevata produzione di beta-amiloide extracellulare che potrebbe essere responsabile, almeno in parte, della ridotta capacità di queste cellule di riparare i danni del DNA mediante il sistema DNA-PK-dipendente.

Questi studi hanno la potenzialità di valutare il sistema di riparazione del DNA mediante Non Homologous End Joining (NHEJ) in neuroni umani derivati da pazienti come possibile marcatore di patologia e inoltre di testare sostanze in grado di stimolare la riparazione del DNA nei ciNs come possibile approccio terapeutico per l'AD.

## **Laboratorio di Neurofisiologia Sperimentale**

### ***Analisi morfologica ed elettrofisiologica degli effetti neurodegenerativi dell'applicazione di alpha-sinucleina su colture neuronale animali e cellule staminali pluripotenti indotte (Induced Pluripotent Stem Cells- iPSCs) umane***

La Malattia di Parkinson (MP) è una delle principali malattie neurodegenerative, caratterizzata da bradicinesia, rigidità, tremore a riposo. Le caratteristiche neuropatologiche sono la progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella Substantia Nigra pars compacta (SNc) e la presenza di inclusioni multiproteiche immunoreattive alla alpha-sinucleina ( $\alpha$ -syn) denominati corpi di Lewy (LB) (Spillantini et al., Nature 1997).

Un problema irrisolto rimane la valutazione delle prime alterazioni sinaptiche (early) che possono intervenire sui neuroni nigrostriatali e che probabilmente sono causate dall'accumulo di  $\alpha$ -syn. Per ottenere una migliore comprensione della sequenza patologica di eventi che si verificano nella MP familiare e sporadica, un certo numero di modelli di roditori sono stati sviluppati negli anni passati. Purtroppo, la maggior parte dei modelli genetici in topo non presenta un fenotipo morfologico e comportamentale evidente (Dawson et al., Neuron 2010). Il gruppo dei ricercatori condotto dalla Professoressa Maria Grazia Spillantini nel 2006 ha sviluppato un modello transgenico overesprimente  $\alpha$ -syn nella SNc di topo utile per valutare aspetti specifici della patogenesi della malattia (Tofaris et al., J Neurosci 2006). Recentemente il gruppo del laboratorio di Neurofisiologia Sperimentale ha studiato in vitro su fettine corticostriatali di topo  $\alpha$ -syn le alterazioni specifiche della plasticità sinaptica striatale in diversi sottotipi neuronali nelle fasi iniziali della malattia (Tozzi et al., Biol Psychiatry 2015).

Nonostante la MP sia considerata un disordine sporadico, esistono sempre maggiori evidenze del link tra la MP e diverse alterazioni genetiche (Obeso et al., 2017). Nell'ultimo decennio, oltre all' $\alpha$ -syn, anche il gene LRRK2 ha attirato l'interesse della comunità scientifica perché associato alle forme di Parkinson Late-Onset autosomiche dominanti. Mutazioni del gene LRRK2 sono presenti fino al 13% di MP familiare 1-2% di quelli sporadici (Berg et al., Brain 2005).

È di notevole interesse che sia la proteina  $\alpha$ -syn che l'attività LRRK2 siano implicate nella regolazione delle attività sinaptiche a livello delle spine dendritiche alterate nella MP, e potrebbero quindi rappresentare agenti molecolari target di possibili nuovi approcci terapeutici per la malattia.

È stato ampiamente dimostrato dal nostro gruppo e da altri che l'accumulo di  $\alpha$ -syn in vitro ed in vivo può portare ad alterazioni neuronali specifiche della plasticità sinaptica corticostriatale nelle fasi iniziali di malattia.

In questo studio ci si propone di comprendere a livello cellulare, mediante l'uso di diverse linee neuronali in coltura, i meccanismi molecolari, elettrofisiologici e morfologici alla base delle alterazioni causate da accumulo di  $\alpha$ -syn o dalla manipolazione del gene LRRK2. Il progetto è diviso in due parti: uno studio su neuroni dopaminergici in colture immortalizzate e colture primarie di topo; e uno studio mediante cellule staminali pluripotenti indotte iPSCs da pazienti Parkinsoniani (Reinhardt et al., Plos-One 2013, Cell Stem Cell 2013).

Gli obiettivi del seguente progetto sono:

- 1) Studio delle alterazioni morfologiche e sinaptiche indotte dall'applicazione in vitro di  $\alpha$ -syn, nelle diverse forme di aggregazione, monomeriche, oligomeri e protofibrille, su colture neuronali dopaminergiche immortalizzate e primarie.
- 2) Analisi elettrofisiologica e morfologica di colture primarie dopaminergiche di topi controllo e overesprimenti  $\alpha$ -syn mediante applicazione a vari dosaggi di differenti forme di  $\alpha$ -syn.
- 3) Studio delle alterazioni morfologiche ed elettrofisiologiche di neuroni in colture primarie di topi mutanti per LRRKs.
- 4) Studio elettrofisiologico di neuroni iPCs derivanti da pazienti MP con e senza mutazioni LRRKs.
- 5) Misurazioni della concentrazione di dopamina, prima e dopo l'incubazione con  $\alpha$ -syn, sia su colture primarie dopaminergiche che in iPCs con diverse mutazioni LRRKs.

Si intende procedere con:

- 1) Messa a punto colture neuronali stabilizzate e primarie di topo
- 2) Analisi morfologica di base
- 3) Analisi elettrofisiologica di base mediante registrazioni Patch-clamp whole cell (proprietà di firing, attività sinaptica, analisi canali NMDA/AMPA, Ca<sup>2+</sup> e Na<sup>+</sup> dipendenti) in colture dopaminergiche con e senza diverse concentrazioni di  $\alpha$ -syn.
- 4) Analisi elettrofisiologica neuroni dopaminergici con mutazioni LRRKs e interazioni con  $\alpha$ -syn.
- 5) Analisi morfologica dei neuroni sIPSC da pazienti MP con mutazioni LRRKs.

Sono state messe a punto le colture neuronali primarie di topo. E' stato messo a punto un metodo ottimale per l'allestimento di colture neuronali primarie partendo da tessuto cerebrale mesencefalico di embrioni di topi CD1, in collaborazione con l'IBCN-CNR "A. Buzzati-Traverso", Monterotondo (Roma) (n° protocollo 446/2015PR). In questa prima fase sperimentale ci si è occupati soprattutto di individuare i giusti time-points per ottenere le condizioni ideali per condurre gli studi elettrofisiologici e morfologici prefissati nelle colture primarie mesencefaliche. Nuovi accorgimenti, per migliorare le metodologie utilizzate, sono stati adottati durante la sperimentazione.

#### *I Fase – Accoppiamento*

Sono state predisposte due gabbie di accoppiamento (per ciascuna un maschio e due femmine), ad intervallo quindicinale. Per il corretto calcolo dei giorni embrionali, si è scelto di lasciare in accoppiamento i topi, per circa 12 ore (dalla sera alla mattina successiva), trascorse le quali le femmine sono state separate dal maschio. Al 10° giorno dall'accoppiamento, tramite palpazione ed osservazione, sono state individuate le femmine gravide. La mattina successiva all'accoppiamento è stata definita come E0 (giorno embrionale 0). Al momento della palpazione i giorni embrionali saranno E10; mentre per il prelievo degli embrioni si dovrà attendere E13.

#### *II Fase – Protocollo dissezione di tessuto embrionale mesencefalico*

Ad E13 gli embrioni, sono stati sottoposti al prelievo del mesencefalo, che è stato successivamente conservato in soluzione HBSS (Invitrogen, 24020-091, Gibco 24020; due campioni per falcon da 15ml).

#### *III Fase – Protocollo per la Preparazione di Cellule primarie mesencefaliche attraverso digestione enzimatica*

- Aspirato l'HBSS i mesencefali sono stati incubati in una soluzione enzimatica (Cystein 2mg, DMEM 10ml, CaCl<sub>2</sub> 100mM, EDTA 50mM, Papain e DNAsi 100x), per 15-20 minuti a 37°C all'interno di un incubatore (5% di CO<sub>2</sub>).

- Successivamente, è stata effettuata dissociazione tissutale meccanica, ed in seguito è stato prelevato il surnatante, eliminando quindi il tessuto non dissociato. Sono stati centrifugati i campioni per 5 minuti a 200rpm.
- Dopo aver aspirato la soluzione enzimatica, è stata aggiunta una soluzione inattivante (Albumin 25mg, Trypsin-Inhibitor 25mg, FCS-Medium al 10% e DNAsi 100x), dissociato ulteriormente il pellet e lasciato riposare per 15-20 minuti a 37°C (5% di CO<sub>2</sub>) in un incubatore e successivamente centrifugato nuovamente per 5 minuti a 200rpm.
- A questo punto, la soluzione inattivante è stata aspirata e i pellet sono stati risospesi in una soluzione di lavaggio (DMEM, FBS al 10% e DNAsi). Anche in questo caso il pellet è stato dissociato e centrifugato per 5 minuti a 200rpm.
- Aspirata la soluzione di lavaggio, sono stati aggiunti 2ml di mezzo DMEM/F12, (contenente Glutamax 1x, Pen/Strep 1x, B27) per ogni falcon ed è stato nuovamente attuato il passaggio di dissociazione tissutale.
- I campioni cellulari, così ottenuti, sono stati piastrati su vetrini copri oggetto (12mm Ø) polilisinati (polilisina 15µg/ml in H<sub>2</sub>O, lasciata a riposo per un'ora a 37°C) in una multiwell da 24. La piastra è stata quindi incubata a 37°C (5% di CO<sub>2</sub>) all'interno di un incubatore.
- Il mezzo cellulare DMF12 è stato cambiato il giorno dopo e ogni due giorni per 14 giorni.

#### IV Fase – Osservazione Colture Cellulari

Al 7°, al 10° e al 14° giorno delle colture cellulari, sono state osservate le cellule al microscopio (Olympus IX2-SLP, obiettivo 20x) per verificare la confluenza cellulare. In questa fase è stata valutata la variabilità di crescita cellulare in base al numero di cellule che è stato piastrato, in modo da scegliere i vetrini con una confluenza cellulare adatta per gli esperimenti di elettrofisiologia e di morfologia. Durante le prime osservazioni, però, alcuni di essi sono risultati più confluenti rispetto ad altri, si è quindi deciso di suddividere tutti i campioni in due gruppi (vetrini con colture più confluenti vs. vetrini meno confluenti).

#### V Fase – Esperimenti di Elettrofisiologia

Per effettuare le prime analisi elettrofisiologiche sono stati scelti diversi time-points per la loro valutazione a 7, 10 e 14 giorni. Per ogni singola coltura neuronale le procedure sono state le stesse: il vetrino copri oggetto, su cui erano stati piastrati i neuroni, è stato rapidamente rimosso dalla multiwell e posto nella cameretta di registrazione, costantemente perfuso con liquido cerebrospinale sintetico (ACSF) e mantenuto a 32-34°C. L'elettrodo di registrazione è stato riempito con una soluzione intracellulare (120 K $\mu$  gluconate, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 10 HEPES, 0.3 Na-GTP, and 2 Mg-ATP portato a pH 7.3 con KOH). Per le prove di registrazione di patch-clamp whole cell è stato utilizzato l'amplificatore Multiclamp 700B. Tutti i campioni osservati di entrambi i gruppi (vetrini con colture più confluenti vs. vetrini meno confluenti), sin dal 7° giorno in coltura, si sono rivelati essere troppo confluenti per completare una registrazione di patch-clamp. Si è osservata una diffusa morte cellulare ed una mancata maturazione neuronale, completa e diffusa, molto probabilmente dovuta all'eccessiva confluenza. Erano, infatti, presenti agglomerati di cellule indifferenziate pluristratificate. Ogni tentativo di registrazione è stato vanificato dall'instabilità dell'ancoraggio dei neuroni al substrato e dallo stato di salute stessa delle cellule. Si è quindi deciso di ridurre il numero di cellule piastrate. Questa attività sperimentale iniziale, anche se non ha prodotto per le ragioni addotte, risultati concreti, ha permesso di testare protocolli e parametri di registrazione.

#### VI Fase – Esperimenti di Morfologia

Le cellule in coltura, piastrate su vetrini copri oggetto, sono state fissate con una soluzione di Paraformaldeide al 4% a diversi time-points (7°, 10° e 14° di coltura) e sono stati incubati con i diversi anticorpi primari ed in seguito con gli opportuni anticorpi secondari, mentre i nuclei sono stati contromarcati con DAPI. Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: TUJ1 (class III-b-

tubulin), Dcx (Doublecortin), e Map2 che rappresentano specifici marker neuronali. Inoltre, per discriminare la popolazione neuronale che caratterizzava le colture primarie allestite sono state effettuate immunofluorescenze con i seguenti anticorpi: tirosina idrossilasi (TH) (neuroni dopaminergici), GAD67 (neuroni GABAergici), Chat (interneuroni Cholinergici), vGLUT (neuroni Glutammatergici), TPH e/o SERT (neuroni Serotoninergici) (Hu et al., 2015). Queste valutazioni morfologiche di marcatori neuronali e neurotrasmettitoriali sono state effettuate per capire e analizzare meglio gli esperimenti di elettrofisiologia condotti di pari passo ed agli stessi time-points; inoltre forniranno informazioni utili per le fasi successive del progetto mediante incubazione dei neuroni con  $\alpha$ -syn in forma monomeric, oligomeric e protofibrillare, per valutare i meccanismi molecolari e sinaptici sottostanti il danno causato da questa proteina. Ultimata questa prima fase di messa a punto delle condizioni ottimali sia per le registrazioni elettrofisiologiche di neuroni mesencefalici in coltura che per l'analisi morfologica (Punti 1 e 2 delle expected activities), si passerà alla applicazione in vitro di diverse forme conformazionali di proteina  $\alpha$ -syn per studiare le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni in assenza e presenza di danno neurodegenerativo causato dalla proteina misfolded. L'analisi elettrofisiologica sarà accompagnata da una dettagliata analisi morfologica che aiuterà a capire come e dove il danno da accumulo di  $\alpha$ -syn andrà a concentrarsi.

## **Laboratorio di Biochimica dell'Invecchiamento**

### ***Identificazione di determinanti cellulari e molecolari di malattia o di risposta alle terapie in modelli di patologie degenerative***

Il tessuto adiposo rappresenta un organo centrale nella regolazione metabolica dell'omeostasi energetica di tutto l'organismo. Morfologia e ruolo metabolico sono alla base della diversa denominazione del tessuto adiposo bianco e del bruno. Il primo altamente ricco in trigliceridi funziona principalmente da deposito e, in seguito a richiesta di energia, fonte di acidi grassi per gli altri tessuti; il secondo, utilizza gli acidi grassi per regolare la temperatura, dissipando energia. Inoltre, gli adipociti hanno funzione endocrina sintetizzano ormoni, citochine e adipochine in grado di regolare il bilancio energetico a livello sistemico, integrando segnali multidirezionali tra il sistema nervoso centrale e gli organi periferici. Queste funzioni sono correlate a una dinamica capacità del tessuto adiposo di rimodellare la grandezza, il numero e il tipo di adipociti in risposta alla richiesta metabolica, anche grazie ad un'attiva presenza di cellule staminali adipocitarie. Pertanto, alterazioni dell'omeostasi del tessuto adiposo possono risultare in dis-metabolismo energetico dell'intero organismo attraverso diversi meccanismi:

- a. aumento/diminuzione dell'attività termogenica del tessuto adiposo bruno che risulta in variazioni della spesa energetica;
- b. aumento della differenziazione del tessuto adiposo bianco in bruno;
- c. alterato potenziale differenziativo delle cellule staminali in adipociti;
- d. alterata produzione di ormoni, citochine e adipochine.

Recentemente, il ruolo dell'omeostasi del tessuto adiposo è stato ridisegnato e reinterpretato dalla scoperta di nuovi mediatori della segnalazione specialmente da/verso il sistema nervoso centrale e da/verso il tessuto muscolare. Queste ricerche aprono nuove prospettive terapeutiche per la cura e la riabilitazione di diverse patologie, alcune strettamente connesse con il metabolismo lipidico (metaboliche, cerebrovascolari, cronico degenerative dell'apparato cardiovascolare), altre inesplorate sotto questo aspetto (neurodegenerative, neuromotorie) ma fortemente connesse con alterazioni del metabolismo energetico a livello sistemico.

Si intende effettuare uno studio delle alterazioni dell'omeostasi del tessuto adiposo e ricadute metaboliche sulla bioenergetica, stress ossidativo e infiammazione di tessuti periferici

Ci si aspetta di individuare nuove prospettive terapeutiche per la cura e la riabilitazione di diverse patologie alcune strettamente connesse con il metabolismo lipidico (metaboliche, cerebrovascolari, cronico degenerative dell'apparato cardiovascolare), altre inesplorate sotto questo aspetto (neurodegenerative, neuromotorie) ma fortemente connesse con alterazioni del metabolismo energetico a livello sistemico.

Il progetto di ricerca è altamente innovativo in quanto, ad esempio, le malattie neurodegenerative sono spesso associate a perdita della massa grassa oltre alla massa muscolare; tuttavia gli aspetti correlati alla perdita o al malfunzionamento del tessuto adiposo sono solo marginalmente studiate o completamente inesplorate.

Relativamente alla metodologia, nello studio sono utilizzate cellule dopaminergiche di neuroblastoma umano SH-SY5Y, preadipociti (3T3-L1) e mioblasti murini (C2C12). Le cellule sono trattate con tossine mitocondriali ampiamente impiegate nei modelli sperimentali di PD (rotenone, MPTP, 6-OHDA) oppure over-esprimono la proteina SOD1 mutata responsabile delle forme familiari di SLA.

Per mimare il regime di restrizione calorica, è effettuata una deprivazione di nutrienti (starvation) coltivando le cellule anziché in un terreno standard in un mezzo contenente basso contenuto di glucosio e in assenza di siero. Per mimare condizioni di "overfeeding" le cellule sono trattate con una miscela di acidi grassi (es. acido oleico e linolenico).

Trasfezioni: Trasfezione con Nucleofector 4D® per la modulazione dell'espressione di proteine target in dipendenza del modello sperimentale (ad esempio, ATGL, NAT8L, SOD1 wt e mutata)

Modelli in vivo: Topi C57BL/6 WT, topi KO per ATGL, topi transgenici alpha-synA53T per PD, SOD1-G93A per SLA e trattati per indurre encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) per studi di SM.

Trattamenti: Rotenone (tossina PD), Dieta ad alto contenuto di grassi a catena corta o ricca in piruvato, restrizione calorica, EAE.

Altre metodologie. Saggi biochimici: trigliceridi, glicerolo, enzimi della beta-ossidazione, ATP, consumo di ossigeno, citochine infiammatorie. Analisi delle proteine: BN-PAGE, co-IP, Western blot. Biologia molecolare: RT-qPCR Stell Array, ChIP. Determinazione di NAA tramite HPLC. Metodi genetici: genotipizzazione (SNPs). Biologia cellulare: microscopia confocale, citofluorimetria. Analisi istologiche. Lipidomica e trascrittomica di diversi tessuti in relazione al tipo di neurodegenerazione e di trattamento.

## **Laboratorio di Elettrofisiologia**

### ***Valutazione degli effetti della stimolazione magnetica neuromuscolare sul deficit muscolare in pazienti con Sclerosi Laterale Amiotrofica(SLA)***

La SLA è una patologia caratterizzata da progressiva degenerazione dei motoneuroni che portano i pazienti ad atrofia muscolare e morte per insufficienza respiratoria. Uno dei meccanismi biologici principali presenti nella SLA è la perdita di una efficace connessione tra muscolo e nervo. Da anni infatti, è motivo di discussione se la denervazione muscolare preceda la morte neuronale o se l'atrofia muscolare derivi dalla degenerazione del motoneurone e degli assoni. Tuttavia, indipendentemente dal fatto che si verifichi presto o tardi nella malattia, la denervazione muscolare e l'alterazione della giunzione neuromuscolare sono caratteristiche ineluttabili della progressione della malattia della SLA (Palma et al., 2011).

È stato precedentemente riportato che l'espressione muscolare di un gene mutante SOD1 induca atrofia muscolare, significativa riduzione della forza muscolare, disfunzione mitocondriale, microgliosi (Dobrowolny et al., 2008) e degenerazione neuronale (Wong e Martin 2010), suggerendo che i segnali retrogradi dal muscolo al nervo possono contribuire al danno assonale. Il muscolo scheletrico è anche una fonte di segnali che influenzano la sopravvivenza del neurone, la crescita assonale e il mantenimento delle connessioni sinaptiche (Musarò, 2012). Inoltre, precedenti lavori del gruppo di ricerca su muscoli di pazienti SLA hanno evidenziato che i recettori dell'acetilcolina (AChR) sono meno sensibili al neurotrasmettitore di quelli presenti in muscoli di controllo da pazienti con denervazione da trauma (Palma et al., 2011). Questo suggerisce che il muscolo scheletrico è un importante obiettivo per l'intervento terapeutico (Loeffler et al., 2016; Palma et al., 2016) e mantenere il muscolo forte e attivo potrebbe aiutare a funzionare meglio di fronte ad un ridotto input del motoneurone.

Il sistema neuromuscolare può essere stimolato artificialmente dall'esterno, attraverso l'applicazione di campi elettrici, che possono essere applicati direttamente da una stimolazione elettrica (ES) o indotti da campi elettromagnetici. L'ES, se pur efficace nel migliorare la massa e la funzione muscolare negli anziani e nei muscoli denervati, presenta aspetti negativi in quanto attiva vie nocicettive che potrebbero causare dolore e aumentare la spasticità del paziente. Pertanto, è stata proposta la stimolazione magnetica neuromuscolare (NMMS) come tecnica alternativa, non invasiva, all'ES in grado di generare campi elettromagnetici che possono penetrare nei tessuti ad alta resistenza e stimolare il muscolo in profondità.

L'ipotesi del "dying back" afferma che nella SLA anche segnali provenienti dal muscolo potrebbero contribuire alla degenerazione motoneuronale e si contrappone, e complementa, l'ipotesi più classica secondo la quale la morte dei motoneuroni indurrebbe una degenerazione del muscolo.

Nel presente progetto si è indagato più a fondo come fattori muscolari siano alterati nella ALS con il fine di aggiungere importanti pezzi al puzzle del dying back. In particolare, si valuta quali siano gli effetti della stimolazione magnetica sui vari determinanti molecolari ed elettrofisiologici della normale fisiologia muscolare, come fattori di trascrizione o anabolizzanti ed il recettore dell'acetilcolina.

Ciò permette di valutare se un intervento terapeutico che sia mirato direttamente al muscolo possa avere effetti di "saving-back" ovvero migliorare la funzione dei motoneuroni a monte.

Il significato di questo approccio va individuato sia nella ricerca di una migliore comprensione dei fattori muscolari che concorrono allo sviluppo della SLA sia alla ricerca di nuovi bersagli terapeutici in un tessuto, quello muscolare, che potrebbe avere un ruolo non solo nella patogenesi, ma anche nel trattamento di questa grave patologia neurodegenerativa.

Gli obiettivi del progetto sono quelli di indagare gli effetti della stimolazione magnetica sul muscolo dei pazienti SLA sotto vari aspetti:

- Funzionale: Indagare se la stimolazione magnetica sia in grado di aumentare la forza muscolare nei pazienti attraverso una valutazione degli arti superiori in base alla scala Medical Research Council (MRC) (prima del protocollo di stimolazione, alla fine e 30 giorni dopo) e l'uso del dinamometro a mano. Questa parte del progetto è stata fatta in collaborazione con il Centro SLA del Policlinico Umberto I di Roma. Ogni paziente è stato sottoposto ad un'agobiopsia del muscolo che ha ricevuto il trattamento di NMMS e del muscolo controlaterale di controllo al fine di svolgere un'analisi dettagliata dal punto di vista:
- Elettrofisiologico: Studiare se la NMMS possa indurre modificazioni (es: ampiezza della corrente, decadimento, affinità per il neurotrasmettitore) che possano influenzare la funzionalità del recettore dell'Acetilcolina in quanto il gruppo di ricerca ha

precedentemente dimostrato che i recettori nicotinici muscolari di pazienti SLA hanno caratteristiche elettrofisiologiche differenti dai muscoli con denervazione da trauma.

- Istologico: Analizzare se la NMMS possa indurre cambiamenti sul grado di atrofia muscolare e sulla composizione del tipo di fibre in quanto una delle caratteristiche dei muscoli di pazienti SLA è la modifica della fibra muscolare con una perdita selettiva della fibra a contrazione rapida. Questa parte del progetto è stata svolta in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma.
- Molecolare: Valutare attraverso un'analisi di Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) eventuali cambiamenti nei livelli di mRNA di un gruppo selezionato di geni coinvolti nella crescita e plasticità muscolare in campioni trattati con NMMS e nei controlli. L'attenzione è stata posta su due fattori principali: il fattore di crescita insulino-simile IGF-1, coinvolto nella stimolazione della crescita muscolare e la Miostatina che invece la inibisce. Questa parte del progetto è stata sviluppata in collaborazione con l'Università Sapienza di Roma

Questo progetto vuole fornire nuove evidenze scientifiche riguardo l'impiego della NMMS nel trattamento della SLA. Con questo progetto ci si prefigge di ottenere sia dati oggettivi sugli effetti della stimolazione magnetica direttamente sul paziente SLA, sia un'analisi dettagliata dei meccanismi fisiologici e molecolari che possono attivarsi nel tessuto muscolare di questi pazienti in seguito al trattamento. Essendo il deficit di forza uno degli aspetti più invalidanti, ci si aspetta, in primis, di ottenere un aumento della funzionalità manuale del braccio stimolato e che questo effetto si protragga nel tempo. Inoltre, ci si aspetta che i dati clinici siano poi supportati dall'analisi molecolare e fisiologica che metta in luce l'attivazione di circuiti locali in grado di attenuare la debolezza muscolare migliorando così la qualità della vita. L'idea principale è quella di proporre la NMMS come un nuovo trattamento terapeutico in grado di stabilizzare la giunzione neuromuscolare, preservare la composizione del tipo di fibra e possibilmente prevenire l'atrofia muscolare nonché la progressione della malattia.

La migliore comprensione del modello del dying-back e quindi del ruolo attivo del muscolo nella patogenesi della SLA permetterà di aprire nuove prospettive sullo studio di questa patologia neuromuscolare. Ad esempio, qualora i risultati dovessero essere confermati, la stimolazione magnetica ed altre eventuali terapie bersaglianti direttamente il tessuto muscolare potrebbero essere più rapidamente considerate per la pratica clinica.

Inoltre, il progetto si dimostra innovativo anche perché non ricorre all'uso di modelli animali ma si è servito direttamente di tessuti muscolari umani raccolti da un gruppo di pazienti in trattamento presso il centro SLA del policlinico Umberto I. Questa collaborazione ha consentito di raccogliere un significativo numero di tessuti che ha permesso di effettuare diversi studi molecolari ed elettrofisiologici, affiancati alle costanti valutazioni cliniche.

Questo approccio traslazionale costituisce un valore aggiunto dello studio e ha permesso di ottenere risultati facilmente traslabili alla pratica clinica.

I tessuti muscolari di pazienti affetti da SLA sono stati prelevati presso il Centro SLA del Policlinico Umberto I di Roma e il loro uso è stato regolarmente autorizzato dalla Commissione Etica dell'Università Sapienza di Roma. Sono stati inclusi pazienti a partire dai 18 anni di età che presentavano una diagnosi di probabile o definita SLA ad esordio spinale secondo i criteri elettrodiagnostici (de Carvalho et al., 2008), un moderato grado di atrofia muscolare e deficit muscolare simmetrico bilaterale nel muscolo flessore radiale del carpo o muscolo flessore profondo delle dita definito da un punteggio MRC della scala muscolare di 3-4 /5.

I pazienti sono stati divisi in due gruppi: un primo gruppo ha ricevuto una stimolazione magnetica reale (rNMMS) del braccio destro e una stimolazione sham (sNMMS) del braccio sinistro mentre il secondo gruppo ha ricevuto una rNMMS del braccio sinistro e una sNMMS del braccio destro. Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad uno studio di conduzione nervosa (NCS) e un esame clinico

che ha incluso un test di resistenza all'impugnatura per la misura della forza isometrica massima dei muscoli dell'avambraccio. Alla fine della stimolazione, è stata effettuata un'agobiopsia bilaterale del muscolo flessore radiale del carpo su cui sono stati effettuati studi elettrofisiologici, istologici e molecolari.

#### NMMS

Tutti i pazienti hanno ricevuto stimolazioni magnetiche per cinque giorni a settimana per due settimane consecutive. Le rNMMS sono state effettuate tramite uno stimolatore magnetico ad alta frequenza (Magstim Rapid - The Magstim Company Ltd., Whitland, South West Wales, Regno Unito) collegato ad una spirale raffreddata circolare posta sopra i muscoli flessori dell'avambraccio mentre le sNMMS con una bobina fittizia che produce simili sensazioni acustiche e percezioni meccaniche della pelle.

#### Analisi istologica

Le biopsie del muscolo flessore del carpo sono state effettuate sul braccio stimolato rNMMS e sul braccio controlaterale non trattato (sNMMS) di pazienti con SLA. Le biopsie sono state eseguite immediatamente dopo il protocollo di 2 settimane con NMMS e congelate in azoto liquido. Successivamente sono state effettuate sezioni da 5  $\mu\text{m}$  di ciascuna biopsia e colorate con Ematossilina ed Eosina (HE) per le analisi morfologiche e nuovamente immunocolorate con anticorpi miosina veloce, lenta e fetale (Novocastra, MI, Italia) per valutare la distribuzione dei tipi di fibre.

#### Preparazione dell'RNA e RT-PCR.

L'RNA totale (1 $\mu\text{g}$ ) da biopsie muscolari umane è stato isolato attraverso il TRIzolTM (Thermo Fisher Scientific) e retrotrascritto utilizzando il Kit di trascrizione inversa QuantiTect Kit (Qiagen). La PCR quantitativa è stata eseguita utilizzando l'ABI PRISM 7500 SDS (Thermo Fisher Scientific), Taqman universale è stato normalizzato per l'espressione di GAPDH e U6 snRNA rispettivamente per mRNA e microRNA.

#### Elettrofisiologia

##### Preparazione di membrane:

Le membrane sono state preparate come descritto precedentemente (Palma E, et al. 2011). Circa 0.1-0.5 gr di tessuto congelato è stato omogeneizzato in 2 ml di buffer di glicina usando un omogenizzatore Ultra Turrex (Ika, Germania). Il filtrato è stato centrifugato per 15 min a 9500 g con una centrifuga Beckmann (rotore C1015) e il super raccolto e centrifugato per due ore a 100.000 g usando una centrifuga TL100 a 4 °C. Il pellet, dopo essere stato lavato e risospeso in buffer di glicina (5 mM), è stato usato direttamente oppure conservato a -80 °C fino all'uso.

##### Registrazioni voltage-clamp:

Dopo 24 ore dall'iniezione citoplasmatica di membrane sono state registrate negli oociti le correnti totali con la tecnica del voltage-clamp intracellulare con due elettrodi (3 M KCl) come descritto precedentemente (Palma et al., 2011).

Per lo sviluppo di questo progetto sono stati arruolati 22 pazienti con SLA ad esordio spinale a cui è stata eseguita una stimolazione magnetica muscolare su un braccio (rNMMS) ed una finta stimolazione sul braccio opposto (sNMMS). Questa stimolazione è stata fatta per due settimane consecutive e ha dato i seguenti risultati:

I pazienti sono stati sottoposti ad una valutazione degli arti superiori in base alla scala MRC (prima del protocollo di stimolazione, alla fine e 30 giorni dopo) e all'uso del dinamometro a mano. I test statistici hanno mostrato un significativo effetto della NMMS sulla scala MRC, dimostrando così che la stimolazione magnetica neuromuscolare era in grado di aumentare la forza muscolare nei muscoli flessori dell'avambraccio.

Sono state effettuate biopsie del muscolo flessore del carpo sul braccio stimolato e sul braccio controlaterale non trattato di pazienti affetti da SLA. Ciò ha permesso di ottenere i seguenti risultati:

- Grazie al tessuto muscolare di questi pazienti è stato possibile iniziare una caratterizzazione elettrofisiologica del recettore dell'Acetilcolina presente nel muscolo stimolato e confrontarlo con recettori il cui muscolo aveva ricevuto una finta stimolazione. E' stata individuata una più ampia corrente evocata dall'acetilcolina nel muscolo stimolato rispetto al non trattato, supportando così l'idea che questo trattamento possa aumentare la funzionalità di questo recettore. Ulteriori studi con il proseguo di questo progetto forniranno maggiori informazioni riguardo le caratteristiche elettrofisiologiche che possano ulteriormente aiutare a comprendere se la stimolazione magnetica possa influenzare l'attività muscolare.
- E' stata effettuata un'analisi di real-time PCR (RT-PCR) per quantificare alterazioni nei livelli di mRNA di un gruppo selezionato di geni coinvolti nella crescita muscolare e nella plasticità in entrambi i campioni di rNMMS e sNMMS di 7 pazienti. E' stato analizzato il fattore di crescita 1 insulino-simile (IGF-1) e la miostatina che sono fattori chiave coinvolti negli adattamenti dei muscoli scheletrici svolgendo ruoli opposti nel regolare la dimensione del muscolo scheletrico.

Non è stata individuata alcuna differenza significativa nei livelli di espressione di IGF-1o miostatina, suggerendo quindi che l'azione trofica della rNMMS agisce con percorsi alternativi.

Nel proseguo del progetto si intende studiare ulteriori fattori coinvolti nell'atrofia muscolare, quali MAFbx/atrogen-1 e MuRF-1 con l'intento di analizzare ulteriori possibili vie su cui possa agire la stimolazione magnetica contrastando così i processi di atrofia.

Infine con il proseguo del progetto si analizzerà se la NMMS possa indurre cambiamenti sul grado di atrofia muscolare e sulla composizione del tipo di fibre. Ci si aspetta di ottenere un'analisi dettagliata dei parametri istomorfometrici dei muscoli di pazienti SLA che possa fornire ulteriori informazioni riguardanti il possibile uso della stimolazione magnetica per la cura di questa patologia.

La rilevanza traslazionale è garantita dall'approccio multidisciplinare che caratterizza questo progetto. Lo studio infatti ha arruolato un pool di pazienti in costante osservazione clinica che sono stati sottoposti a biopsie ai fini di effettuare, con il tessuto prelevato, esperimenti di biologia molecolare, istologia ed elettrofisiologia.

Questo approccio ha permesso di avvicinare la ricerca di base alla pratica clinica ottenendo quindi dei risultati che tenessero in considerazione le reali necessità dei pazienti. Ciò rispetta l'esigenza del sistema sanitario nazionale di usufruire di risultati di ricerche che siano utilizzabili nel trattamento dei pazienti nel breve-medio termine, supportate da studi solidi ed ovviamente effettuati sull'umano.

### ***Studio delle disfunzioni GABAergiche nella sindrome di Dravet***

La sindrome di Dravet è una rara forma di encefalopatia epilettica della quale l'insorgenza è stimata in circa 1:15000-20000 nuovi nati (Wu et al., 2015). La causa di questa patologia viene individuata in diverse mutazioni a carico del gene SCN1A, codificante per la subunità alpha1 del canale del sodio voltaggio-dipendente (Steel et al., 2017). Tuttavia diverse recenti evidenze lasciano supporre che anche altri fattori coinvolti nella neurotrasmissione centrale siano implicati nella patogenesi di questa sindrome. In particolare la trasmissione GABAergica sembra avere un ruolo significativo nella sindrome di Dravet e ciò è confermato da recenti studi che hanno messo in evidenza come mutazioni anche a carico di alcune subunità del recettore GABAA possano

determinare un fenotipo simile a quello che si riscontra nei casi “classici” con mutazioni SCN1A (Steel et al 2017). Inoltre la pratica clinica suggerisce anche che alcuni farmaci GABAergici, primo tra tutti lo stiripentolo, siano particolarmente efficaci nel trattamento di questa sindrome, lasciando supporre che un recupero della funzione dei recettori del GABA possa essere importante ai fini della risoluzione dei sintomi (Chiron, 2011).

L'importanza della neurotrasmissione GABAergica nelle patologie che, come nel caso della sindrome di Dravet, sono caratterizzate da forti alterazioni del neurosviluppo è data soprattutto dallo stretto legame esistente tra la funzione della neurotrasmissione inibitoria e la neurogenesi nei suoi stadi precoci (REF).

È dimostrato infatti che alcuni switch molecolari, come ad esempio una espressione differenziale delle subunità alpha del recettore GABAA e l'espressione tempo-dipendente di alcuni trasportatori del cloro (NKCC1 e KCC2), determinano un cambiamento delle risposte elettrofisiologiche del recettore GABAA, evento cruciale per la maturazione dell'intero sistema nervoso (Pallotto and Deprez 2014).

Nonostante queste evidenze siano solide, il loro significato fisiopatologico nella sindrome di Dravet è ancora parzialmente sconosciuto e di certo una migliore conoscenza delle alterazioni funzionali e molecolari che caratterizzano il recettore GABAA in questa sindrome potrebbe essere risolutiva ai fini dell'identificazione di nuovi bersagli farmacologici e strategie terapeutiche.

Allo stato attuale della conoscenza, infatti, il trattamento è basato prevalentemente sul controllo dei sintomi legati alle frequenti crisi epilettiche e non sempre questa strategia permette un efficace recupero delle funzioni cognitive superiori, soprattutto a causa della forte farmacoresistenza che caratterizza questi pazienti (Sinoo et al., 2018).

La prospettiva di questa ricerca mira alla migliore comprensione dei meccanismi fisiopatologici di base che contribuiscono all'alterazione del neurosviluppo nella sindrome di Dravet e ad individuare nuovi bersagli terapeutici che qualora corretti farmacologicamente possano non solo contribuire alla risoluzione dei sintomi, ma anche determinare un migliore sviluppo dell'intero sistema nervoso

Il presente studio mira a studiare la funzione GABAergica nei tessuti di pazienti affetti da sindrome di Dravet per identificare alterazioni patologiche correlabili ad un ritardo della maturazione della neurotrasmissione.

Precedenti studi condotti sia dal gruppo del laboratorio di Elettrofisiologia che da altri autori (Ben Ari et al., 2012) hanno descritto come nel corso dello sviluppo il recettore GABAA subisca una progressiva maturazione per raggiungere nell'età adulta la sua funzione più nota, ovvero quella di principale agente della neurotrasmissione inibitoria nel sistema nervoso adulto.

Durante la neurogenesi però la trasmissione GABAergica possiede, nelle fasi più precoci, una funzione “parzialmente depolarizzante” che sembra essere di fondamentale importanza per la corretta maturazione del sistema nervoso e per le fasi iniziali della sinaptogenesi (Kaila et al., 2014).

Questa progressione nello sviluppo della neurotrasmissione GABAergica sembra non giungere a compimento in diverse patologie del neurosviluppo, nelle quali si riscontrano diverse caratteristiche legate alla funzione elettrofisiologica del recettore GABAA che rimangono simili a quelle tipiche di un cervello immaturo.

La ricerca si basa sulla possibilità di identificare le caratteristiche elettrofisiologiche e molecolari che determinano l'alterazione del recettore GABAA nelle patologie del neurosviluppo, in modo da poter successivamente intervenire su di esse tramite farmaci che siano mirati a fare il loro effetto sui recettori “immaturi”. Questo potrebbe non solo curare i sintomi e migliorare la situazione di “farmcoresistenza” dei pazienti, ma anche favorire un migliore neurosviluppo.

Risultati incoraggianti a questo proposito sono già stati ottenuti su modelli animali, nei quali si è osservato che una correzione precoce di alcune alterazioni a carico della neurotrasmissione inibitoria determina outcome migliori nel lungo termine per quanto riguarda l'esecuzione di task cognitivi.

Se la conoscenza dettagliata della fisiologia del neurosviluppo portasse a prospettive simili anche nell'uomo si potrebbero aprire nuove strade per il trattamento di questi pazienti.

Lo scopo di questo progetto è stato quello di:

1. Caratterizzare le correnti GABAergiche in tessuti di pazienti con sindrome di Dravet e confrontarli con tessuti di pazienti non epilettici di età paragonabile. Verrà analizzata l'ampiezza di corrente, il suo decadimento, l'affinità per il neurotrasmettitore e la sensibilità a vari modulatori dell'attività di recettori GABAA extrasinaptici al fine di comprendere se la trasmissione inibitoria tonica possa essere alterata in questi pazienti.
2. Misurare il potenziale di inversione del GABA (EGABA) in pazienti Dravet e confrontarla con quello ottenuto in tessuto di pazienti non epilettici al fine di comprendere se un'alterata omeostasi del cloro possa essere uno dei meccanismi alla base dell'insorgenza delle crisi epilettiche in questi pazienti.
3. Analizzare l'espressione dei trasportatori del cloro NKCC1 e KCC2 nei tessuti di pazienti Dravet, qualora trovassimo valori di EGABA anomali. Questa parte del progetto sarà svolta in collaborazione con la Dr.ssa Eleonora Aronica del Dipartimento di Neuropatologia dell'Università di Amsterdam.
4. Testare sia farmaci usati per pazienti con epilessia farmaco-resistente (da soli o in associazione) sia il cannabidiolo, nuovo composto derivato della cannabis al fine di indagare i loro possibili effetti nella modulazione del recettore GABAA nel tessuto di pazienti con sindrome di Dravet.

La tecnica del microtrapianto di membrane umane in oociti di *Xenopus* permette lo studio delle proprietà elettrofisiologiche del recettore GABAA in tessuti umani con patologie rare e di poterli confrontare con tessuti di controllo.

Con questo progetto ci si prefigge in primis di studiare la trasmissione GABAergica in pazienti con sindrome di Dravet, in modo da individuare ulteriori meccanismi alla base della ridotta efficacia inibitoria nel cervello di questi pazienti. In particolare ci si aspetta di ottenere:

- Una caratterizzazione elettrofisiologica delle correnti GABAergiche di pazienti con sindrome di Dravet in modo da valutare la natura più o meno inibitoria del GABA in questi tessuti.
- Una comparazione dei valori di EGABA con quelli trovati nei pazienti di controllo che possa aiutare ad comprendere, almeno in parte, uno dei meccanismi alla base dell'insorgenza delle crisi epilettiche in pazienti affetti da questa patologia.
- Un'analisi approfondita dell'espressione dei trasportatori del cloro NKCC1 e KCC2 nei tessuti Dravet. Qualora fosse confermata la nostra ipotesi di un'alterata funzionalità dei due trasportatori in questi pazienti, ciò aprirebbe la strada a cure farmacologiche che prevedano il ripristino di NKCC1 e KCC2 alle loro condizioni fisiologiche.
- Una chiara evidenza degli effetti di farmaci che abbiano effetto sul potenziamento della trasmissione GABAergica e che siano in grado di agire sulle configurazioni recettoriali di maggiore rilevanza fisiopatologica nelle epilessie farmaco-resistenti come punto di partenza per nuovi approcci terapeutici.

L'innovazione in questo tipo di approccio sta nella possibilità di studiare recettori funzionali estrapolati direttamente da tessuti di pazienti affetti da sindrome di Dravet. Ciò è di solito di difficile attuazione in patologie come questa nelle quali non esistono significative quantità di tessuto che possono essere usate a fini di ricerca. Normalmente infatti eseguire studi

elettrofisiologici su questi tessuti risulta tecnicamente difficile se non impossibile a causa della scarsità di interventi chirurgici che vengono eseguiti su pazienti affetti da encefalopatie, nelle quali non è possibile individuare con esattezza un focus epilettogeno da sottoporre a resezione.

La tecnica del microtrapianto invece permette l'uso di tessuti autoptici e ciò consente sia di superare la limitazione di cui sopra, sia di utilizzare tessuti di pazienti neurologicamente sani come controllo.

Ciò ha permesso di ottenere informazioni sul ruolo dei recettori GABAA nella sindrome di Dravet e inoltre di studiare direttamente su questi ultimi l'effetto di molecole che possano migliorarne la funzione.

Questo step è di importanza fondamentale affinché i risultati ottenuti fino ad ora su modelli animali possano essere traslati nella pratica clinica.

I tessuti muscolari di pazienti affetti da sindrome di Dravet sono stati prelevati ad Amsterdam, AMC tramite la banca del tessuto cerebrale dell'università di Amsterdam (UVA) e la collaborazione con la Neurobiobank (NIH). Tutti i tessuti sono stati utilizzati secondo quanto previsto dalla Dichiarazione di Helsinki e inoltre il comitato etico medico dell'AMC ha approvato tutte le procedure.

Sono stati inclusi tre pazienti affetti da sindrome di Dravet, due pazienti TSC usati come controllo patologico e tre controlli neurologicamente sani (Tabella 1).

P#	Age	Gender	Duration of epilepsy	Brain region	Type of seizures	Diagnosis/mut/cause of death	AEDs	PM
#1	8	M	7	T	FIAS/GS	Dravet (SCN1A mut; c.4834G>A p.Val1612Thr heart failure	CLB, STP	24
#2	49	M	48	T	FIAS/GS	Dravet (SCN1A mut; c.5164A>G p.Thr1722Ala heart failure	CLB, STP,VPA	20
#3	46	F	44	T	FIAS/GS	Dravet (SCN1A mut; c.677C > A p.Thr226Lys bronchopneumonia	CLB, STP,VPA	<48
#4	2	M	1.5	T	IS	TSC c.4645C>T myocardial infarction	TPM, LTG, CLB	24
#5	47	M	35	T	FAS	TSC c.4909_4911delAAG myocardial infarction	PHB, VPA, CBZ, CLB	24
#6	7	M	-	T	-	intestinal ischemia		24
#7	61	M	-	T	-	myocardial infarction		20

#8	38	M	-	T	-	myocardial infarction	16
----	----	---	---	---	---	-----------------------	----

**Tabella 1.** Pazienti inclusi nello studio. T, temporal; IS, infantile spasms; FAS, focal aware seizure; FIAS, focal impaired awareness seizure; GS, generalized seizures; mut, mutations, PM, post-mortem hours. CBZ, carbamazepine; CLB, clobazam; LTG, lamotrigine; PHB, phenobarbital; STP, stiripentol; TPM, topiramate; VPA, valproic acid.

Preparazione dell'RNA e Real Time Polymerase Chain Reaction(RT-PCR).

Per l'isolamento del DNA il materiale congelato è stato omogenizzato nel reagente di lisi "Qiazol" (Qiagen, Benelux, Venlo, Olanda). L'RNA totale è stato isolato usando il minikit miRNeasy (Qiagen, Benelux). La concentrazione e la purezza dell'RNA sono state determinate usando uno spettrofotometro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware). Il controllo di qualità dell'RNA è stato condotto attraverso un bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California) e un numero RIN superiore a 6, comparabile tra controlli e casi patologici, è stato considerato come un indicatore di RNA di buona qualità. Sebbene i tessuti siano autoptici non si è osservata una correlazione tra il PMI (tempo post-mortem) e i risultati della PCR.

Elettrofisiologia

Preparazione di membrane:

Le membrane sono state preparate come descritto precedentemente (Palma E, et al. 2011). Circa 0.1-0.5 gr di tessuto congelato è stato omogeneizzato in 2 ml di buffer di glicina usando un omogenizzatore Ultra Turrex (Ika, Germania). Il filtrato è stato centrifugato per 15 min a 9500 g con una centrifuga Beckmann (rotore C1015) e il super raccolto centrifugato per due ore a 100.000 g usando una centrifuga TL100 a 4 °C. Il pellet, dopo essere stato lavato e risospeso in buffer di glicina (5 mM), è stato usato direttamente oppure conservato a -80 °C fino all'uso.

Registrazioni voltage-clamp:

Dopo 24 ore dall'iniezione citoplasmatica di membrane sono state registrate negli ovociti le correnti totali con la tecnica del voltage-clamp intracellulare con due elettrodi (3 M KCl) come descritto precedentemente (Palma et al., 2011).

I risultati degli esperimenti sopra elencati hanno portato alla migliore comprensione di come il recettore GABAA partecipi alla fisiopatologia della sindrome di Dravet. In particolare è stato dimostrato che:

- Le correnti evocate dal GABA hanno un potenziale di inversione meno iperpolarizzato nei tessuti Dravet rispetto ai controlli. Questo risultato è in linea con precedenti studi che hanno individuato ritardi nella maturazione della funzione GABAergica in altre sindromi dello sviluppo (Ruffolo et al., 2016; Talos et al., 2011)
- Questo squilibrio della trasmissione GABAergica è accompagnato da un'espressione differenziale dei trasportatori del cloro NKCC1 e KCC2, anche loro soggetti ad un'espressione tempo-regolata in funzione dei diversi stadi dello sviluppo. Inoltre abbiamo osservato una minore colocalizzazione di KCC2 con la subunità alpha1 del GABAR all'immunoistochimica.
- È presente una riduzione dell'affinità per il GABA nei campioni Dravet, associata ad un'alterazione dell'espressione delle principali subunità alpha. In particolare si riporta una minore espressione della alpha1 accompagnata da una maggiore espressione della alpha2 e alpha 4. Questi dati consolidano la teoria dell'immaturità cerebrale" e ben si correla con precedenti studi che hanno individuato uno switch nel rapporto alpha1/alpha4 in patologie epilettiche (Mazuferi et al., 2010).

Le patologie del neurosviluppo costituiscono un importante problema economico e sociale (REF) e risultano spesso di difficile gestione dal punto di vista clinico. Ciò che rende queste sindromi così

complicate è la coesistenza in questi pazienti di diverse condizioni difficilmente controllabili. Nella sindrome di Dravet, ad esempio, coesistono un'epilessia estremamente farmaco-resistente e dei disturbi cognitivi che rendono complicata la vita quotidiana dei pazienti.

Inoltre, la maggioranza delle strategie terapeutiche disponibili allo stato attuale delle conoscenze non mirano a correggere la causa della patologia ma a sedare i sintomi che, come detto precedentemente, non è sempre possibile.

La ricerca qui proposta mira a ottenere una conoscenza più completa dei meccanismi di base che sottendono alla patogenesi della sindrome di Dravet, per poter quindi aprire la strada a nuove strategie terapeutiche che prendano di mira non solo i sintomi ma anche le vere e proprie cause che li determinano.

Una strategia terapeutica simile potrebbe avere come prospettiva degli approcci farmacologici volti alla normalizzazione precoce dello sviluppo cerebrale e quindi alla prevenzione di tutte le sequele che accompagnano un neurosviluppo patologico.

## **Laboratorio di Endocrinologia Cardiovascolare**

### ***Ruolo del Recettore Mineralcorticoide (MR) nella malattia multiorgano: dai modelli preclinici ai determinanti di outcome cardiometabolico***

E' noto che la terapia con antagonisti di MR riduce la mortalità in pazienti affetti da scompenso cardiaco. Il ruolo di MR è stato ampiamente descritto, non solo nel mantenimento dell'omeostasi elettrolitica ma anche nella regolazione del metabolismo glucidico e del tessuto adiposo. In particolare, studi effettuati nel nostro laboratorio hanno mostrato che in topi sottoposti a dieta obesogena, il trattamento con antagonisti di MR protegge dall'incremento ponderale, in particolare dall'espansione del tessuto adiposo, e dall'intolleranza ai carboidrati. Tali effetti sono in parte legati all'aumentata conversione del tessuto adiposo bianco in tessuto adiposo bruno, un fenomeno noto come "browning" del tessuto adiposo. Inoltre è noto che l'antagonismo di MR riduce lo stress ossidativo a livello tissutale, la fibrosi e l'infiammazione vascolare. Esistono tuttavia dati preliminari che lasciano ipotizzare un'azione specifica degli antagonisti di MR sulla funzionalità del tessuto muscolare scheletrico e del macrofago. Per questi motivi, le azioni sistemiche degli antagonisti MR non possono essere spiegate solo dai ben noti effetti renali (induzione della natriuresi con risparmio di potassio) ma devono essere interpretate alla luce della comprensione del ruolo di MR a livello di diversi organi e tessuti (tessuto adiposo, vaso, cellule immunitarie, tessuto muscolare scheletrico). L'industria farmaceutica si sta orientando a sviluppare composti che siano selettivi per specifici tessuti e organi che presentino minori effetti renali, al fine di ottenere risultati mirati in termini di outcome cardiovascolare e metabolico. E' importante premettere che il recettore mineralcorticoide è attivato in modo specifico sia dall'aldosterone che dai glucocorticoidi, e che molte delle azioni biologiche legate all'attivazione di MR possono essere mediate anche dall'attivazione del recettore glucocorticoide, che presenta una struttura molecolare simile a MR.

Sulla base di studi effettuati anche da altri gruppi di ricerca, è stato proposto che il processo di conversione del tessuto adiposo bianco in bruno possa contrastare lo sviluppo di obesità e di ridotta tolleranza al glucosio.

Considerando che il muscolo scheletrico rappresenta un tessuto con una rilevante captazione di glucosio regolata da insulina, disfunzioni che alterano questo processo possono svolgere un ruolo chiave nello sviluppo di insulino-resistenza a diabete di tipo 2. I benefici metabolici osservati in modelli preclinici di obesità a seguito di trattamento con antagonisti di MR potrebbero essere mediati non solo da modificazioni metaboliche nel tessuto adiposo ma anche dal

blocco/modulazione dell'attività di MR nel muscolo scheletrico. Inoltre, nessuno studio finora pubblicato ha analizzato, in modelli preclinici di obesità, se la modulazione di MR possa modificare il grado di infiammazione e la captazione muscolare di glucosio. E' noto che il macrofago riveste un ruolo fondamentale nello sviluppo di infiammazione che contribuisce all'instaurarsi dell'insulino-resistenza. Non è noto se il blocco dell'attività di MR espresso nel macrofago possa modificare le proprietà infiammatorie dei macrofagi residenti nel tessuto scheletrico (e nel tessuto adiposo).

Allo scopo di colmare questo gap di conoscenza ci si propone di studiare l'attività di MR nel muscolo scheletrico e descrivendo gli effetti del blocco farmacologico di MR in termini di peso corporeo, abbondanza di tessuto adiposo bianco e bruno, tolleranza al glucosio in topi "wild-type" (WT) sottoposti per 3 mesi a dieta obesogena (HFD) contenete l'antagonista di MR Spironolattone. Inoltre viene analizzata l'espressione di MR nel muscolo scheletrico, la capacità di MR di regolare meccanismi molecolari, gli effetti metabolici del trattamento farmacologico con Spironolattone nel muscolo scheletrico relativamente alla captazione di glucosio.

Allo scopo di verificare se il blocco di MR espresso nel macrofago possa modificare le proprietà infiammatorie dei macrofagi residenti nel tessuto scheletrico e nel tessuto adiposo, in topi KO per MR macrofagico, sottoposti a dieta normale (ND) e a dieta HFD, si intende analizzare il profilo metabolico analogamente a quanto previsto per i topi WT trattati con Spironolattone. Nei topi KO per MR macrofagico si intende studiare se l'assenza di MR nel macrofago è in grado di modificare il fenotipo infiammatorio di queste cellule con conseguente modificazione dello stato infiammatorio del tessuto muscolare e del tessuto adiposo.

L'aterosclerosi è una patologia infiammatoria a carico dei vasi arteriosi e si sviluppa a seguito della disfunzione endoteliale che promuove infiammazione vascolare. Elevati livelli circolanti di Aldosterone, ligando di MR, sono associati con aumentato rischio di sviluppare aterosclerosi, mentre il trattamento con antagonisti di MR porta ad una diminuzione di eventi cardiovascolari.

L'attivazione di MR espresso dalle cellule vascolari può svolgere un ruolo importante nel promuovere la disfunzione vascolare e l'aterosclerosi. In topi KO per ApoE, che sviluppano rapidamente aterosclerosi in presenza di Aldosterone e di un'opportuna dieta aterogena trattati con l'antagonista combinato di MR e del Recettore Glucocorticoide (GR) CORT118335, si intende analizzare la formazione di placche aterosclerotiche e il loro contenuto in lipidi e macrofagi. Il trattamento nei topi ApoE KO con CORT118335 può fornire indicazioni sull'impatto relativo di entrambi i recettori nello sviluppo dell'aterosclerosi.

Tali analisi permettono di comprendere se i benefici metabolici osservati in modelli preclinici di obesità a seguito di trattamento con antagonisti di MR, possano essere mediati non solo da modificazioni metaboliche nel tessuto adiposo ma anche dal blocco/modulazione dell'attività di MR nel muscolo scheletrico.

Inoltre le analisi effettuate nei topi KO per MR macrofagico consentono di capire se gli effetti metabolici osservati nei topi WT, trattati con Spironolattone, si possano attribuire allo specifico blocco di MR espresso nel macrofago.

Infine le analisi della formazione delle placche aterosclerotiche e del loro contenuto in lipidi e cellule macrofagiche in topi ApoE KO e trattati con l'antagonista combinato di MR e del Recettore Glucocorticoide (GR) CORT118335, consentiranno di comprendere l'eventuale contributo anche del blocco funzionale di GR, oltre che di MR, nel ridurre la formazione di placche aterosclerotiche, analizzando quindi le potenzialità anti-aterogeniche del composto CORT118335.

Lo studio potrebbe chiarire aspetti fondamentali nel trattamento della sindrome metabolica, attraverso l'antagonismo farmacologico di MR. In particolare:

1. il trattamento con l'antagonista di MR al livello del muscolo scheletrico potrebbe diminuire il grado di infiammazione e conseguentemente migliorare l'attivazione del segnale

insulinico, riducendo gli effetti deleteri della dieta obesogena (HFD) sul metabolismo del muscolo scheletrico;

2. l'assenza di espressione di MR nel macrofago potrebbe ridurre le proprietà infiammatorie, con conseguente riduzione del grado di infiammazione cronica di tessuti come muscolo scheletrico e tessuto adiposo che, in condizioni di obesità, risultano marcatamente infiltrati da macrofagi;
3. l'antagonismo farmacologico combinato, in grado di inibire l'attività di MR e GR, potrebbe ridurre la formazione di placche aterosclerotiche e adiuvarne il fisiologico interplay tra adipocita, macrofago muscolo scheletrico e vaso, determinando una globale riduzione del rischio cardiovascolare in condizioni che favoriscono la malattia coronarica.

Per effettuare lo studio è stato necessario somministrare ai topi i composti specifici (CORT118335-antagonista misto MR/GR, Spironolattone-antagonista MR, Mifepristone- antagonista GR) insieme al cibo, per questo motivo, dopo aver ottenuto i farmaci dalle ditte produttrici, abbiamo dovuto inviarli in polvere presso la ditta Brogarden che è specializzata per questo tipo di procedura. Tale processo ha richiesto quattro mesi per la sua realizzazione.

Nello studio si utilizzano topi maschi WT sottoposti a dieta obesogena (HFD) e trattati in parallelo con l'antagonista di MR Spironolattone, con l'antagonista GR mifepristone e con l'antagonista misto MR/GR CORT 118335). Sono stati inclusi anche due gruppi sperimentali di controllo costituiti da topi sottoposti a dieta normale (ND) e topi sottoposti a HFD. Su tali gruppi di animali si effettuerà un test di tolleranza al glucosio tramite iniezione intraperitoneale di glucosio e successiva misura dei livelli di glucosio circolanti. Si impiegano real-time PCR (utilizzando Mx3000P light cycler, Stratagene) e analisi di western blot per valutare l'espressione di geni e proteine coinvolti nel "signaling" molecolare regolato da MR, nei processi infiammatori e nella biogenesi mitocondriale, nel tessuto muscolare dei suddetti gruppi di topi. Vengono impiegate inoltre tecniche di immunohistochimica e si analizza la morfologia del tessuto (presenza di grasso ectopico) e la localizzazione di specifiche proteine.

Inoltre topi sia maschi che femmine knock out per MR macrofagico (e rispettivi controlli con il gene MR macrofagico non deletato) sono stati sottoposti a dieta HFD e dieta normale (ND). Analogamente ai topi WT trattati con Spironolattone, tali topi knock out sono esaminati tramite test di tolleranza al glucosio e tramite analisi di real-time PCR, western blot e immunohistochimica per studiare il "pathway" molecolare attivato dal recettore insulinico, l'espressione di marcatori infiammatori e la biogenesi mitocondriale, sia nel muscolo scheletrico che nel tessuto adiposo.

L'analisi citofluorimetrica dei macrofagi infiltranti i tessuti può inoltre dare indicazioni sulle proprietà infiammatorie di queste cellule in presenza e assenza di MR nelle cellule stesse.

Infine topi maschi knock out per ApoE sono stati trattati per 1 mese con dieta aterogena (gruppo sperimentale di controllo) e con dieta aterogena contenente CORT118335 (gruppo sperimentale CORT118335). Entrambi i gruppi di animali sono stati infusi con Aldosterone, tramite minipompa osmotica (modello Alzet 1004) inserita sottocute. Dopo tale trattamento i topi sono sacrificati e sono dissecati cuore e aorta e successivamente inclusi in un'appropriata resina (optimal cutting compound, OCT) e congelati in ghiaccio secco. Il cuore e l'aorta inclusi in OCT e congelati vengono quindi tagliati in sezioni di 10 µm utilizzando il criostato e tali sezioni saranno analizzate tramite "Oil Red O staining" per valutare l'ampiezza delle placche e il loro contenuto di lipidi. In aggiunta, le sezioni di cuore e aorta sono analizzate tramite colorazione con Picrosirius Red e colorazione con anticorpo specifico anti Mac3 per valutare nelle placche il contenuto di collagene e l'infiltrato macrofagico.

Solo recentemente sono state messe a punto le concentrazioni ideali di farmaco da combinare con il cibo al fine di ottenere la formulazione adatta di cibo supplementato con diversi farmaci che si utilizzano durante questo studio. I topi sono esposti al cibo speciale per quattro settimane al

termine delle quali sono sottoposti ad analisi della pressione arteriosa tramite "tail cuff", della tolleranza al glucosio e all'insulina.

Studi recenti hanno evidenziato il coinvolgimento di MR in varie patologie e il trattamento con antagonisti di MR risulta essere una strategia efficace già approvata nello scompenso cardiaco. E' sempre più urgente la necessità di identificare nuovi "pathways" dell'MR e quindi individuare nuovi "target" terapeutici, proponendosi come obiettivo la comprensione dei processi che determinano l'insorgenza di malattie cardiovascolari e comorbidità ad esse associate. Questo studio permetterà di comprendere il ruolo specifico dell'attivazione del recettore mineralcorticoide e glucocorticoide o della combinazione dei due, a livello di più tessuti, nel determinare il danno d'organo nelle malattie cardiovascolari e nelle loro complicanze metaboliche. Il successo di questo studio consiste nel fornire nuove opzioni terapeutiche per questo tipo di patologie.

## **Laboratorio di Neurofisiologia Sperimentale**

### ***Analisi morfologica ed elettrofisiologica degli effetti neurodegenerativi dell'applicazione di alpha-sinucleina su colture neuronale animali e iPSCs umane***

La Malattia di Parkinson (MP) è una delle principali malattie neurodegenerative, caratterizzata bradicinesia, rigidità, tremore a riposo. Le caratteristiche neuropatologiche sono la progressiva perdita di neuroni dopaminergici nella Substantia Nigra pars compacta (SNc) e la presenza di inclusioni multiproteiche immunoreattive alla alpha-sinucleina ( $\alpha$ -syn) denominati corpi di Lewy (LB) (Spillantini et al., Nature 1997).

Un problema irrisolto rimane la valutazione delle prime alterazioni sinaptiche (early) che possono intervenire sui neuroni nigrostriatali e che probabilmente sono causate dall'accumulo di  $\alpha$ -syn. Per ottenere una migliore comprensione della sequenza patogenica di eventi che si verificano nella MP familiare e sporadica, un certo numero di modelli di roditori è stato sviluppato negli anni passati. Purtroppo, la maggior parte dei modelli genetici in topi non presenta un fenotipo morfologico e comportamentale evidente (Dawson et al., Neuron 2010). Il gruppo della Dr.ssa Grazie Spillantini ha sviluppato un modello transgenico overesprimente  $\alpha$ -syn nella SNc di topo utile per valutare aspetti specifici della patogenesi della malattia (Tofaris et al., J Neurosci 2006). Recentemente il nostro gruppo ha studiato in vitro su fettine corticostriatali di topi  $\alpha$ -syn le alterazioni specifiche della plasticità sinaptica striatale in diversi sottotipi neuronali nelle fasi iniziali della malattia (Tozzi et al., Biol Psychiatry 2015).

Nonostante la MP sia considerata un disordine sporadico, esistono sempre maggiori evidenze del link tra la MP e diverse alterazioni genetiche (Obeso et al., 2017). Nell'ultimo decennio, oltre all' $\alpha$ -syn, anche il gene LRRK2 ha attirato l'interesse della comunità scientifica perchè associato alle forme di Parkinson Late-Onset autosomiche dominanti. Mutazioni del gene LRRK2 sono presenti fino al 13% di MP familiare 1-2% di quelli sporadici (Berg et al., Brain 2005).

E' di notevole interesse che sia la proteina  $\alpha$ -syn che l'attività LRRK2 siano implicate nella regolazione delle attività sinaptiche a livello delle spine dendritiche alterati nella MP, e potrebbero quindi rappresentare agenti molecolari target di possibili nuovi approcci terapeutici per la malattia.

E' stato ampiamente dimostrato che l'accumulo di  $\alpha$ -syn in vitro ed in vivo può portare ad alterazioni neurone specifico della plasticità sinaptica corticostriatale nelle fasi iniziali di malattia.

In questo studio ci si propone di comprendere a livello cellulare, mediante l'uso di diverse linee neuronali in coltura, i meccanismi molecolari, elettrofisiologici e morfologici alla base delle alterazioni causate da accumulo di  $\alpha$ -syn o dalla manipolazione del gene LRRK2. Il progetto è diviso

in due parti: uno studio su neuroni dopaminergici in colture immortalizzate e colture primarie di topo; e uno studio mediante cellule staminali pluripotenti indotte iPSCs da pazienti Parkinsoniani (Reinhardt et al., Plos-One 2013, Cell Stem Cell 2013).

Gli obiettivi del seguente progetto sono:

- 6) Studio delle alterazioni morfologiche e sinaptiche indotte dall'applicazione in vitro di  $\alpha$ -syn, nelle diverse forme di aggregazione, monomeriche, oligomeri e protofibrille, su colture neuronali dopaminergiche immortalizzate e primarie.
- 7) Analisi elettrofisiologica e morfologica di colture primarie dopaminergiche di topi controllo e overesprimenti  $\alpha$ -syn mediante applicazione a vari dosaggi di differenti forme di  $\alpha$ -syn.
- 8) Studio delle alterazioni morfologiche ed elettrofisiologiche di neuroni in colture primarie di topi mutanti per LRRKs.
- 9) Studio elettrofisiologico di neuroni iPSCs derivanti da pazienti MP con e senza mutazioni LRRKs
- 10) Misurazioni della concentrazione di dopamina, prima e dopo l'incubazione con  $\alpha$ -syn, sia su colture primarie dopaminergiche che in iPSCs con diverse mutazioni LRRKs.

Si intende effettuare:

- 6) Messa a punto colture neuronali stabilizzate e primarie di topo
- 7) Analisi morfologica di base
- 8) Analisi elettrofisiologica di base mediante registrazioni Patch-clamp whole cell (proprietà di firing, attività sinaptica, analisi canali NMDA/AMPA,  $Ca^{2+}$  e  $Na^{+}$  dipendenti) in colture dopaminergiche con e senza diverse concentrazioni di  $\alpha$ -syn.
- 9) Analisi elettrofisiologica neuroni dopaminergici con mutazioni LRRKs e interazioni con  $\alpha$ -syn.
- 10) Analisi morfologica dei neuroni iPSC da pazienti MP con mutazioni LRRKs

Sono state messe a punto le colture neuronali primarie di topo.

L'obiettivo principale di questa prima parte del progetto è stato mettere a punto un metodo ottimale per l'allestimento di colture neuronali primarie partendo da tessuto cerebrale mesencefalico di embrioni di topi CD1, in collaborazione con il Laboratorio presso l'IBCN-CNR "A. Buzzati-Traverso", Monterotondo (Roma) (n° protocollo 446/2015PR). In questa prima fase sperimentale ci si è occupati soprattutto di individuare i giusti time-points per ottenere le condizioni ideali per condurre gli studi elettrofisiologici e morfologici prefissati nelle colture primarie mesencefaliche. Nuovi accorgimenti, per migliorare le metodologie utilizzate, sono stati adottati durante la sperimentazione.

I Fase – Accoppiamento

Sono state predisposte due gabbie di accoppiamento (per ciascuna un maschio e due femmine), ad intervallo quindicinale. Per il corretto calcolo dei giorni embrionali, abbiamo scelto di lasciare in accoppiamento i topi, per circa 12 ore (dalla sera alla mattina successiva), trascorse le quali le femmine sono state separate dal maschio. Al 10° giorno dall'accoppiamento, tramite palpazione ed osservazione, sono state individuate le femmine gravide. La mattina successiva all'accoppiamento è stata definita come E0 (giorno embrionale 0). Al momento della palpazione i giorni embrionali saranno E10; mentre per il prelievo degli embrioni si dovrà attendere E13.

II Fase – Protocollo dissezione di tessuto embrionale mesencefalico

Ad E13 gli embrioni, sono stati sottoposti al prelievo del mesencefalo, che è stato successivamente conservato in soluzione HBSS (Invitrogen, 24020-091, Gibco 24020; due campioni per falcon da 15ml).

III Fase – Protocollo per la Preparazione di Cellule primarie mesencefaliche attraverso digestione enzimatica

- Aspirato l'HBSS i mesencefali sono stati incubati in una soluzione enzimatica (Cystein 2mg, DMEM 10ml, CaCl<sub>2</sub> 100mM, EDTA 50mM, Papain e DNAsi 100x), per 15-20 minuti a 37°C all'interno di un incubatore (5% di CO<sub>2</sub>).
- Successivamente, è stata effettuata la dissociazione tissutale meccanica, ed in seguito è stato prelevato il surnatante, eliminando quindi il tessuto non dissociato. Sono stati quindi centrifugati i campioni per 5 minuti a 200rpm.
- Dopo aver aspirato la soluzione enzimatica, è stata aggiunta una soluzione inattivante (Albumin 25mg, Trypsin-Inhibitor 25mg, FCS-Medium al 10% e DNAsi 100x), dissociato ulteriormente il pellet e lasciato riposare per 15-20 minuti a 37°C (5% di CO<sub>2</sub>) in un incubatore e successivamente centrifugato nuovamente per 5 minuti a 200rpm.
- A questo punto, la soluzione inattivante è stata aspirata e i pellet sono stati risospesi in una soluzione di lavaggio (DMEM, FBS al 10% e DNAsi). Anche in questo caso il pellet è stato dissociato e centrifugato per 5 minuti a 200rpm.
- Aspirata la soluzione di lavaggio, sono stati aggiunti 2ml di mezzo DMEM/F12, (contenente Glutamax 1x, Pen/Strep 1x, B27) per ogni falcon ed è stato nuovamente attuato il passaggio di dissociazione tissutale.
- I campioni cellulari, così ottenuti, sono stati piastrati su vetrini copri oggetto (12mm Ø) polilisinati (polilisinina 15µg/ml in H<sub>2</sub>O, lasciata a riposo per un'ora a 37°C) in una multiwell da 24. La piastra è stata quindi incubata a 37°C (5% di CO<sub>2</sub>) all'interno di un incubatore.
- Il mezzo cellulare DMF12 è stato cambiato il giorno dopo e ogni due giorni per 14 giorni.

#### IV Fase – Osservazione Colture Cellulari

Al 7°, al 10° e al 14° giorno delle colture cellulari, sono state osservate le cellule al microscopio (Olympus IX2-SLP, obiettivo 20x) per verificare la confluenza cellulare. In questa fase è stata valutata la variabilità di crescita cellulare in base al numero di cellule che è stato piastrato, in modo da scegliere i vetrini con una confluenza cellulare adatta per gli esperimenti di elettrofisiologia e di morfologia. Durante le prime osservazioni, però, alcuni di essi sono risultati più confluenti rispetto ad altri, abbiamo quindi deciso di suddividere tutti i campioni in due gruppi (vetrini con colture più confluenti vs. vetrini meno confluenti).

#### V Fase – Esperimenti di Elettrofisiologia

Per effettuare le prime analisi elettrofisiologiche sono stati scelti diversi time-points per la loro valutazione a 7, 10 e 14 giorni. Per ogni singola coltura neuronale le procedure sono state le stesse: il vetrino copri oggetto, su cui erano stati piastrati i neuroni, è stato rapidamente rimosso dalla multiwell e posto nella cameretta di registrazione, costantemente perfuso con liquido cerebrospinale sintetico (ACSF) e mantenuto a 32-34°C. L'elettrodo di registrazione è stato riempito con una soluzione intracellulare (120 K $\mu$ -gluconate, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 EGTA, 10 HEPES, 0.3 Na-GTP, and 2 Mg-ATP portato a pH 7.3 con KOH). Per le prove di registrazione di patch-clamp whole cell è stato utilizzato l'amplificatore Multiclamp 700B. Tutti i campioni osservati di entrambi i gruppi (vetrini con colture più confluenti vs. vetrini meno confluenti), sin dal 7° giorno in coltura, si sono rivelati essere troppo confluenti per completare una registrazione di patch-clamp. Si è osservata una diffusa morte cellulare ed una mancata maturazione neuronale, completa e diffusa, molto probabilmente dovuta all'eccessiva confluenza. Erano, infatti, presenti agglomerati di cellule indifferenziate pluristratificate. Ogni tentativo di registrazione è stato vanificato dall'instabilità dell'ancoraggio dei neuroni al substrato e dallo stato di salute stessa delle cellule. Si è quindi deciso di ridurre il numero di cellule piastrate. Questa attività sperimentale iniziale, anche se non ha prodotto per le ragioni addotte, risultati concreti, ci ha permesso di testare protocolli e parametri di registrazione.

#### VI Fase – Esperimenti di Morfologia

Le cellule in coltura, piastrate su vetrini copri oggetto, sono state fissate con una soluzione di Paraformaldeide al 4% a diversi time-points (7°, 10° e 14° di coltura) e sono stati incubati con i diversi anticorpi primari ed in seguito con gli opportuni anticorpi secondari, mentre i nuclei sono stati contromarcati con DAPI. Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: TUJ1 (class III- $\beta$ -tubulin), Dcx (Doublecortin), e Map2 che rappresentano specifici marker neuronali. Inoltre, per discriminare la popolazione neuronale che caratterizzava le colture primarie allestite sono state effettuate immunofluorescenze con i seguenti anticorpi: tirosina idrossilasi (TH) (neuroni dopaminergici), GAD67 (neuroni GABAergici), Chat (interneuroni Cholinergici), vGLUT (neuroni Glutammatergici), TPH e/o SERT (neuroni Serotoninergici) (Hu et al., 2015). Queste valutazioni morfologiche di marcatori neuronali e neurotrasmettitoriali sono state effettuate per capire e analizzare meglio gli esperimenti di elettrofisiologia condotti di pari passo ed agli stessi time-points; inoltre forniranno informazioni utili per le fasi successive del progetto mediante incubazione dei neuroni con  $\alpha$ -syn in forma monomeric, oligomeric e protofibrillare, per valutare i meccanismi molecolari e sinaptici sottostanti il danno causato da questa proteina. Ultimata questa prima fase di messa a punto delle condizioni ottimali sia per le registrazioni elettrofisiologiche di neuroni mesencefalici in coltura che per l'analisi, si passerà alla applicazione in vitro di diverse forme conformazionali di proteina  $\alpha$ -syn per studiare le proprietà elettrofisiologiche dei neuroni in assenza e presenza di danno neurodegenerativo causato dalla proteina misfolded. L'analisi elettrofisiologica sarà accompagnata da una dettagliata analisi morfologica che aiuterà a capire come e dove il danno da accumulo di  $\alpha$  syn andrà a concentrarsi.

## **Laboratorio di Immunopatologia Sinaptica**

### ***Studio dei meccanismi molecolari e cellulari alla base della sinaptopatia infiammatoria in modelli sperimentali di Sclerosi Multipla (SM)***

La Sclerosi Multipla (SM) è una malattia neurodegenerativa demielinizzante del sistema nervoso centrale (SNC), che causa disabilità neurologica, più comunemente nel giovane adulto. Per molti anni è stata considerata una malattia infiammatoria della sostanza bianca; tuttavia un numero crescente di studi ha dimostrato anche un coinvolgimento della sostanza grigia. A tal proposito, grazie all'utilizzo di un valido modello animale sperimentale di SM, l'Encefalomyelite autoimmune sperimentale (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, EAE), è stato dimostrato che le citochine pro-infiammatorie inducono danno tissutale e deficit neurologici alterando la trasmissione sinaptica, indipendentemente dal danno alla sostanza bianca. In particolare, è stata riscontrata una sinaptopatia o danno/disfunzione nel compartimento sinaptico a carico del sistema eccitatorio ed inibitorio in diverse aree del cervello EAE. Il prolungato aumento di glutammato nel SNC, accompagnato da un abbassamento del tono inibitorio mediato da GABA, costituiscono un alto rischio di danno eccitotossico, probabile causa della patologia neuronale nella SM (Mandolesi et al., 2015; Henstridge et al., 2016).

L'obiettivo principale della ricerca è quello di studiare i meccanismi molecolari e cellulari alla base dell'interazione tra sistema immunitario e nervoso nella patologia della Sclerosi Multipla. In particolare l'interesse è rivolto allo studio della sinaptopatia infiammatoria poiché, come la demielinizzazione, è un processo precoce e potenzialmente reversibile. La caratterizzazione dei meccanismi molecolari e cellulari alla base di tale meccanismo patogenetico, potrebbe permettere di individuare nuovi target molecolari per le attuali e future strategie terapeutiche (incluso l'esercizio fisico) ed eventualmente di identificare nuovi biomarcatori della malattia.

Tale ricerca viene condotta utilizzando un approccio multidisciplinare che comprende l'utilizzo di tecniche di elettrofisiologia, biologia molecolare, biochimica, immunoistochimica, e analisi

comportamentale. Inoltre si utilizzano modelli animali di SM, quali l'encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE) e il modello Cuprizone, e modelli chimerici ex vivo di SM. Gli obiettivi che ci si prefigge di raggiungere sono i seguenti:

- Obiettivo 1: approfondire il ruolo di fattori solubili rilasciati dalle cellule immunitarie (linfociti, microglia), quali citochine, fattori neurotrofici e microRNA, nella sinaptopatia infiammatoria e nella plasticità sinaptica in modelli murini di SM e tramite i modelli chimerici ex vivo di SM. L'ipotesi è che tali fattori solubili, alterati nel cervello di topi EAE e/o circolanti nel liquido cerebrospinale dei pazienti SM, potrebbero svolgere un ruolo diretto nella comunicazione tra sistema immunitario e sistema nervoso, e quindi avere un ruolo determinante nei meccanismi sinaptotossici e neurodegenerativi.
- Obiettivo 2: la sinaptopatia infiammatoria è attualmente oggetto di studio per poter spiegare l'effetto neuroprotettivo di alcuni farmaci immunomodulanti/immunosoppressori, che passando la blood-brain barrier (BBB), potrebbero svolgere un ruolo diretto nel SNC. Obiettivo della ricerca è quello di verificare se assi regolatori (es. IL1 $\beta$ -miR142-3p-GLAST) coinvolti nella sinaptopatia infiammatoria della SM/EAE, costituiscano un bersaglio molecolare per le terapie farmacologiche attualmente in uso o per quelle future.
- Obiettivo 3: La sinaptopatia infiammatoria e gli assi regolatori coinvolti sono oggetto di studio nei modelli murini di SM per verificare un loro potenziale coinvolgimento a livello comportamentale, andando a studiare deficit cognitivi o comportamenti simil-ansiosi e – depressivi. Circa metà dei pazienti affetti da SM soffre di disturbi d'ansia e depressione, ma scarsa attenzione è stata rivolta a tali disturbi probabilmente a causa della limitata conoscenza dei meccanismi fisiopatologici che le determinano.
- Obiettivo 4: l'esercizio fisico è diventato una parte consolidata di molti programmi di riabilitazione SM. Studi clinici e preclinici indicano con forza l'effetto benefico delle terapie riabilitative per i pazienti con SM. Tuttavia, i meccanismi cellulari e molecolari alla base dell'effetto benefico dell'attività fisica nei pazienti affetti da SM non è stato ancora del tutto esplorato. Tramite l'utilizzo dei modelli murini di SM si studia l'effetto benefico dell'esercizio sulla sinaptopatia e processi di demielinizzazione in varie aree cerebrali.

Il raggiungimento degli obiettivi prefissati permetterà di identificare assi regolatori che non solo sono alla base della sinaptopatia infiammatoria nei modelli SM e nella SM ma che sono anche responsivi alle attuali terapie come quelle riabilitative o farmacologiche.

Tali ricerche getteranno quindi le basi per l'identificazione di nuovi target molecolari e biomarcatori della sinaptopatia infiammatoria nella patologia SM.

Materiali e metodi:

- A. Induzione dell'EAE cronico progressivo: l'induzione è condotta su topi femmine C57BL/6) di 7-9 settimane. I topi vengono anestetizzati ed immunizzati attraverso somministrazione sottocutanea della glicoproteina maggiore oligodendrocitaria (MOG)<sub>35-55</sub>.
- B. Modello Cuprizone: topi C57BL/6 di 8 settimane vengono trattati con mangime standard arricchito con cuprizone allo 0,2% (chelante del rame) oppure con mangime standard (gruppo placebo) ad libitum o per tre-sei settimane.
- C. Modello chimerico ex vivo di SM: linfociti T isolati da pazienti SM o liquido cerebrospinale prelevato per motivi diagnostici da pazienti SM viene incubato per circa due ore su fettine di cervello di topo per studiare l'effetto elettrofisiologico dei mediatori solubili rilasciati e potenzialmente sinaptotossici.
- D. Trattamenti in vivo: impianti di minipompe osmotiche Alzet a lento rilascio (fino a 4 settimane) o cannule per iniezioni acute vengono applicate su topi EAE e controlli per indurre il rilascio intracerebroventricolare di sostanze di interesse (Mandolesi et al., 2017).

La modulazione del miRNA è eventualmente effettuata anche tramite vettori lenitivrali che verranno iniettati in vivo nella regione di interesse.

- E. Elettrofisiologia: registrazioni elettrofisiologiche vengono effettuate su fettine di cervello di topo (Cervelletto, striato, ippocampo) o colture neuronali/organotipiche, tramite tecniche di patch clamp e field potential per studiare le correnti spontanee GABA-ergiche, glutamatergiche e per studiare fenomeni di plasticità sinaptica (LTP, LTD)(Mandolesi et al., 2017; Gentile et al., 2017; Nisticò et al., 2013).
- F. Immunoistochimica ed ibridazione in situ: fettine di cervello derivate da tessuto fissato o fresco vengono processate per effettuare esperimenti di immunofluorescenza (target specifici, marker infiammatori) o in situ (microRNA). Imaging confocale o tramite bright field viene eseguito per acquisizione ed analisi delle immagini (Mandolesi et al. 2013, 2017).
- G. Biologia molecolare: l'analisi quantitativa di micro-RNA circolanti in fluidi biologici o presenti nel tessuto nervoso o immunitario viene eseguita tramite la tecnica della Real TIME PCR (RT-PCR). Analogamente, si studia l'espressione dell'mRNA di marcatori di interesse nel tessuto nervoso di topi EAE trattati e non trattati tramite la tecnica della RT-PCR (Mandolesi et al., 2017).
- H. Biochimica: la quantificazione di molecole di interesse nel tessuto nervoso viene eseguita tramite la tecnica del WESTERN BLOT o ELISA. La quantificazione di molecole solubili nel liquido cerebrospinale di pazienti o rilasciati da cellule del sistema immunitario in coltura viene eseguita tramite LUMINEX o ELISA assay.
- I. Isolamento linfociti: linfociti T e B vengono isolati da milze di topi EAE o dal sangue di pazienti SM per effettuare studi di elettrofisiologia su fettine di cervello di topo (Mandolesi et al., 2013; 2017)
- J. Test comportamentali ed esercizio fisico: Open Field Test (OFT); Elevated Plus Maze (EPM); Light-Dark Test (LDT); Murble Burying; Tail Suspension Test (TST); Forced Swim Test (FST). Nest Building test; Rotarod performance test; Grip Strenght Test. Per stimolare l'esercizio, i topi vengono stabulati in delle gabbie speciali arricchite con una Running Wheel a cui gli animali hanno libero accesso. Vengono valutate quotidianamente le prestazioni motorie mediante un conta giri magnetico associato alle ruote (Haji et al., 2015; Gentile et al., 2017).

Sono state valutate le correlazioni tra i livelli di PDGF nel liquor di pazienti SM e parametrici clinici. Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF) è un fattore neurotrofico coinvolto in fenomeni di plasticità sinaptica e per questo potenziale effettore di eventi riparativi nel paziente SM. Da questo studio, condotto in collaborazione con l'Università degli Studi di Roma Tor Vergata, è emersa una correlazione positiva tra i livelli di PDGF nel liquor di pazienti SM e un prolungato periodo di assenza di ricadute (Stampanoni-Bassi et al., 2018a). Sono state poi valutate le correlazioni tra gli alti livelli di citochine infiammatorie contenute nel liquor di 250 pazienti SM e i diversi parametri clinici al momento della diagnosi. Questo studio ha determinato come alti livelli di IL-6 e IL-8 correlino positivamente con un peggior decorso di malattia e con una bassa risposta ai trattamenti farmacologici (Stampanoni-Bassi et al., 2018b).

Per quanto riguarda i risultati attesi per il 2019, si valutano correlazioni tra parametri clinici e altri fattori solubili (microRNA e citochine) nei pazienti SM (Rizzo et al., 2018).

E' stato studiato, in collaborazione con l'Università degli Studi di Roma Tor Vergata, l'effetto diretto del Laquinimod, un farmaco immunomodulante con potenziali effetti benefici in pazienti con SM, su eventi sinaptotossici e neurodegenerativi nel modello EAE. In particolare, tramite esperimenti in vivo ed ex vivo, si è osservato che il laquinimod ha un ruolo protettivo diretto sulla trasmissione glutamatergica eccitotossica del cervelletto di topi EAE. Tale effetto è mediato dalla modulazione

dell'espressione del trasportatore del glutammato GLT-1, che è in grado di compensare difetti di espressione e funzionamento dell'analogo trasportatore GLAST e quindi di riequilibrare l'omeostasi della trasmissione glutammatergica in EAE (Gentile et al., 2018). Esperimenti analoghi sono in corso nel modello EAE per studiare il ruolo neuroprotettivo sia del dimetilfumarato, farmaco di prima linea nella cura della SM, che di modulatori delle sfingosine 1-5 (es. Ozanimod) regolatori del sistema immunitario e del sistema nervoso in sperimentazione nelle terapie SM.

Per il 2019 ci si aspetta di rivelare un nuovo meccanismo d'azione del dimetilfumarato (DMF) che agisca sul pathway del miR142-3p con effetti sia a livello neuronale che immunitario. Per quanto riguarda gli esperimenti relativi ai modulatori della sfingosina 1-5, esperimenti preliminari suggeriscono un effetto benefico diretto a livello della trasmissione glutammatergica nello striato EAE.

Sono in corso esperimenti per mettere a punto test cognitivi come il 'Novel object recognition' da applicare nel modello EAE (Musella et al., 2018).

Per quanto riguarda gli studi sull'effetto benefico dell'esercizio fisico nel modello Cuprizone, sono in corso esperimenti per approfondire l'effetto protettivo dell'esercizio fisico sulla demielinizzazione a livello di morte degli oligodendrociti maturi, proliferazione e differenziamento dei precursori degli oligodendrociti. I risultati attesi per il 2019 saranno relativi all'identificazione di meccanismi molecolari e cellulari alla base dell'effetto benefico dell'esercizio nel modello Cuprizone.

Tra le sfide della ricerca sulla SM sta emergendo sempre più l'importanza di sviluppare strategie in grado sia di ripristinare la mielina o impedirne la perdita sia di bloccare la sinaptopatia. In questo contesto, studi derivanti dai modelli sperimentali di SM come l'EAE e il modello cuprizone, hanno permesso di indagare i meccanismi cellulari e molecolari alla base di questi importanti aspetti fisiopatologici e le potenzialità di diversi approcci terapeutici. Tra le strategie terapeutiche vi è la riabilitazione fisica che ha effetti benefici sul paziente con SM. Studi clinici e preclinici hanno infatti dimostrato il forte impatto dell'esercizio fisico sulla funzionalità e la struttura del SNC e sulla qualità della vita del paziente (Motl and Pilutti, 2012). Tuttavia i meccanismi alla base dei processi riabilitativi non sono ancora compresi e meritano di essere investigati in maniera più approfondita.

## **Laboratorio di Microbiologia delle patologie cronic-degenerative**

### ***Identificazione di marcatori molecolari come predittori di andamento clinico e di prognosi in pazienti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)***

La BPCO (nota in inglese come COPD, Chronic obstructive pulmonary disease) è attualmente la quarta causa di morte nel mondo e, secondo le stime dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità (OMS), sembra destinata a diventare la terza entro il 2030. Si tratta di una sindrome complessa dell'apparato respiratorio, caratterizzata da un'ostruzione irreversibile delle vie aeree, con molte componenti polmonari ed extra-polmonari di entità variabile a seconda della gravità. La malattia è generalmente progressiva ed è associata a uno stato infiammatorio cronico del tessuto polmonare che, attraverso un deleterio rimodellamento dei bronchi, provoca una consistente diminuzione della capacità respiratoria. Ad aggravare questo quadro clinico è la maggiore vulnerabilità verso infezioni respiratorie di origine virale, batterica o fungina che danno luogo a riacutizzazioni della malattia.

Anche se la predisposizione genetica sembra determinare l'insorgenza della patologia in alcuni individui, l'alta percentuale di pazienti affetti da BPCO chiaramente suggerisce che sono i fattori ambientali ad avere un ruolo preponderante. In alcuni casi la BPCO potrebbe definirsi una malattia occupazionale, dovuta all'esposizione a silice o cadmio presenti in polveri e sostanze chimiche,

oppure a vapori o fumi irritanti, all'interno dell'ambiente di lavoro. In altri casi, le cause possono ritrovarsi in ambito domestico e sono dovute ad inquinamento da combustibile. Tuttavia, il principale fattore di rischio continua ad essere di natura comportamentale, essendo rappresentato dal fumo di sigaretta, il quale, oltre ad accelerare ed accentuare il decadimento naturale della funzione respiratoria, è in grado di innescare ed alimentare diversi processi biologici alla base della patologia, ovvero l'infiammazione cronica e lo stress ossidativo/nitrosativo. Infatti, la capacità antiossidante nella BPCO è notevolmente ridotta a causa del fumo di sigaretta e delle riacutizzazioni, e lo stress ossidativo persiste anche molto tempo dopo aver smesso di fumare, a causa della continua produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'aumento dei livelli di ROS prodotte nelle vie aeree si riflette in un aumento dei markers di stress ossidativo nell'espettorato e nel sangue dei pazienti con BPCO. Inoltre, il fumo di sigaretta -così come altri composti nocivi per le vie respiratorie- conducono al rilascio da parte di cellule danneggiate o necrotiche di molecole endogene note come segnali di pericolo o allarmine (DAMPs, Damage-associated molecular patterns), in grado di innescare una risposta infiammatoria, con conseguente produzione di citochine ed altri mediatori infiammatori, tra cui le stesse ROS. Una delle allarmine più studiate è la proteina HMGB1, i cui livelli sono stati trovati aumentati anche in campioni biologici di pazienti con BPCO. Recentemente, la proteina perossiredossina 2 (PRDX2) è stata identificata come allarmina sensibile allo stress ossidativo (redox-sensibile) in condizioni infiammatorie, ma il suo ruolo nella BPCO non è ancora noto.

La principale ipotesi del progetto è che specifici processi biologici coinvolti nella patogenesi della BPCO, inclusi il processo infiammatorio e lo stress ossidativo/nitrosativo, possano indurre il rilascio di segnali di pericolo redox sensibili in fluidi biologici che potrebbero essere utili come biomarcatori della patologia.

Nonostante la semplicità nel fare una diagnosi di BPCO, che si basa sulla valutazione spirometrica della limitazione del flusso aereo, sulla presenza di tosse cronica e mancanza di respiro, la BPCO è una malattia molto eterogenea in termini di risposta alla terapia. Infatti, non tutti i pazienti rispondono a tutti i farmaci disponibili, probabilmente come conseguenza della presenza di diversi fenotipi di BPCO. Pertanto, la necessità di un trattamento personalizzato sta diventando una priorità per una gestione clinica appropriata e per evitare trattamenti inutili, i connessi rischi e lo spreco di risorse per i sistemi sanitari. Al giorno d'oggi, la classificazione dei pazienti con BPCO si basa principalmente sui "fenotipi clinici" risultanti dalla combinazione di parametri che hanno significato clinico (sintomi, esacerbazioni, la risposta al trattamento, il tasso di progressione della malattia o morte). È fondamentale poter raggruppare i pazienti in fenotipi, perché lo stesso sottogruppo/fenotipo dovrebbe mostrare una simile progressione della malattia e una paragonabile risposta ai trattamenti.

Partendo da ciò, si ritiene che esista l'esigenza di individuare nuovi biomarcatori affidabili e facili da misurare in grado di classificare meglio i pazienti BPCO in sottogruppi/fenotipi molecolari che abbiano un valore predittivo in termini di severità e di prognosi, in modo da poter determinare più facilmente la terapia appropriata e ottenere migliori risultati da un punto di vista clinico-assistenziale.

Quindi, attraverso lo studio di molecole facilmente identificabili e misurabili in biofluidi accessibili, come il sangue, si potrà andare alla ricerca di potenziali biomarcatori in grado di classificare i pazienti con BPCO in fenotipi così da poterne predire la progressione della malattia, le esacerbazioni e l'efficacia della riabilitazione.

Obiettivo della ricerca è l'identificazione di potenziali biomarcatori nella BPCO da correlare con parametri spirometrici, clinici e biochimici che indicano lo stato della patologia.

Nello specifico, gli obiettivi di tale ricerca sono:

- 1) Caratterizzazione di pathways infiammatori modulati dallo stato redox, in modelli di infiammazione in vitro e ex vivo.
- 2) Analisi di proteine sensibili allo stress ossidativo nel plasma di pazienti affetti da BPCO, in particolare allarmine redox-sensibili come PRDX1, PRDX2 e TXN1. Analisi dello stress nitrosativo mediante la misurazione del monossido di azoto (NO) e dei livelli di proteine nitrosilate.
- 3) Analisi in vitro del rilascio di allarmine in seguito a stimoli infiammatori o a stress ossidativo da parte di cellule epiteliali bronchiali primarie di pazienti affetti da BPCO.
- 4) Analisi microbiologica dell'espettorato di pazienti affetti da BPCO per identificare il microbiota di questi pazienti e stabilire una possibile correlazione tra i batteri/virus identificati e i potenziali biomarcatori studiati; isolamento delle specie batteriche per la valutazione della farmaco resistenza.

Colture cellulari, trattamenti/stimolazione.

Cellule epiteliali polmonari NCI H1299 e macrofagiche RAW 264.7, coltivate. Pre-adipociti 3T3 e mioblasti C2C12, coltivate in terreno DMEM al 10% di siero sono state differenziate rispettivamente in adipociti e miotubi. I trattamenti con GSH-C4 e NAC sono stati eseguiti alla concentrazione di 10 mM e con BSO 120  $\mu$ M.

Dosaggio del glutatione e dei ROS.

Il glutatione intracellulare è stato misurato mediante HPLC. I livelli di ROS sono stati misurati utilizzando un analogo della diclorofluoresceina mediante analisi spettrofluorimetrica.

Immunoblotting.

Lisati e sovranatanti cellulari sono stati analizzati in assenza o in presenza di DTT e NEM (N-ethylmaleimide) tramite SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa, incubata con anticorpi specifici. Le proteine di interesse sono state visualizzate mediante tecniche di chemiluminescenza.

Real Time PCR.

Dopo estrazione dell'RNA dalle cellule, è stata eseguita una RT-PCR utilizzando opportuni primer disegnati sulla sequenza dei geni di interesse. Per la Real Time PCR è stato utilizzato il metodo del colorante Fluorescente SYBER Green (IQTM SYBR Green Supermix-Biorad).

Dosaggio delle citochine.

Le citochine sono state analizzate nei sovranatanti cellulari tramite BioPlex (Biorad).

Macrofagi Umani

I macrofagi umani sono stati ottenuti tramite separazione e differenziamento dei PBMCs provenienti da donatori sani. Le cellule sono state coltivate in terreno RPMI-1640 al 10% di siero e stimulate con LPS alla concentrazione di 100 ng/mL.

Reclutamento pazienti e analisi microbiologica

Da 100 pazienti affetti da BPCO e ricoverati presso il reparto di Riabilitazione respiratoria dell'IRCSS San Raffaele Pisana (Roma, Italia), dopo aver firmato il consenso informato scritto, è stato prelevato un campione di espettorato.

Il materiale espettorato è stato fluidificato 1:1 (v/v) con ditiotreitolo, lasciando il campione per 60' a temperatura ambiente o, in alternativa, per 30' in termostato a 36-37°C. Poiché spesso nei pazienti BPCO la carica dei batteri Gram negativi può essere elevata, per facilitare la conta colonie e l'isolamento batterico, si è proceduto ad un'ulteriore diluizione del campione (1/100) prima della semina su terreno solido.

Per l'isolamento e l'identificazione dei microrganismi (aerobi/anaerobi facoltativi) sono state utilizzate, oltre, alle metodiche classiche di batteriologia (colturali, biochimiche, molecolari), anche la tecnica di spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF (matrix assisted laser

desorption/ionisation–time of flight mass spectrometry). La sensibilità agli antibiotici degli isolati batterici è stata effettuata, mediante la determinazione della M.I.C. (Minima Concentrazione Inibente) con metodo semiautomatico Vitek2 (Bio-Merieux) oppure tramite il metodo manuale Kirby-Bauer mediante tecnica di diffusione in agar su disco che permette di determinare qualitativamente la sensibilità o la resistenza dell'isolato.

Questi due anni di ricerca sono stati dedicati alla caratterizzazione dei pathways infiammatori modulati dallo stato redox in modelli in vitro, rappresentati da cellule epiteliali polmonari (NCI H1299) e cellule macrofagiche RAW 264.7, stimulate con LPS; adipociti 3T3-L1 e mioblasti C2C12, linee cellulari in grado di indurre autonomamente infiammazione; e in un modello ex vivo, rappresentato da macrofagi primari umani (ottenuti da donatori sani di sangue), stimolati con LPS. Inizialmente è stata verificata l'attivazione della risposta infiammatoria nelle linee cellulari epiteliale e macrofagica, a seguito della stimolazione con LPS, quindi negli adipociti e nei mioblasti; infine nei macrofagi primari umani, in termini di attivazione del pathway di NF- $\kappa$ B, successivamente produzione e secrezione di citochine infiammatorie e secrezione di allarmine. Inoltre, per analizzare il ruolo dello stato redox sui pathways infiammatori, sono stati seguiti due diversi approcci: il primo ha previsto l'utilizzo di molecole antiossidanti; il secondo, la deplezione di glutatione, principale antiossidante endogeno. Il trattamento con due diverse molecole antiossidanti (un derivato idrofobico del glutatione, GSH-C4 e il suo precursore n-acetilcisteina (NAC)) è stato in grado di revertire la risposta infiammatoria indotta da LPS sia nelle cellule epiteliali sia in quelle macrofagiche, con una maggiore efficacia dimostrata per la molecola GSH-C4. Quest'ultima è stata in grado anche di abbassare lo stato infiammatorio basale degli adipociti e dei mioblasti. La deplezione del glutatione endogeno sorprendentemente, non esacerbava invece la risposta infiammatoria, ma influenzava due diversi gruppi di geni: aumentava l'espressione di geni coinvolti nella risposta allo stress ossidativo e diminuiva quella di geni coinvolti nella risposta antivirale; in conseguenza di quest'ultimo effetto, la deplezione di GSH favoriva l'infezione da virus influenzale, mettendo in luce l'importante ruolo svolto da questa molecola nella difesa contro le infezioni virali.

In questo periodo inoltre, è stata effettuata l'analisi microbiologica dell'espettorato dei pazienti affetti da BPCO; dall'analisi di questi campioni è stato possibile isolare ed identificare i seguenti microrganismi Gram-positivi: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus haemolyticus*; *Corynebacterium striatum*; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; *Enterococcus malodoratus*; *Staphylococcus epidermidis*. Nell'ambito dei batteri Gram-negativi sono stati isolati ed identificati prevalentemente ceppi di *Acinetobacter baumannii*; *Enterobacter cloacae*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Moraxella catarrhalis*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Da tale analisi è emerso che i microrganismi più rappresentativi nell'espettorato sono *Candida albicans* e *Aspergillus*. Tra i batteri Gram-positivi, *Staphylococcus aureus* è stato il batterio maggiormente isolato, mentre tra i Gram-negativi ritroviamo *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter*. Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad antibiogramma allo scopo di evidenziare profili di antibiotico-resistenza. Da tale analisi è emerso che il 65% dei ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati risultano essere ceppi Meticillino Resistenti (MRSA). Dalla analisi di resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici è emerso che il 15% dei ceppi Gram-positivi testati risulta essere resistente a tale classe di antibiotici. Inoltre, nell'ambito dei Gram-positivi alcune specie isolate di Enterococchi (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*) presentavano una resistenza alla vancomicina nel 17% degli isolati.

Infine, per quanto riguarda i Gram-negativi, il 60% degli isolati presentava un fenotipo con produzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e di questi il 30% esprimeva resistenza ai carbapenemici.

Nel proseguimento del progetto, estenderemo lo studio ad un modello di cellule epiteliali bronchiali primarie di pazienti affetti da BPCO e quindi, andremo ad analizzare dei markers infiammatori e di stress ossidativo nel plasma di pazienti affetti da BPCO. Ci si aspetta di poter rilevare proteine redox-sensibili in fluidi biologici provenienti dai pazienti arruolati. L'idea è di poter stabilire una correlazione tra i livelli di una o più di queste molecole e diversi parametri che indicano lo stato della patologia, nonché una correlazione tra i livelli dei potenziali biomarcatori e i microrganismi identificati responsabili delle riacutizzazioni. In particolare, l'analisi dei campioni BPCO viene effettuata anche prima, durante e alla fine della riabilitazione in modo tale da poter ottenere informazioni correlabili con la risposta dei pazienti alla terapia riabilitativa. Quindi, in generale, si ritiene questo studio possa portare all'identificazione di nuovi biomarcatori con un elevato valore predittivo della severità e della progressione della patologia, nonché del numero e della severità delle riacutizzazioni, anche al fine di valutare l'efficacia di trattamenti farmaceutici e riabilitativi.