

#### ATTI Convegno Nazionale



## 20 Anni di attività scientifica

# Ricerche Bio-Mediche di Frontiera

**CNR** 

ROMA, 22-23 OTTOBRE 2015

© Editore VALMAR - Roma Stampa: Tipografia Montani Alessandro, www.tipografiamontani.it

Roma, ottobre 2015

ISBN 978-88-97987-10-9

Curatela: Giovanni Antonini e Pietro Ragni

Coordinamento: Consorzio Interuniversitario I.N.B.B.

Consulenza grafica: Andrea Fiorentini

Segreteria: Cristiana Citton



#### ATTI Convegno Nazionale



## 20 Anni di attività scientifica

## Ricerche Bio-Mediche di Frontiera

**CNR** 

ROMA, 22-23 OTTOBRE 2015

#### CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

#### Comitato Scientifico

Giovanni Antonini Oliana Carnevali Fabrizio Chiti Gennaro Esposito Damiano Gustavo Mita GiuseppePalleschi Pietro Ragni Aldo Roda Carlo Ventura

Organizzazione
Cristiana Citton
Deborah Di Lorenzo
Lucia Occhioni
Roberta Rossi

## **INDICE**

Pag. 9
Pag. 13
Pag. 19
ricerca <i>Pag. 23</i>
Pag. 33
ne e Salute Pag. 51
di malattie
Pag. 75
gia cellulare Pag. 87
degenerative Pag. 99
Pag. 111

# CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B. Programma

#### GIOVEDÌ 22 OTTOBRE

h. 10,00 Registrazione dei partecipanti

h. 10,30 Apertura dei Lavori

PROF. GIOVANNI ANTONINI – Presidente INBB ON. VALERIA BAGLIO – Presidente Assemblea Capitolina – Roma Capitale

h. 10,50 Cerimonia di premiazione

h. 11,00 – 13,00 Tavola Rotonda

"STRATEGIE PER LA RICERCA IN ITALIA: ANALISI E PROPOSTE"

Introduzione:

DOTT. PIETRO RAGNI – Direttore INBB

Partecipano:

PROF. LUIGI NICOLAIS – Presidente CNR

PROF. STEFANO FANTONI – Presidente ANVUR

DOTT. GIUSEPPE MARTINI – Pres. Cluster Tecn. Naz. "Scienze della Vita" PROF. GIUSEPPE NOVELLI – Rettore Università di Roma "Tor Vergata"

 $On.\ Massimiliano\ Smeriglio-Vice presidente\ Regione\ Lazio-Ass.\ Ricerca$ 

DOTT. SESTO VITICOLI – Vicepresidente AIRI

h. 13,00 Pausa Pranzo

h. 14,00 - 16,15

"Biosensori innovativi per l'Ambiente e la Salute"

Chairman: PROF. GIUSEPPE PALLESCHI – Univ. RM 2

PROF. GIOVANNI ANTONINI – Univ. RM 3

PROF. GIUSEPPE SPOTO – Univ. CT

"Plasmonica e nuove opportunità per la diagnostica precoce dei tumori"

PROF.SSA DANILA MOSCONE - Univ. RM 2

"Nuovi metodi di screening e nuovi biosensori nanomodificati per la diagnosi di malattie e la sicurezza alimentare ed ambientale"

DOTT.SSA ELISA MICHELINI – Univ. BO

"Biosensori cellulari bioluminescenti integrati in dispositivi mobili"

PROF.SSA GIOVANNA MARRAZZA – Univ. FI

"Sviluppo ed applicazioni dei biosensori nella diagnostica clinica: la strada da seguire"

PROF.SSA LUISA TORSI – Univ. BA

"Sensori bio-elettronici organici per rivelazioni ultra-sensibili"

PROF. GIOVANNI ANTONINI – Univ. RM 3

"MBS srl: uno spin-off di successo nato dalla ricerca universitaria"

#### h. 16,15 - 18,30

"Interferenti Endocrini: Ambiente, Alimentazione e Salute"

Chairman: PROF. OLIANA CARNEVALI – Univ. Pol. Marche

PROF. DAMIANO GUSTAVO MITA – Lab. Interferenti Endocrini INBB – NA

"La ricerca italiana nel campo degli Interferenti Endocrini"

PROF.SSA ADRIANA MAGGI - Univ. MI

"Animali reporter nella ricerca tossicologica"

PROF.SSA PAOLA PALANZA – Univ. PR

"Interferenti Endocrini e sviluppo neurocomportamentale e metabolico"

PROF. VITO DE PINTO - Univ. CT

"Tecnologie molecolari e tracciabilità del DNA per il controllo degli alimenti"

PROF.SSA ANGELA MONTANARI – Univ. MI

"Il Progetto LIFE Biocopacplus: un rivestimento ecosostenibile per l'imballaggio metallico per alimenti dalle bucce di pomodoro"

DOTT.SSA VERONICA CARTOCCI – Univ. RM 3

"L'altra faccia degli Interferenti Endocrini: l'effetto anti-colesterolemico di un flavonoide presente negli alimenti"

DOTT. MAURIZIO FORTE – Lab. EDS INBB – NA

"Interferenti Endocrini ed infertilità: risultati sperimentali su cellule endometriali umane"

#### h. 18,30 Chiusura dei lavori della giornata

#### VENERDÌ 23 OTTOBRE

h. 9.00 - 11.15

"Una ricerca italiana di successo nella terapia di malattie epatiche e metaboliche: acido obeticolico"

Chairman: PROF. ALDO RODA – Univ. BO PROF. ADOLFO ATTILI – Univ. RM 1

PROF. ALDO RODA - Univ. BO

"Dagli acidi biliari naturali a quelli semisintetici una sorprendente evoluzione della chimica e biologia molecolare"

PROF. ROBERTO PELLICCIARI - Univ. PG

"La scoperta dell'acido obeticolico. Storia e prospettive di un successo della ricerca italiana"

PROF. ANTONIO MOSCHETTA - Univ. BA

"Ruolo dell'asse entero epatico FXR-FGF19 nella prevenzione e cura delle malattie epatiche dalla colestasi all'epatocarcinoma"

PROF.SSA LINDA VIGNOZZI – Univ. FI

"Effetti di OCA su sindrome metabolica e NASH"

PROF. LUCIANO ADORINI – INTERCEPT SNC

"Acido Obeticolico nel trattamento di malattie epatiche croniche: nuove prospettive per la terapia di cirrosi biliare primitiva e NASH"

#### h. 11,15 - 13,30

"Medicina Rigenerativa: nuovi paradigmi in biologia cellulare"

*Chairman:* PROF. CARLO VENTURA – Univ. BO / Laboratorio SWITH "Medicina Rigenerativa: Un'opportunità per sfatare dogmi consolidati"

PROF. CARLO ALBERTO REDI – UNIV. PV / European Center for Law, Science and New Technologies

"Trasferimenti nucleari: cloni e medicina rigenerativa"

DOTT.SSA MARGHERITA MAIOLI – Univ. SS

"Nuove frontiere nella riprogrammazione cellulare: un nuovo approccio di medicina rigenerativa mediante la combinazione di stimoli fisici e chimici"

DOTT.SSA GABRIELLA MINCHIOTTI – IGB - CNR NA

"Regolazione extracellulare della pluripotenza in cellule staminali murine ed umane"

PROF. NAZZARENO GALIÈ – Univ. BO

"Ipertensione arteriosa polmonare: una sfida per la medicina rigenerativa"

PROF. UMBERTO GALDERISI – II Univ. NA

"Hints to improve the success rate of cellular therapy based on mesenchymal stromal cells (mscs): secretome of senescent mscs has a negative paracrine effect on healthy cells by reducing the stemness and promoting the senescence"

h. 13,30 Pausa Pranzo

h. 14,30 - 16,45

"Misfolding Proteico Amiloidosi e Malattie Neurodegenerative"

Chairman: PROF. GENNARO ESPOSITO – Univ. UD

PROF. VITTORIO BELLOTTI – Univ. PV

"Clues on the pathogenesis of systemic amyloidosis from biocompatible fibrillogenesis of globular proteins"

PROF. FABRIZIO CHITI – Univ. FI

"I determinanti strutturali e biologici della tossicità di oligomeri proteici misfolded"

DOTT.SSA VALERIA CRIPPA – Istituto Naz. Neurologico "C. Mondino" PV "Misfolding proteico e sistemi degradativi nella SLA: ruolo protettivo della small heat shock protein B8"

PROF. MICHELE VERDUSCOLO – Univ. Cambridge (UK)

"Principi fisico-chimici dell'omeostasi delle proteine e applicazioni per contrastare le malattie neurodegenerative"

DOTT.SSA ANNALISA RELINI – Univ. GE

"Microscopia a forza atomica di aggregati amiloidi"

h. 16,45 Chiusura del Convegno

# RELAZIONE INTRODUTTIVA DEL PRESIDENTE DEL CONSORZIO INBB

#### Giovanni Antonini

Presidente Consorzio Interuniversitario INBB; Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre

Il nostro Consorzio è nato nel '93, sull'onda del rinnovamento promosso dalla "Legge sull'Autonomia", partendo dalla considerazione che nei settori di riferimento da una parte vi era una scarsa massa critica, essendo materie molto innovative e con pochi docenti solo in alcune università italiane, ma dall'altra essi erano aree scientifiche che nel futuro si sarebbero sicuramente sviluppate in modo significativo. Si iniziò dunque ventidue anni fa con sette università consorziate ed un comitato ordinatore di venticinque docenti provenienti un po' da tutto il Paese. Poi nel 1995 si ottenne il riconoscimento giuridico da parte del MIUR; ecco perché il Convegno si intitola INBB 20A: quest'anno ricorre il ventesimo compleanno dell'INBB.

Nel tempo il numero delle università associate è cresciuto, attualmente sono ventitré e del pari è cresciuto il numero di aderenti che ha ora superato la soglia dei 630. Dopo una prima fase pioneristica ed incerta, il Consorzio nel 1999 trovò un'impostazione stabile con la presidenza del Prof. Gustavo Damiano Mita e la Direzione del Dott. Paolo Occhialini. Fino allo scorso febbraio '14 il loro impegno e quello di molti fra gli aderenti, ad iniziare dai colleghi del Consiglio Direttivo, ha permesso un'evoluzione costante e senza battute d'arresto dell'INBB sia da un punto di vista amministrativo-finanziario, sia, soprattutto, da un punto di vista scientifico.

E' nostra convinzione che la motivazione di fondo alla base dell'istituzione dei Consorzi Interuniversitari sia ancora valida e utile per il sistema della Ricerca del Paese: la necessità di reti di ricerca tematica consolidate e strutturate a livello nazionale, soprattutto per competere a livello europeo ed internazionale e per costituire masse critiche al di là delle mura del proprio ateneo, è una considerazione diffusa e riconosciuta tra gli addetti ai lavori ed anche a livello governativo, come sta a dimostrare la stessa costituzione, appena due anni, fa dei Cluster Tecnologici Nazionali. Non a caso mi fa piacere ricordare la frase che disse due anni fa in questa stessa occasione l'On. Tocci circa il ruolo pubblico dei Consorzi: "Piuttosto che ridurre o eliminare il contributo statale ai Consorzi Interuniversitari, oggi, se non esistessero, dovremmo inventarceli!". Anche la stessa CRUI, dopo anni di

tentennante valutazione circa i Consorzi, sulla base di una presunta sottrazione di risorse da essi operata, ne ha finalmente riconosciuto formalmente l'utilità per il sistema e noi continuiamo ad impegnarci perché questa esperienza continui a svilupparsi, non nascondendoci le difficoltà che incontriamo.

In questo biennio l'attuale gestione dell'INBB sta perseguendo, in linea con la precedente gestione, una serie di attività volte ad aiutare i colleghi ricercatori aderenti al Consorzio nella sempre più difficile ricerca e gestione di finanziamenti e a promuovere lo svolgimento di qualificate attività di ricerca nel nostro settore. E' quindi mio dovere e piacere ringraziare, oltre al Vice-presidente, prof. Roda, al Direttore dr. Ragni ed al personale amministrativo dell'INBB, i colleghi del Consiglio Direttivo e della Giunta ed i membri del Collegio Sindacale per il loro costante e qualificato supporto alle attività del Consorzio. La possibilità offerta dall'INBB di creare "reti" di ricerca è ovviamente la condizione preliminare per risultare sempre più competitivi nella partecipazione a bandi di ricerca italiani ed europei. In quest'ottica va sottolineato l'ottimo risultato ottenuto nella VOR 2004-2010 dell'ANVUR, in cui l'INBB è risultato fra i soli sei Consorzi Interuniversitari ad aver ottenuto un risultato positivo nell'indicatore IRFS1 (l'indicatore maggiormente rappresentativo, indicato dal MIUR come indice di valutazione ai fini del Bando Progetti Competitivi - FFO 2014). L'INBB ha già volontariamente aderito alla VQR 2011-2014, della quale sono state recentemente avviate le procedure. Siamo fiduciosi che, con contributo attivo di tutti coloro che hanno pubblicato come aderenti INBB, tale VQR sancirà nuovamente gli ottimi risultati scientifici ottenuti dai ricercatori aderenti all'INBB

Vorrei quindi evidenziare i punti in cui l'INNB ha recentemente ottenuto significativi miglioramenti, nell'interesse e con il contributo degli Atenei e dei colleghi aderenti.

1)Lo sviluppo di network tematici di ricerca condivisi fra più Unità Operative INBB e la creazione di sinergie operative. All'interno dell'INBB è stato elaborato un elenco non esaustivo di progettualità che vedono coinvolte più unità di ricerca del consorzio, in molti casi con collegamenti significativi con il mondo scientifico e produttivo. Esse sono state designate con il termine "Piattaforme" che, secondo la definizione del MIUR delle Piattaforme Tecnologiche, è da intendersi come: "Strutture Aggregative Organizzate" che riuniscono,

per il perseguimento di specifici obiettivi (in via prioritaria la rappresentanza degli interessi italiani in Europa), tutti gli operatori italiani: industriali, scientifici, e istituzionali. Le sei Piattaforme INBB già identificate lo scorso anno sono le seguenti:

- Biosensori innovativi per l'ambiente e la salute
- Ambiente e salute: interferenti endocrini e biorisanamento
- Medicina rigenerativa e cellule staminali
- Misfolding proteico e amiloidosi nelle malattie neurodegenerative
- Medicina di genere
- Oncologia traslazionale.

Sono stati organizzati nell'autunno 2014 workshop tematici relativi a tali piattaforme che hanno avuto una frequenza (anche di giovani) superiore alle aspettative (circa 200 partecipanti nelle tre sessioni organizzate presso il CNR a Roma) e che hanno permesso di stabilire o rafforzare contatti e collaborazioni scientifiche fra UdR INBB, ma anche con Ricercatori esterni all'INBB.

Sempre nell'ambito dello sviluppo di network, l'INBB ha partecipato al "North South Traineeship" Project promosso dall'Univ. di Roma Tor Vergata; il progetto è stato finanziato dal programma EU Erasmus+ e quattro studenti indicati da professori aderenti al Consorzio, dopo la selezione, hanno concluso il mese scorso la loro esperienza di tirocinio presso autorevoli università ed istituzioni di altri paesi Europei. Anche per questo anno accademico abbiamo vinto il bando per organizzare nuove traineeship nel 2016.

Per quanto riguarda le sinergie con altri Consorzi Interuniversitari o strutture cliniche allo scopo di ottimizzare le risorse tecnico-scientifiche ed amministrative e per poter accedere a maggiori finanziamenti che abbiano un contenuto di ricerca clinica o traslazionale. Rispetto al perseguimento di questo obiettivo con altri Consorzi, si deve registrare una difficoltà derivante dalla propensione di altri consorzi in campo clinico di continuare l'esperienza consortile in forma autonoma, specie in mancanza di indicazioni ministeriali (che erano state ipotizzate) a favore di accorpamenti, anche solo funzionali. Sul piano della collaborazione con strutture cliniche, il significativo Accordo di Partnership con la Fondazione Ettore Sansavini/Gruppo clinico Villa Maria, che coinvolge il team guidato dal Prof. Ventura e presidiato, per il Consorzio, dal dr. Occhialini, ha già avuto avvio e le potenzialità della

collaborazione stanno evidenziandosi con l'inizio della piena operatività dei nuovi laboratori di Lugo di Romagna.

- La ricerca di nuove iniziative di finanziamento (regionale, nazionale o comunitario) e l'organizzazione di una struttura dedicata al supporto delle iniziative di finanziamento, sopratutto in ambito comunitario, che si possa autofinanziare come fondo rotativo. Oltre l'invio di newsletter a tutti i membri INBB in cui vengono riportate le iniziative di finanziamento di cui siamo venuti a conoscenza, e' stata attivata la convenzione con una società (la AMIRES) che può aiutare l'INBB nella presentazione di programmi di ricerca in risposta a bandi comunitari (H2020 ed altri). I primi risultati di questa convenzione sono stati subito evidenti con il supporto che ha permesso al progetto "UltraPlacad", coordinato dall'INBB, di arrivare primo (su più di 450 candidati) con il massimo del punteggio (15/15) nel bando (Fase II) HORIZON 2020 Health, topic: Clinical validation of biomarkers and/or diagnostic medical devices. Un ringraziamento particolare al nostro Giuseppe Spoto di Catania, ideatore e coordinatore scientifico del progetto. Vorrei sottolineare che è la prima volta che l'INBB ha il compito di coordinare in Europa un progetto di questa dimensione sia organizzativa (13 soggetti appartenenti a 7 diversi paesi europei), sia finanziaria (più di 6 milioni di Euro).
- serie di 3)**La** messa a punto di บทล strumenti amministrativi/gestionali per aiutare i nostri aderenti nella gestione dei finanziamenti ottenuti e aiuto di tipo burocratico/amministrativo agli aderenti e alle Università consorziate. Abbiamo aderito all'obbligo della fatturazione elettronica ed allo split payment, essendo inseriti nella lista delle istituzioni del settore pubblico. Una delle più rilevanti che siano state svolte nell'anno scorso, con un sostegno assiduo a tutti i membri INBB che lo hanno richiesto, è stata quella relativa alla predisposizione di fac-simili di convenzioni utili verso Enti di Ricerca. Strutture Ospedaliere ed ASL, Enti no profit, etc.

Il Consorzio, per il secondo anno consecutivo senza alcun supporto istituzionale riesce, mantenendo la politica oculata di contenimento delle spese e sviluppando nuove linee progettuali, a chiudere il consuntivo 2014 con un leggero attivo. Il Valore della produzione mostra un trend favorevole: dal  $\in$  1.023.168 del 2012 si passò, nel 2013 a  $\in$  1.389.653 e nel 2014 si arriva a  $\in$  1.455.942. E' da sottolineare tale costante aumento

nell'ultimo triennio del volume economico delle attività del Consorzio pur in un periodo di generale riduzione dei finanziamenti pubblici alla ricerca e di minore disponibilità economica delle aziende per attività di ricerca e sviluppo:

Si devono anche sottolineare i significativi progressi realizzati su alcuni aspetti gestionali e di sviluppo, di seguito riportati. Su di essi la attuale gestione dell'INBB sta continuando ad operare in vista di una loro piena attuazione.

a) Rendicontazione delle partite stipendiali del personale universitario. Il problema è risolvibile ed è stato risolto in diversi casi, per esempio nel caso di progetti FP VII; tuttavia è emerso che non è possibile fare un esempio di accordo per la rendicontazione del personale universitario che possa andare bene a tutte le università, ma l'accordo va concordato con la singola università volta per volta. Già abbiamo l'esperienza maturata per gestire il progetto PON- Distretti della Sicilia con gli atenei di Catania e Messina e stiamo procedendo a formalizzare gli accordi necessari per il progetto Ultraplacad con Catania, Firenze e Parma.

#### b) Internazionalizzazione extra-europea.

E' stato fatto un accordo quadro con una società nazionale (CUBE labs) per il trasferimento tecnologico non solo in Italia, ma anche sui principali mercati esteri, ad iniziare da quello Cinese. Una iniziativa è già avviata ed altre tre attività di grande valore tecnologico di nostri aderenti sono state proposte per la valutazione ed hanno superato brillantemente il primo stadio.

#### c) Coordinamento locale delle UdR INBB

Due attività sono richieste soprattutto ai Direttori delle sezioni presenti nel Direttivo: a) la ricerca e l'accesso ai bandi regionali, importanti soprattutto (ma non solo) per le Regioni Obiettivo Convergenza; b) maggiore coinvolgimento dei membri delle UdR INBB locali. In questo ambito si potrebbero prevedere incontri presso le varie sedi fra gli stessi membri delle UdR locali a scopo di presentare a tutti i membri delle UdR locali le ricerche più significative (spesso, presi da mille incombenze, nemmeno si conoscono le ricerche del collega della porta accanto) e stimolare la presentazione congiunta con l'INBB di progetti di ricerca Regionali, Nazionali ed Europei. Questo è un argomento su cui dobbiamo sicuramente intervenire, con il conforto di tutti i colleghi

del CD durante i prossimi mesi, anche provando ad intercettare i vantaggi della nuova normativa nazionale.

#### d) Convenzioni ed Accreditamenti

Un impegno che abbiamo preso è quello di rendere operative le Convenzioni che l'INBB ha sottoscritto. Abbiamo iniziato dalla più prestigiosa, quella con il CNR, infatti lo scorso novembre si è tenuta la prima riunione del Comitato di Gestione CNR-INBB presieduta dalla Dott.ssa Minchiotti che è componente del nostro CD, su nomina del Presidente del CNR. Sono state indicate una serie di attività di confronto e di collaborazione

#### e) Contributo MIUR

Il decreto del MIUR per l'FFO 2013 non prevedeva alcun contributo per i Consorzi di Ricerca, esso invece era previsto nel decreto per il FFO 2014 per i soli Consorzi di Ricerca che avevano ottenuto una valutazione positiva nella scorsa VQR (come l'INBB). Nel decreto MIUR per l'FFO 2015 è di nuovo assente il contributo per i Consorzi di Ricerca che era invece previsto nelle bozze di decreto FFO 2015 che erano state inviate dal MIUR alla CRUI, al CUN, etc. La motivazione ufficiosamente addotta, ovvero il trasferimento dei fondi destinati ai Consorzi di Ricerca verso i fondi per le Scuole di Specializzazione di Medicina, è poco plausibile in quanto i due finanziamenti appartengono a budget di due differenti Ministeri (MIUR e Ministero della Salute). Allo scopo di rendere certa e meglio definita la politica verso i Consorzi di ricerca, è stato chiesto, dallo scorso anno, allo stesso MIUR ed alla CRUI la creazione di un tavolo tecnico di discussione e di proposta con i rappresentanti dei Consorzi stessi.

In conclusione, insieme al Vice-presidente prof. Roda, al Direttore dr. Ragni ed a tutto lo staff gestionale dell'INBB pensiamo di aver svolto al meglio delle nostre possibilità i compiti che ci sono stati assegnati e confidiamo che il nostro Consorzio Interuniversitario possa continuare a supportare al meglio delle sue possibilità la ricerca scientifica svolta dai nostri aderenti.

#### LA RETE NAZIONALE DEI CONSORZI INTERUNIVERSITARI DI RICERCA TEMATICA

#### Paolo Occhialini

già Direttore INBB 1999-2014 e membro del Coord. Naz. CIRT

I Consorzi Interuniversitari di Ricerca Tematica (CIRT), previsti dall'Art. 91 del DPR 11 luglio 1980, n. 382, svolgono un'azione importante di confronto costruttivo e coordinamento tra sistemi di ricerca, in particolare tra le Università consorziate, su aspetti che sono di particolare interesse per lo sviluppo della conoscenza, del trasferimento tecnologico ed in generale per lo sviluppo della competitività del Paese. Tale confronto non si esaurisce con attività che riguardano realtà italiane, ma si apre al contesto europeo ed internazionale.

La loro funzione istituzionale è consistita in questi decenni (per l'INBB: oramai 2 decenni, come per la grande maggioranza dei CIRT esistenti) nel:

- a) selezionare qualificate Unità affini di ricerca accademica per formare o solidificare specifiche filiere di ricerca interuniversitarie, anche con preminenti caratteri di interdisciplinarietà, e mettere a frutto l'organizzazione a rete per specifiche tematiche, al fine di valorizzare al meglio diverse competenze in un sistema interconnesso mirato essenzialmente alla formazioni di reti di eccellenza per promuovere la circolazione delle idee e delle conoscenze, mirate anche alla formazione di giovani;
- b) contenere al massimo i costi generali delle attività di ricerca di filiera, tramite un efficiente accentramento di funzioni amministrative e gestionali, in modo che tali costi vadano ad incidere percentualmente poco sui costi delle azioni intraprese;
- c) stabilire rapporti di collaborazione scientifica con Enti Pubblici di Ricerca, Enti Locali, enti esterni e/o con aziende su specifici obiettivi di ricerca, agendo con agilità e semplificazione amministrativa, in modo da cogliere ogni opportunità di collaborazione con il contesto esterno agli atenei;
- d) diversificare le modalità operative per perseguire, e magari ampliare, le funzioni istituzionali di ricerca scientifica, alta formazione e trasferimento tecnologico proprie degli atenei;
- e) aumentare le possibilità dei singoli atenei di acquisire commesse tramite un'azione di coordinamento di Unità di ricerca afferenti a

più atenei e quindi tramite una massa critica più significativa, cioè utilizzare al meglio, per la caratteristica "dell'interlocutore unico", la capacità di acquisire progetti di ampia portata, come quelli europei, basati, per la fase esecutiva, sul coinvolgimento di diverse strutture e numerosi ricercatori:

- f) incrementare il grado di internazionalizzazione delle attività di ricerca universitaria, sia in termini di rapporti con qualificate istituzioni straniere, sia in termini di partecipazione a reti internazionali di laboratori di ricerca e di alta formazione;
- g) contribuire con progetti qualificati, che coinvolgano, ove possibile, più sedi di ateneo, alla diffusione della cultura scientifica del nostro Paese, anche con iniziative nel sistema di istruzione superiore.

Inoltre la strada di costituire masse critiche sempre più ampie può costituire un auspicabile processo di sviluppo. I successi che alcuni Consorzi hanno ottenuto nell'accesso ai fondi europei del VI e VII PQ ed a quelli dell'attuale programmazione 2014-2020, con il programma Horizon 2020, ne sono una prova tangibile.

Tali azioni sono state possibili, seppur con modalità differenti e disomogenee tra i singoli Consorzi, anche grazie al contributo di funzionamento del MIUR, opportunamente mantenuto fino al 2012 all'interno del FFO del sistema universitario (anche se con risorse fortemente decrescenti, specialmente negli ultimi anni), che ha garantito il volano finanziario per la gestione e l'ampliamento delle attività dei Consorzi Interuniversitari. Purtroppo tale sostegno finanziario, corrispondente al riconoscimento ministeriale di un loro ruolo pubblico, ora, si è sostanzialmente interrotto, nonostante l'azione del Coordinamento nazionale dei CIRT e la valutazione positiva della CRUI nel ripristinarlo.

Il ruolo pubblico dei CIRT è sostanzialmente valutabile in base ai risultati di ricerca prodotti, in base ai servizi e alle attività comuni di cui possono avvalersi i ricercatori dei singoli atenei ed in base alla quantità di fondi gestiti dai Consorzi negli atenei, molto superiori a quanti ne ricevano dal MIUR (intesi appunto come contributo parziale ai costi fissi di funzionamento della struttura): basti pensare che nell'anno 2011 (data dell'ultimo censimento svolto e già di difficoltà del sistema universitario nel suo complesso), i CIRT presentavano:

- gestione di attività di ricerca per un totale di € 68.065.000,00;
- utilizzo di 85 unità di personale dipendente a tempo indeterminato;

 attivazione, presso gli atenei consorziati, di circa 1.200 contratti a tempo determinato o contratti a progetto di ricercatore o borse di dottorato, ecc. (per lo più di durata annuale o almeno superiore a sei mesi), anche con obiettivi di alta formazione di giovani ricercatori con scambi nazionali ed internazionali.

In altre parole, i CIRT pesavano molto limitatamente sull'erario pubblico, visto che il contributo del 2012 per il funzionamento dei consorzi, nel fondo del finanziamento ordinario (FFO) per l'università, corrispondeva a 3 milioni di euro, mentre i consorzi riuscivano ad attrarre fondi per ricerca (in buona parte da programmi europei e da privati) per oltre 20 volte maggiori, sostenendo centinaia di giovani ricercatori e decine di dipendenti.

Tutto ciò deve continuare su un terreno non di competizione con gli atenei, ma in un quadro di collaborazione e di complementarietà funzionale con essi, con maggiori possibilità di svolgere flessibilmente nuove funzioni e con un ampliamento delle opportunità nel mercato della ricerca pubblica e privata.

Anche in seguito ad interrogazioni parlamentari ed iniziative verso il MIUR, si sarebbe dovuto attivare un Tavolo Tecnico al MIUR sui CIRT, di cui l'INBB continua a richiedere l'istituzione affinché vengano analizzati ruolo, funzioni e criticità di tali consorzi, come peraltro programmato dallo stesso MIUR, in una risposta parlamentare del 2013. Proprio in tale occasione, il rappresentante del MIIUR tra l'altro indicava: "...potranno essere individuati i consorzi che risultano di primario interesse per gli atenei, mentre la valutazione sulla qualità della ricerca svolta dall'ANVUR fornirà dati utili per individuare i consorzi che hanno ottenuto risultati che i singoli atenei, attraverso le loro strutture dipartimentali, non sarebbero stati in grado di raggiungere individualmente."

Con queste considerazioni alla base, l'INBB ha svolto in passato ed intende continuare a svolgere un ruolo attivo nell'ambito del Coordinamento nazionale dei CIRT affinché:

- venga indicato e formalizzato definitivamente il ruolo pubblico dei CIRT nel prossimo Piano nazionale della Ricerca o in altri documenti ministeriali:
- sia nuovamente riconosciuto un sostegno del MIUR ai CIRT, in un'ottica di programmazione triennale, come un possibile bando competitivo per il triennio 2016-2018, per garantire il contributo alle

spese di funzionamento dei Consorzi Interuniversitari, nonché i più adeguati criteri per l'allocazione delle risorse,

• siano individuati gli strumenti finalizzati alla maggiore integrazione e sinergia tra Atenei e CIRT e alla attivazione formale da parte del MIUR, a partire dal prossimo anno, della procedura, (elaborata ed avanzata dai Consorzi anni fa, e già meritevolmente attivata dall'ANVUR), di riconoscimento ufficiale del valore delle risorse finanziarie gestite dai Consorzi presso gli atenei, in modo che questi ultimi possano aggiungere, alla propria somma di risorse attratte dall'esterno, le somme certificate dei Consorzi di ricerca, non risultando in questo modo penalizzati dai criteri per l'allocazione delle risorse del FFO.

#### L'ITALIA GUARDA AL FUTURO: NON VI È FUTURO SENZA RICERCA

#### Pietro Ragni

Direttore Consorzio Interuniversitario I.N.B.B.; Istituto di Metodologie Chimiche - CNR

#### Università e Ricerca Pubblica depotenziate e mortificate

Alla fine degli anni Ottanta il ministro Ruberti operò con energia per organizzare il sistema ricerca e sviluppo -R&S- meglio collegando fra loro gli attori delle tre reti della ricerca (Università, enti pubblici di ricerca -EPR- e ricerca privata) e, dopo un ampio dibattito parlamentare, riuscì a far approvare la costituzione del Ministero per l'Università e la Ricerca Scientifica e Tecnologica (168/89). Egli così accelerò il processo iniziato con la 568/87 e concluso con la 171/91 per il riconoscimento di una vera specificità della rete di ricerca pubblica extra-universitaria. Il disegno nel nostro settore per la priva volta era chiaro: una governance sugli indirizzi e le priorità assicurata dal MURST; un ampia autonomia (si ricorda il riferimento all'art. 33 della Costituzione) di Università ed EPR: l'avvio di una politica coordinata di collegamento con le imprese, sancita dalla redazione del primo Piano Nazionale di Ricerca (PNR) e dalla costituzione del CNST, ampio organo di consulenza sulle politiche strategiche con esperti dei settori pubblico e privato ed una serie di interventi per colmare il divario Nord-Sud, fra i quali i Parchi Scientifici e l'aumento del numero di ricercatori.

Nell'ultimo ventennio un susseguirsi di scelte politiche dettate dall'ignavia o dall'incompetenza o semplicemente dal disinteresse hanno di fatto depotenziato e disarticolato l'Università ed il sistema ricerca nazionale, non riconoscendolo più come elemento strategico per il futuro del paese, a differenza di quanto avviene in tutti i paesi più avanzati. Lo stesso ministero ha subito vicende alterne nel collegamento con quello dell'Istruzione; la confusione è stata aumentata dalla realizzazione di "riforme" a ogni cambio di indirizzo politico (l'Università ha subito sia la "Moratti", con un cambiamento epocale degli ordinamenti degli studi, sia la "Gelmini" con il cambiamento della governance degli Atenei; il CNR ha subito quattro riforme in 15 anni). La Comunità scientifica ha perso la sua rappresentatività istituzionale, cancellati i Comitati del CNR ed il CNST; per la scelta degli organi di governo si è ricorso in più occasioni a commissariamenti e addirittura all'inedita figura dei vice-commissari con scelte discutibili da parte dei gruppi politici di volta in volta al potere.

L'incompetenza ed il disinteresse sono state in più occasioni supportate da prese di posizione miopi di settori importanti del sistema imprenditoriale, che tradizionalmente in Italia ha sempre contribuito meno agli investimenti in R&S rispetto a quelli dei paesi competitori. Essi hanno chiesto con insistenza ed ottenuto una serie di misure di supporto pubblico (forme di detassazione, incentivi alle assunzioni, programmi per la competitività industriale) non impegnandosi, al contempo, ad aumentare autonomamente i propri investimenti in R&S; ma anzi, in molti casi, usando i fondi pubblici come sostitutivi e non aggiuntivi rispetto al proprio impegno. Insomma siamo giunti ad una situazione in cui il ruolo della ricerca pubblica sembra progressivamente spengersi, mentre l'industria non riesce a rafforzarsi; tanto che vi è chi ha affermato: "si abbandona la ricerca che c'è (università ed EPR) e si finanzia la ricerca che non c'è". Il risultato sconfortante lo abbiamo sotto gli occhi. Riportiamo solo pochi dati<sup>1</sup>: nel periodo dal 2008 al 2014 la spesa per la ricerca pubblica è scesa in termini assoluti da 4,1 a 2,8 miliardi di Euro (il 31% in meno) ed in termini percentuali dallo 0,56 allo 0,34% sul totale della spesa statale. Mentre per l'istruzione universitaria la flessione è stata più contenuta: da 8,7 a 7,9 miliardi di Euro (il 9% circa in meno) ed in termini percentuali dal 1,19 allo 0,95% sul totale della spesa statale. Ciò è avvenuto mentre nello stesso periodo la spesa dello Stato è cresciuta di circa il 13%: da 731 a 825 miliardi. In particolare non si può non rilevare<sup>2</sup> come, per la spesa universitaria, l'Italia è ora penultima fra le nazioni Europee, poco sopra la Bulgaria per percentuale dedicata sul PIL. Al problema della diminuzione delle risorse, si aggiunge quello della frammentazione di responsabilità fra il MIUR, gli altri ministeri con enti di ricerca strumentali e, di più, fra governo centrale e Regioni, in virtù della 59/97 che, riformando il Titolo V della Costituzione, ha conferito alle Regioni una vasta gamma di funzioni relative alla ricerca e le relative risorse da assegnare. Questa situazione porta ad una confusione sulle linee prioritarie da seguire, a spese spesso incontrollate ed a volte ripetitive ed improduttive, ad una serie di ritardi rispetto alle programmazioni settennali europee che spesso ci hanno visto rendicontare all'ultimo giorno con notevoli perdite di risorse.

#### Una nuova consapevolezza

Il fisico premio Nobel nel '64 Charles Townes lucidamente scriveva pochi

.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Rendiconto della Ragioneria dello Stato presentato al Senato (XII/'14):

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Dati Eurostat 2014

anni fa: "I politici non supportano con sufficiente forza la scienza, perché essa non ripaga nell'immediato, ma solo molti anni dopo". Ciò non di meno, come già nel secolo scorso, l'innovazione generata dalla capacità propulsiva e pervasiva della ricerca resterà un fattore chiave per il progresso e la competitività delle società del XXI secolo. Per l'opinione pubblica tematiche quali la salute, l'ambiente, il cibo, l'energia, la mobilità, le comunicazioni, le abitazioni, la sicurezza sono le sfide aperte su cui concentrare l'attenzione per il presente ed il futuro. Occorre però rendere chiaro che, se è vero che su ciascuna di queste tematiche non si può costruire una previsione perfettamente attendibile sugli sviluppi e sulla disponibilità, è altresì certo che operando su di esse la ricerca può contribuire a costruire un futuro migliore; non comprenderlo o sottovalutarlo invece ci negherebbe qualunque futuro.

Alcune eccezioni fortunatamente ci sono state anche in questi anni: il sistema regionale di R&S in Emilia Romagna, che nel primo decennio del 2000 ha finanziato direttamente 650 imprese del territorio attraverso 750 contratti tutti in collaborazione con Università o EPR (riuscendo ad ottenere per due volte il riconoscimento di Regione più innovativa d'Europa); la creazione del network di incubatori per imprese innovative promossa dal Comune di Milano; i distretti tecnologici nei settori prioritari inaugurati in Campania nei primi anni 2000. Inoltre è da sottolineare come molti Atenei e Istituti, tantissimi docenti e ricercatori abbiano cercato di continuare il loro lavoro, ingegnandosi per trovare i fondi per l'acquisto e la manutenzione degli strumenti e per l'ingresso precario (in genere) di giovani ricercatori e riuscendo ad aumentare sia la produzione scientifica, sia il numero di proposte italiane nei vari Programmi EU ad iniziare dai Programmi Quadro e dal recente Horizon 2020.

Il problema dunque non risiede nelle capacità e nell'impegno dei ricercatori e docenti; citiamo da Nature "Of particular note is Italy, which shows a very high but broadly stable productivity per researcher" per commentare i risultati ottenuti dal nostro paese su indicatori quali: il numero di articoli ed il numero di citazioni per ricercatore e, soprattutto il rapporto fra numero di articoli e numero di citazioni rispetto al totale della spesa sostenuta in R&S. Questi ed altri dati lusinghieri sui ricercatori italiani pubblicati da riviste estere dovrebbero convincere le Istituzioni di governo ad investire

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Dati desunti dalla Comparazione della performance della ricerca UK con il resto del Mondo, su Nature 2014

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> J. Brown "The Italian Paradox" on CNRS Int. magazine

maggiormente ed in modo efficace sul sistema Ricerca del Paese e sui nostri giovani ricercatori.

Invece, da una parte i ricercatori nelle università e nei centri di ricerca ormai vivono in una condizione di solitudine (ed anche di prolungato precariato, nel caso dei più giovani), concentrati solo sullo specifico lavorativo; fra loro scollegati, senza alcun punto di riferimento o consapevolezza di far parte di un sistema di valori e di relazioni riconosciuto e considerato dal Paese: questa situazione è insostenibile. È urgente, come detto, un cambio drastico di approccio da parte delle Istituzioni e del sistema politico, al contempo vi deve essere una presa di coscienza forte ed una nuova volontà di intervenire per cambiare in meglio da parte della comunità scientifica, in modo da non perdere le occasioni di rilancio e dunque non confinare il nostro Paese in una situazione di progressiva arretratezza.

Nei pochi dibattiti su questi temi ed in base all'esperienza si può indicare che i percorsi per un rilancio della politica della ricerca in Italia dovrebbero articolarsi in uno spazio a tre dimensioni: puntare su settori che garantiscano per il Paese uno sviluppo produttivo sostenibile e attento alla qualità di vita dei cittadini; aumentare la partecipazione attiva delle nostre istituzioni alla costituzione dello spazio europeo della scienza e tecnologia; favorire il riequilibrio territoriale con un sostegno specifico ai settori ed alle regioni del Paese in condizioni di arretratezza.

#### Indicazioni per il cambiamento

Per prima cosa chiediamoci "cosa possiamo fare noi" per contribuire ad una nuova consapevolezza del mondo della ricerca pubblica ed all'inversione di tendenza rispetto al recente passato. Ovviamente continuare a fare buona ricerca, ovviamente continuare a concorrere al meglio ai Programmi europei, ovviamente continuare a collaborare fra le varie sedi per avere sufficiente massa critica nei settori di rifermento.

Nuovi Ricercatori. L'estrema difficoltà di accesso a posizioni stabili nell'università e negli enti di ricerca, l'ormai inevitabile condanna a permanere per lustri in condizioni di precariato, la modestia dei salari (sia rispetto agli altri paesi competitori, sia rispetto a figure simili nell'industria), il perdurare della disparità di genere e la lenta ed incerta progressione in carriera sono tutti significativi deterrenti per l'ingresso di nuovi ricercatori nel sistema della R&S pubblico. Risultato: età media dei ricercatori troppo alta ed in aumento, frustrazione e demotivazione. In

particolare, per l'università, come si riscontra nella tabella a seguire<sup>5</sup>, è drammatico il decremento dei docenti e dei ricercatori:

Ruolo	2007	2015	2018 (proiezione a legisl. attuale)
Prof. Ordinari	19865	13268 (-33%)	10718 (-46%)
Prof. Associati	19086	17552 (-8%)	16412 (-14%)
Ricercatori (con RTD)	23049	21049 (-9%)	19894 (-14%)
Totale	62000	51869 (-16%)	47024 (-24%)

Sappiamo bene che c'è chi ha in mente che il futuro dell'Italia non venga dalla ricerca scientifica e tecnologica, ma dal design o dalla moda o da altri pur importanti settori merceologici; ci auguriamo che questa opinione falsa (per quanto già detto) e pericolosa (perché tradisce il nostro futuro come Paese avanzato e ci fa perdere l'opportunità di riallinearci ai competitori) sia confutata dai fatti con rapidità. La risposta deve iniziare dal basso: stabilire procedure e criteri meritocratici e trasparenti per la selezione dei ricercatori, del gruppo dirigente e per le successive progressioni in carriera ed assegnazioni di responsabilità; introdurre sistemi premianti (p.es. l'aumentata percentuale di proprietà sui propri brevetti e sugli *spin-off*); individuare strumenti di incentivazione quali la possibilità di gestire i progetti di ricerca in autonomia; alimentare la crescita dei talenti con opportunità di formazione anche in laboratori stranieri. Poi ci dev'essere un impegno serio dello Stato a garantire il turn-over e a proporre periodicamente concorsi per nuovi ricercatori.

<u>Finanziamento della ricerca di base</u>. E' opinione generale tra i ricercatori che la ricerca di base è il fondamento della ricerca applicata o precompetitiva che sostiene lo sviluppo dei Paesi industralizzati attraverso la realizzazione di prodotti ad alto o altissimo valore aggiunto. La ricerca di base, ricerca quella ce nasce dalla curiosità individuale e dal desiderio di ampliare le conoscenze non ha un diretto riscontro applicativo nel brevemedio periodo ed è pertanto finanziata con fondi pubblici in tutti i Paesi

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Prof. Paolo Rossi , elaborazione su dati MIUR

industrializzati. Invece, in Italia negli ultimi due decenni si è assistito ad una progressiva, ma costante, riduzione di tutte le forme di finanziamento pubblico della ricerca di base. L'unica sopravvissuta verteva sui PRIN (Progetti di Interesse Nazionale) ed i FIRB (Fondo Investimenti in Ricerca di Base), che sono passati dai 292 M€ del 2004 ai 71 M€ del 2012 (ultimo anno in cui sono stati erogati), con una diminuzione del 76%. Per il 2013 e 2014 i fondi FIRB e PRIN sono stati sostituiti dai fondi SIR (*Scientific Independence of Young Researchers*), i cui vincitori sono stati resi pubblici solo a Giugno 2015 (Decreto Direttoriale 25 giugno 2015 n. 1350). Non bisogna inoltre trascurare la considerazione che, insieme ad una generale riduzione dei fondi per la ricerca, negli ultimi anni si è assistito ad un drammatico incremento delle difficoltà amministrative nell'utilizzo, da parte delle amministrazioni universitarie e degli EPR dei fondi a disposizione.

Informazione e divulgazione scientifica. È bene ricordare quanto espresso dalla Raccomandazione della Commissione del 2005: "i ricercatori dovrebbero assicurare che le loro attività di ricerca siano rese note alla società in senso lato, in modo tale che possano essere comprese dai non specialisti, migliorando in questo modo la comprensione delle questioni scientifiche da parte dei cittadini". Il problema dell'accettabilità sociale del lavoro della ricerca pubblica e privata è diventato strategico come anche quello di superare il vizio dell'autoreferenzialità. Tranne che per poche tematiche (sanità, energia) ben poco di quel che viene elaborato e proposto dal sistema ricerca riesce ad essere trasmesso ai media ed ai cittadini. La nuova sfida è quella di comunicare con i cittadini, di saper illustrare in modo chiaro e comprensibile i risultati ed i trend delle attività svolte, ma soprattutto di valorizzare e condividere le possibili ricadute (anche a lungo termine) sulle tematiche che preoccupano l'opinione pubblica e da cui dipende il futuro di tutta la collettività; perché il progresso scientifico, equilibrato in tutte le sue componenti, è l'unica attività umana che può aprire nuovi spazi di libertà dal bisogno, superando i limiti naturali, pur salvaguardando sempre la sostenibilità ambientale.

Collegamento con il sistema produttivo. In questo campo la parola chiave è "diffidenza" ed è l'atteggiamento che ostacola il rapporto fra le imprese e la ricerca pubblica. Da una parte i privati accusano la ricerca pubblica di essere residuale ed incapace di incidere sulla competitività del sistema Paese; dall'altra si constata che nell'ultimo ventennio l'impresa italiana ha privilegiato i fattori di produttività quantitativi piuttosto che quelli

qualitativi; si sono cioè lasciate indietro le nuove tecnologie concentrandosi sul fattore lavoro e sul *restyling* dei prodotti. Si sono ipotizzate differenze di *mission*, incapacità di comprendere il reciproco linguaggio; non è per nulla vero: dove c'è stata la volontà di collaborare i risultati positivi non sono mancati. Non è più tempo di diatribe, l'attuale fase di timida ripresa economica richiede un'accelerazione qualitativa ed organizzativa come mai in precedenza. Tutte le forme di collegamento con le imprese innovative del territorio devono essere esperite (uffici per i Programmi europei, seminari di contatto, supporto progettale alle imprese, lavoro in team misti (ove possibile) su specifici risultati, sostegno agli spin-off, ecc.). Poi alle Regioni toccherà il compito con i programmi finanziati dall'EU di incentivare e premiare queste forme di collaborazione.

Capacità di interlocuzione con il MIUR. È chiaro che bisogna essere in due per interloquire e non sembra che ci sia molta voglia o interesse da parte del governo e del ministero a promuovere un confronto con la comunità scientifica, addirittura non vengono neanche convocati gli organismi istituzionali (come il CEPR). Ma non possiamo né dobbiamo stancarci di promuovere occasioni di confronto e attività di pressione perché cambi l'approccio alla ricerca pubblica in Italia. Sintetizzando con alcune frasi le emergenze più preoccupanti:

- <u>basta con i tagli delle risorse</u> alla R&S pubblica, a meno che non si decida di farne a meno del tutto:
- <u>basta con le "riforme strutturali"</u> a ogni cambio di governo che ingenerano ritardi, confusione e immobilismo;
- <u>basta con la burocratizzazione</u> dei processi che ha portato a ritardi clamorosi nell'assegnare le risorse ed ancor più clamorosi nell'erogarle, a non spendere neanche quanto ci viene assegnato dalle UE e ad allontanare molte imprese mortificate da cavilli e lentezze nell'analisi delle rendicontazioni.

Occorre invece promuovere azioni correttive con urgenza, con lungimiranza, in modo bipartisan, riferite al contesto europeo:

- ci siano <u>precise responsabilità</u> per elaborare e gestire la politica della ricerca e dell'innovazione nel nostro Paese, anche con diffusi livelli di coordinamento, ma con certezza dei ruoli e dei tempi d'azione;
- ci sia una *programmazione pluriennale* sia a livello nazionale sia a livello regionale, senza che a ogni bando si inventino novità sulla

- preparazione dei progetti, sull'erogazione dei fondi, sulle priorità, sui criteri di esecuzione;
- ci sia un deciso <u>ridimensionamento dell'apparato e delle</u> <u>procedure burocratiche</u> che ora gravano in modo plumbeo ed insopportabile sulla ricerca finanziata, erodendo il tempo destinato alle attività di ricerca per la lentezza nell'approvazione delle proposte, le lungaggini nell'erogazione de fondi e l'arzigogolato ed inaffidabile sistema di riscontro amministrativo;
- si preveda un'azione pluriennale di <u>potenziamento delle risorse</u> <u>umane</u> delle università e degli enti di ricerca, anche tenendo conto dei risultati della valutazione pluriennale ed al contempo una decisa riforma dei concorsi di accesso e di progressione in carriera basata sul merito e la trasparenza.

In conclusione la situazione dev'essere rappresentata per quello che è: una situazione grave per il Paese in cui alcune punte di eccellenza, alcune sporadiche iniziative locali e la dedizione di un gran numero di ricercatori e docenti che, nonostante le condizioni avverse, proseguono con passione e competenza le loro attività, impediscono, per ora, il naufragio del sistema di ricerca pubblica. Se davvero l'Italia inizia dopo anni bui a provare a progettare il proprio futuro, per recuperare le tante posizioni perse e per riaccendere la speranza nei cittadini, a nostro parere occorre promuovere un **Piano Nazionale di valorizzazione e rilancio del sistema Ricerca e Sviluppo in Italia**. Per farlo è importante che la politica coinvolga la Comunità scientifica, accetti le indicazioni che provengono dal contesto europeo ed internazionale ed avvii azioni di rimedio in tempi brevissimi. Il nostro compito sarà nei prossimi mesi quello di illustrare questi temi ed incalzare chi ha l'onere di prendere decisioni per la collettività che potranno essere dirimenti per il futuro del nostro Paese.

# ABSTRACT DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

# SESSIONE "Biosensori innovativi per l'Ambiente e la Salute"

#### BIOSENSORI INNOVATIVI PER L'AMBIENTE E LA SALUTE

Giuseppe Palleschi<sup>1</sup> e Giovanni Antonini<sup>2, 3</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi Roma Tor Vergata

Le ricerche effettuate in ambito INBB relativamente ai "biosensori innovativi per l'ambiente e la salute " hanno avuto l'obiettivo di sviluppare biosensori di nuova generazione, funzionalizzati, nano strutturati e non, multiplexed, per l'ambiente e la salute.

In particolare, vengono identificate due grandi aree di applicabilità di tali dispositivi:

- monitoraggio di inquinanti ambientali che tendono a biomagnificare all'interno delle catene alimentari, con conseguente impatto sulla salute umana;
- diagnostica molecolare e clinica, con particolare riguardo alla valutazione di marker clinici, agenti infettivi, farmaci per la cura di malattie croniche e degenerative (i.e. Alzheimer).

Nella nostra società vi è una crescente richiesta di strumenti analitici semplici, rapidi, efficienti e affidabili per il monitoraggio di inquinanti ambientali quali POP (Persistent Organic Pollutants) di cui i più rappresentativi sono gli IPA, i PCB, i PBDE, inquinanti inorganici (i.e. metalli pesanti) e tossine algali.

Anche nel settore della diagnostica molecolare/clinica c'è un'urgente esigenza di avere a disposizione metodi analitici con analoghe caratteristiche per dosare e valutare markers clinici (i.e. markers tumorali), l'insorgenza di malattie immunomediate, agenti infettivi.

L'obiettivo è la realizzazione di un dispositivo che potrà essere utilizzato anche nel 'doctor office' e/o in strutture non ospedialere diventando un"Point Of Care Testing' (POCT).

Lo sviluppo di sensori elettrochimici e biosensori, con diversi tipi di trasduzione, nelle aree di interesse, rappresentano il punto di forza delle UdR proponenti tale piattaforma.

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Università degli Studi Roma Tre

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Presidente I.N.B.B.

Il lavoro dei ricercatori INBB ha contribuito in maniera significativa allo sviluppo di metodi bioanalitici e biosensori (metodi immunometrici e genici, biosensori cellulari luminescenti, immunosensori, biosensori enzimatici ad inibizione, biosensori a DNA, metodi per "high throughput screening" e di immunoistochimica ed ibridizzazione "in situ", metodi per imaging molecolare "in vivo") con rivelazione elettrochimica, fluorimetrica, piezoelettrica, plasmonica convenzionale e per immagini, e luminescente (bio-, chemi-, elettrochemi-, e termochemiluminescente) per applicazioni nel settore biomedico, farmaceutico, agroalimentare, ambientale e della medicina veterinaria. Sono stati inoltre sviluppati dispositivi analitici portatili adatti per applicazioni sul campo e/o in sedi decentrate che utilizzano apparecchiature portatili, spesso accoppiate a sistemi di microfluidica. L'impegno dei ricercatori INBB nel settore specifico è anche riportato dalle relazioni sulle attività svolte presentate nell'ambito dei Convegni Nazionali INBB, tra i quali si ricordano quelli più recenti relativi al IX Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 21-22 Ottobre 2010 e del X Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 22-23 Ottobre 2012, il cui programma dettagliato con gli abstract delle relazioni è presente sul sito www.INBB.it

Le attività che i ricercatori INBB intendo attuare nel prossimo futuro sono volte allo sviluppo di due sistemi ibridi di (bio)sensori; il primo adatto alla rivelazione simultanea di un ampio numero di sostanze tossiche o dannose (di origine biologica o chimica) presenti nell'ambiente, il secondo mirato all'individuazione di target molecolari e clinici di grande impatto sulla salute umana.

Per quanto riguarda lo sviluppo di biosensori per l'ambiente, ogni sistema sarà costituito da una piattaforma di (bio)sensori basati su differenti elementi di riconoscimento biologici/chimici (aptameri, enzimi, anticorpi, cellule) e diversi principi di trasduzione (luminescenza chimica, fluorescenza, plasmonica, elettrochimica, piezoelettrica). I sistemi progettati secondo tale architettura saranno molto versatili e facilmente adattabili ad una analisi "multiplexed" mirata alla rivelazione simultanea di più target in diverse matrici. In tal modo sarà possibile ottenere informazioni ortogonali su ogni specifico composto di interesse, ottimizzare il range dinamico e la sensibilità della misura ed evitare possibili effetti interferenti da parte delle matrici da analizzare. Il sistema progettato per il monitoraggio di inquinanti ambientali opererà su due livelli. Un primo livello non selettivo, basato su biosensori cellulari, sarà utilizzato come sistema di allarme precoce ed avrà

un'elevata probabilità di rivelare le sostanze d'interesse. Tale primo livello di monitoraggio si baserà pertanto sull'osservazione di effetti tossici degli analiti su varie linee cellulari (bioluminescenti wild-type o modificate geneticamente) opportunamente accoppiate a sistemi ottici. In particolare, utilizzando diversi tipi di cellule in parallelo, sarà possibilemonitorare un'ampia varietà di composti tossici (es. epatotossici o neurotossici).

Un secondo livello, più discriminante, impiegherà una piattaforma di diversi biosensori e sarà finalizzato a confermare la presenza dei composti d'interesse, permettendo analisi (semi)quantitative e con bassa probabilità di falsi positivi. Tale secondo livello di monitoraggio, volto alla rivelazione selettiva di un "panel" di molecole target o classi di target, confermerà le informazioni ottenute nel primo livello di monitoraggio minimizzando la probabilità di falsi positivi. Tale stadio si baserà:

- a. sulla determinazione diretta di composti elettroattivi (i.e. metalli pesanti) impiegando materiali elettrodici opportunamente funzionalizzati e/o nano-strutturati;
- b. su biosensori a inibizione enzimatica, immunosensori/aptasensori, e biosensori cellulari, sfruttando differenti tipi di trasduttore. Anche in questo caso, l'elemento biologico (enzima, anticorpo, aptamero, cellule) che funge da selettore del segnale, potrà essere accoppiato a materiale nano-strutturato allo scopo di migliorare le "perfomance" analitiche dei biosensori stessi.

Questo secondo livello, se accoppiato a sistemi di microfluidica, permetterà il monitoraggio in continuo delle concentrazioni ambientali, consentendo perciò la valutazione in tempo reale dell'efficacia di eventuali procedure di bonifica in atto.

Per quanto riguarda lo sviluppo di biosensori per la diagnostica molecolare/clinica, si opererà essenzialmente sul secondo livello di monitoraggio con l'obiettivo di realizzare una piattaforma integrata multiparametrica che potrà essere utilizzata anche nel 'doctor office' e/o in strutture non ospedaliere diventando un"Point Of Care Testing' (POCT). In tal modo sarà possibile effettuare uno screening di una popolazione più ampia ed eseguire tempestivamente una diagnosi precoce di malattie (tumorali, croniche e degenerative, immunomediate), predire strategie terapeutiche idonee e personalizzate e monitorare l'efficacia della terapia stessa. La realizzazione del progetto richiederà un approccio multidisciplinare: le competenze specifiche dei partecipanti consentiranno

lo sviluppo di (bio)sensori con diversi tipi di trasduzione, concepiti per essere integrati in due piattaforme ibride sensoristiche mirate, una al monitoraggio di inquinanti ambientali, l'altra alla diagnosi precoce di malattie gravi. Il vantaggioso utilizzo di questi sistemi rivoluzionerà non solo l'approccio ambientale e diagnostico, ma anche il follow up di un'eventuale terapia farmacologica o processo di bonifica ambientale, permettendo di ottimizzare la cura del paziente o gli interventi di sanatoria ambientale riducendone contemporaneamente i costi (in particolare per tutte quelle terapie o bonifiche che necessitano di un monitoraggio continuo di determinati parametri).

Diverse UdR INBB operano nella Piattaforma relativa a "biosensori innovativi per l'ambiente e per la salute": in primo luogo le UdR di Bologna, di Catania, di Firenze, di Napoli II Università, di Padova, di Parma, di Roma Tor Vergata e di Roma Tre.

A conclusione di questo breve report sulle attività del Consorzio INBB nel settore di ricerca dei biosensori per l'ambiente e la salute, è opportuno ricordare che per la prima volta il Consorzio coordinerà un importante progetto Europeo nell'ambito del Programma Horizon 2020.

Si tratta del progetto "Ultraplacad" (acronimo del titolo che in Italiano recita: Dispositivi Plasmonici Ultrasensibili per la Diagnosi Precoce del Cancro) promosso dal Prof. G. Spoto della nostra UdR di Catania, con il coinvolgimento delle UdR di Firenze e di Parma.

Il progetto, avviato lo scorso maggio, coinvolge, per una durata di 42 mesi, 13 soggetti di 7 paesi diversi dell'UE. Con orgoglio constatiamo che si è classificato primo, con il massimo punteggio (15/15) fra le 462 richieste di finanziamento ricevute da tutta Europa nel settore dei dispositivi diagnostici a seguito della prima call del Programma.

# PLASMONICA E NUOVE OPPORTUNITÀ PER LA DIAGNOSTICA PRECOCE DEI TUMORI

## Giuseppe Spoto

Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Catania Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi "INBB"

La diagnosi ed il monitoraggio di tumori e metastasi oggi passa, per la maggior parte dei casi, dalla necessità pratica di prelevare porzioni di tessuto sfruttando una procedura clinica nota come biopsia o biopsia solida. Una simile procedura rende difficoltosa l'efficace messa in atto di campagne di screening diagnostici ad ampio spettro che possano favorire l'identificazione precoce dei tumori. Un altro importante limite associato a tale approccio diagnostico è conseguenza dell'eterogeneità dei tumori che spesso non viene rappresentata dal campione solido prelevato. Recentemente è emersa la possibilità di evitare un simile approccio diagnostico grazie al fatto che cellule tumorali ed altri sistemi biomolecolari correlabili al tumore stesso sono dispersi nel sangue dei pazienti. E' quindi, in linea di principio, possibile mettere in atto procedure di campionamento basate su un semplice prelievo di sangue. Tale approccio prende il nome di biopsia liquida. <sup>1</sup> In questo caso, contrariamente a quanto avviene con la biopsia solida, la distribuzione delle "tracce" del tumore riflette l'eterogeneità del tumore stesso.

L'insieme dei sistemi correlabili al tumore e circolanti nel sangue del paziente comprende, oltre che cellule tumorali libere circolanti (circulating tumor cells, CTCs),<sup>2</sup> anche frammenti di DNA (cell-free circulating tumor DNA, ctDNA)<sup>3</sup> ed altre strutture cellulari quali gli esosomi (tumor-derived exosome).<sup>4</sup> A questo insieme di sistemi piò essere associato un gruppo di altri sistemi biomolecolari i cui livelli di espressione risultino alterati in conseguenza della presenza del tumore. Tali ultimi sistemi possono essere definiti biomarcatori tumorali nel caso in cui sia effettivamente dimostrato che il livello di espressione risulti correlabile alla presenza e/o alla progressione del tumore.

Anche se la scoperta dell'esistenza di alcuni dei suddetti sistemi biomolecolari o cellulari non è recente, la dimostrazione del loro effettivo uso per lo sviluppo di nuovi approcci diagnostici è solo recente in conseguenza alle difficoltà sperimentali connesse alla determinazione di sistemi molecolari a così bassa concentrazione e presenti in matrici complesse quali sangue, plasma o siero.

Oggi cominciano ad essere numerose le dimostrazioni della reale fattibilità di un simile approccio diagnostico. Molte delle dimostrazioni fornite, alcune delle quali concretizzatesi in kit commercialmente disponibili, combinano processi di isolamento ed arricchimento dei campioni con metodi di determinazione, quale ad esempio la droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR), che, nel caso della determinazione di ctDNA fanno uso di un classico metodo di amplificazione enzimatica (PCR). Purtroppo tali metodi di amplificazione enzimatica risentono di alcuni limiti sperimentali che possono essere superati solo facendo uso di metodi di rivelazione ultrasensibili.<sup>5</sup>

I metodi plasmonici hanno mostrato negli anni più recenti grandi potenzialità per quanto concerne il loro uso nell'ambito della diagnostica medica, grazie principalmente all'elevata sensibilità con cui riescono a rivelare sistemi biomolecolari dispersi in matrici complesse. <sup>6-9</sup>

Le possibilità offerte dai metodi plasmonici nell'ambito delle applicazioni riguardanti i metodi di biopsia liquida saranno presentati con particolare attenzione alla rivelazione di sequenze di acidi nucleici quali ctDNA e microRNA.

#### Riferimenti citati:

- 1. Crowley et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 10; 2013, 472-484
- 2. C. Alix-Panabières, K. Pantel, *Nat. Rev. Cancer* 14, 2014, 623–631
- 3. Bettegowda et al. Sci. Transl. Med. 6, 2014, 224ra24.
- 4. Wolfers et al. Nat. Med. 7, 2001, 297-303.
- 5. G. Spoto, R. Corradini, Detection of Non-Amplified Genomic DNA, Springer, 2012.
- 6. R. D'Agata, G. Spoto, Anal. Bioanal. Chem. 405, 2013, 573-584.
- 7. D'Agata et al. Anal. Chem. 83, 2011, 8711-8717.
- 8. D'Agata et al. Biosens. Bioelectron. 25, 2010, 2095-2100.
- 9. Im et al Nat. Biotechol. 32, 2014, 488-493.

# NUOVI METODI DI SCREENING E NUOVI BIOSENSORI NANOMODIFICATI PER LA DIAGNOSI DI MALATTIE E LA SICUREZZA ALIMENTARE ED AMBIENTALE

#### Danila Moscone

Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma Tor Vergata

Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi "INBB",

Negli ultimi anni i progressi della Chimica bioanalitica sono cresciuti esponenzialmente. Proteomica, metabolomica e biochip accoppiati a strumentazione moderna e sofisticata hanno portato a nuove soluzioni nel campo della medicina, per la diagnosi precoce delle principali malattie, nella sicurezza alimentare, ed anche nella rilevazione di sostanze inquinanti nell'ambiente a concentrazioni molto basse. Uno dei campi strategici della Chimica bioanalitica è lo sviluppo di tecnologie di sensori e biosensori come strumenti bioanalitici usati per metodi di screening clinico, negli alimenti e nell'analisi ambientale. Questa presentazione riguarderà lo sviluppo di biosensori elettrochimici e immunosensori e loro applicazioni in medicina, alimenti ed ambiente.

In ambito clinico, verrà illustrato lo sviluppo di un sistema per la diagnosi della malattia celiaca tramite il rilevamento di anticorpi antitransglutaminasi nel sangue prima, ed in saliva poi, basato sull'utilizzo di particelle magnetiche micrometriche, dove viene fatta avvenire l'intera catena immunologica, accoppiate a sensori screen printed e strumentazione portatile. La celiachia è una delle più comuni malattie immuno-mediate in Europa e Nord America, con un elevato numero di casi non rilevati. E' così auspicabile una diagnosi precoce tramite metodi di screening rapidi, semplici ed economici, al fine di prevenire esiti negativi in pazienti non trattati. Un ulteriore sviluppo del metodo ha permesso la rilevazione degli anticorpi specifici nella saliva, un campione molto più facilmente ottenuto con tecniche non invasive, adatto al monitoraggio in bambini in età scolare. Sempre in saliva sono stati determinati anche l'acido lattico endogeno e le sue variazioni dopo uno sforzo in atleti che hanno collaborato allo studio, ed alcune ammine biogene.

Un altro ambito di grande interesse è quello della sicurezza alimentare e dei controlli di qualità. Negli ultimi anni è aumentato l'interesse dei consumatori, nonché dei produttori, per analisi di controllo alimentare

affidabili, sensibili e selettive. Sarà presentato lo sviluppo di metodi di screening da applicare ad analisi di alimenti, come il rilevamento della palitoxina nelle acque utilizzando elettrodi stampati accoppiati con adatti mediatori, l'individuazione di batteri come la Salmonella, del virus dell'epatite A, e di composti chimici come polifenoli, pesticidi e l'arsenico, riconosciuto come uno degli elementi più dannosi per la salute umana e l'ambiente. Micotossine quali l'ocratossina A ed aflatossine, metaboliti secondari prodotti da funghi su una varietà di alimenti come le arachidi, noci, frutta secca, vino, caffè, cereali, sono state determinate tramite un veloce metodo analitico basato su un sistema a fibra ottica accoppiato ad uno spettrofotometro/fluorimetro portatile e miniaturizzato. Inoltre è stato ottimizzato un unico trattamento del campione tramite una colonna di immunoaffinità Afla-OtaCLEAN TM per l'estrazione dei due analiti.

Per quanto riguarda l'ambiente, sono stati realizzati biosensori per l'analisi di pesticidi, nonché di un prototipo basato su inibizione enzimatica per la rilevazione di agenti nervini in fase gassosa.

Gli sviluppi delle nanotecnologie hanno consentito considerevoli progressi in tali metodi di screening. Gli elettrodi stampati sono stati infatti modificati con nanomateriali quali nanoparticelle di Oro, Carbon Black o Prussian Blue nanostrutturati, e/o compositi di tali materiali, ottenendo importanti ampliamenti nelle prestazioni analitiche di tali sensori, come maggiore sensibilità, bassi limiti di rilevazione, insensibilità agli interferenti e all'avvelenamento della superficie elettrodica.

Saranno discussi esperimenti che illustrano l'ottimizzazione e la caratterizzazione analitica dei metodi sviluppati e la loro applicazione in campioni reali per valutare il recupero e l'effetto matrice.

# BIOSENSORI CELLULARI BIOLUMINESCENTI INTEGRATI IN DISPOSITIVI MOBILI

Elisa Michelini<sup>1,2</sup>, Luca Cevenini<sup>2</sup>, Maria Maddalena Calabretta<sup>2</sup>, Aldo Roda<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi <sup>2</sup>Dipartimento di Chimica "G. Ciamician", Bologna

Grazie ai recenti progressi delle tecniche di biologia molecolare è possibile sviluppare biosensori cellulari costituiti da batteri, lieviti o cellule di mammifero geneticamente ingegnerizzate in grado di rispondere ad uno specifico analita o ad una classe di analiti. Questi sistemi si basano sul riconoscimento molecolare biospecifico tra analita e recettore che determina l'espressione di una proteina "reporter" rivelabile mediante tecniche di luminescenza. Di particolare interesse è lo sviluppo di dispositivi analitici portatili che integrano biosensori cellulari basati su cellule geneticamente ingegnerizzate in grado di produrre un segnale bioluminescente (BL) in risposta ad un analita o ad una classe di analiti. Sono stati utilizzati diversi approcci volti a incorporare biosensori cellulari in dispositivi portatili basati su chip microfluidici in polidimetilsilossano (PDMS) o cartucce ottenute tramite stampa 3D, e sfruttando come rivelatori camere CCD portatili e i sensori CMOS integrati negli smartphone di ultima generazione. Inoltre le cellule sono state immobilizzate all'interno di matrici polimeriche al fine di ottenere dispositivi "pronti all'uso" senza necessità di mantenere colture cellulari. Per migliorare le prestazioni analitiche di tali dispositivi sono stati prodotti batteri magnetotattici bioluminescenti, che hanno la capacità di orientarsi secondo un campo magnetico esterno, e utilizzati come sensori di tossicità per analisi di campioni ambientali. Inoltre, cellule di mammifero sono state ingegnerizzate con diverse luciferasi e integrate in un dispositivo basato su smartphone (Fig.1). Tali dispositivi analitici trovano applicazioni in diversi settori quali analisi ambientali, forensi, e nel settore agro-food.



**Figura 1.** Esempio di integrazione dei biosensori cellulari in un dispositivo analitico integrato con uno smartphone.

# SVILUPPO ED APPLICAZIONI DEI BIOSENSORI NELLA DIAGNOSTICA CLINICA: LA STRADA DA SEGUIRE

#### Giovanna Marrazza

Dipartimento di Chimica "Ugo Schiff", Università degli Studi di Firenze

Una delle principali sfide in oncologia è la diagnosi precoce e la cura personalizzata dei pazienti di cancro. Il cancro continua ad essere la più temuta malattia su scala globale. Il cancro alla prostata, ai polmoni, al seno risultano essere al vertice della lista come maggiori cause di mortalità. L'analisi quali- e quantitativa di biomarcatori, ossia di molecole associate alla malattia tumorale nei suoi vari stadi, risulta essere essenziale per la diagnosi precoce, per fornire indicazioni che assistano il medico nel decidere il trattamento, e in definitiva per aumentare il tasso di sopravvivenza del paziente. I biomarcatori tumorali sono molecole che possono essere determinate in cellule, sangue, urina o altri fluidi corporei e che sono sovra-espressi a causa della comparsa e del progredire del cancro. Diversi biomarcatori tumorali sono stati identificati come caratteristici di differenti tipi di cancro. I biomarcatori tumorali includono modifiche a livello di DNA, RNA, proteine (enzimi e glicoproteine), ormoni, molecole del sistema immunitario, oncogeni e altre molecole modificate. Recentemente gli sviluppi nella proteomica e nella genomica hanno portato all'identificazione e allo studio di nuovi marcatori. La ricerca in questa area si sta espandendo rapidamente e un ampio numero di tecniche sono state proposte per applicazioni diagnostiche.

I biosensori possono essere considerati dei dispositivi "point of care (POC)" ultra-sensibili. Recentemente, sono stati proposti diversi biosensori per la misura di biomarcatori tumorali. Inoltre, la micro e la nanotecnologia è stata applicata con successo per migliorare le prestazioni dei biosensori con trasduzione ottica ed elettrochimica, e per consentire la realizzazione di arrays di biosensori per multianalisi.

Nel presente lavoro saranno discusse in dettaglio i materiali, le tecniche di immobilizzazione dei biorecettori e i tipi di trasduttori impiegati nella realizzazione di differenti tipologie di biosensori per la rilevazione di biomarcatori.

# SENSORI BIO-ELECTRONICI ORGANICI PER RIVELAZIONI ULTRA-SENSIBILI

#### Luisa Torsi

Dipartimento di Chimica - Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Bari (I)

La bio-elettronica organica e stampabile rappresenta un campo di ricerca fortemente interdisciplinare, che mira allo sviluppo di tecnologie innovative per lo studio delle bio-interfacce, nonché per far fronte alle nuove sfide nei settore biologico e medico [1]. Essa trova, infatti, applicazione nella realizzazione, non soltanto di biosensori, ma anche delle interfacce neurali, dell'ingegneria tessutale e della somministrazione di farmaci. La bio-elettronica accoppia un transistor ad effetto di campo (FET) con un sistema biologico *in vitro* o *in vivo*. Tali bio-sistemi possono essere utilizzati per studiare gli aspetti fondamentali delle interazioni biochimiche, consentendo di realizzare sensori biologici e chimici ultra-sensibili.

I micro-dispositivi FET interfacciati con un sistema biologico possono sfruttare semiconduttori organici processabili in soluzione, ossidi metallici stampabili, nanotubi di carbonio oppure grafene. Sono state recentemente proposte delle strutture innovative per tali dispositivi che integrano uno strato di elementi di riconoscimento biologici funzionali direttamente accoppiato con un interfaccia elettronica. Lo studio di tali interfacce ha permesso di ottenere informazioni sui cambiamenti conformazionali che avvengono nei biosistemi in seguito all'interazione con stimoli esterni e di ottenere biosensori *label-free* ultra-sensibili e selettivi [2,3,4].

In particolare sarà discusso l'utilizzo di FET con elettrolita liquido, il cui elettrodo di gate è stato funzionalizzato con *odorant binding proteins* (OBP) per il riconoscimento di enantiomeri neutri, che interagiscono differentemente con l'elemento di bio-riconoscimento [3]. Tale dispositivo consente di ottenere limiti di rivelabilità estremamente bassi poiché la corrente circolante fra gli elettrodi di *source* e *drain* del transistor è regolata dalla piccola capacità del biorecettore. In particolare la formazione del complesso ligando-proteina produce un cambiamento nella capacità associata all'OBP, che produce la risposta del biosensore. Lo studio della variazione di energia libera e della capacità associate al processo di bioriconoscimento ha consentito di valutare i diversi contributi dell'energia libera e i cambiamenti conformazionali associati all'interazione con il

ligando. Tali transistor, modulati dagli effetti capacitivi, renderebbero, dunque, possibile lo studio delle interazioni molecolari ultra-deboli in superficie a seguito della formazione di complessi proteina-ligando, mediante un approccio che sfrutta parametri termodinamici e bio-chimici.

- [1] K. Manoli et al. Anghewandte Chemie in press (2015)
- [2] L. Torsi et al. Chem. Soc. Rev. 42, 8612, 2013
- [3] Y. Mulla et al. Nat. Comm. 2015 10.1038/ncomms7010
- [4] G. Palazzo et. al. Adv. Mat. 2014 DOI: 10.1002/adma.201403541

# MBS SRL: UNO SPIN-OFF DI SUCCESSO NATO DALLA RICERCA UNIVERSITARIA

#### Giovanni Antonini

Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre, V.le G. Marconi 446, 00146, Roma

Il nucleo centrale della qualità e della sicurezza igienica degli alimenti è costituito dalla qualità microbiologica. Il concetto di "buona qualità microbiologica" di un alimento è intesa come assenza di microrganismi patogeni e/o loro tossine e di microrganismi alterativi, ed è applicabile a tutti i passaggi dal ricevimento della materia prima, la sua trasformazione, la conservazione, la distribuzione e la somministrazione del prodotto alimentare. Il controllo microbiologico degli alimenti, dalla materia prima fino alla somministrazione al consumatore viene attuato attraverso un controllo di processo, secondo una procedura detta HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Points - D.L. 26 maggio 1997, n.155) che stabilisce che tutte le aziende operanti nel settore alimentare applichino un sistema di autocontrollo aziendale, al fine di garantire e mantenere specifici standard di igiene e salubrità dei propri prodotti in tutte le fasi in cui si articola l'attività a partire dalle fasi produttive primarie (raccolta, mungitura, allevamento), fino al consumo da parte dell'utente. L'aspetto qualitativo relativo al controllo microbiologico pertanto non è più considerato un costo aggiuntivo per l'azienda, ma un requisito commerciale indispendabile a causa della sempre maggiore consapevolezza del consumatore e della sua aumentata sensibilità sulla salubrità degli alimenti.

I metodi per il controllo microbiologico degli alimenti appartengono essenzialmente a due differenti categorie: quelli basati sulla rilevazione della moltiplicazione dei microorganismi e quelli basati sulla rilevazione di alcune loro strutture attraverso sonde genetiche o immunologiche. I primi sono caratterizzati da una relativa facilità di uso ed economicità ma richiedono tempi lunghi spesso non compatibili con il processo produttivo degli alimenti. I secondi sono caratterizzati da maggiore velocità ma sono spesso di difficile esecuzione e relativamente costosi. Tuttavia entrambi i metodi non sono facilmente eseguibili da piccoli-medi produttori alimentari che non possiedono laboratori dedicati né tantomeno personale specializzato.

Il metodo colorimetrico originale per l'analisi microbiologica di alimenti ed acque che è stato sviluppato e brevettato dall'Università Roma Tre, è stato denominato MBS-HACCP&ACQUE Easy Test ed è basato sulla misurazione dell'attività catalitica di enzimi ossidoreduttasici metabolismo primario permettendo di stabilire una corrispondenza inequivoca tra attività enzimatica misurata e carica microbica presente nel campione. Per la valorizzazione di tale brevetto, nel 2007 è nata la società MBS srl come spin-off accademico dell'Università Roma Tre. Ne fanno parte i ricercatori che hanno sviluppato il dispositivo, società private italiane attive nel campo della biologia applicata ed un fondo di Seed Capital di diritto francese. MBS ha completato lo sviluppo industriale grazie ad agevolazioni concesse dal Ministero dell'Università e Ricerca (DM 593/00 Art. 11). La fiala monouso pronta per l'analisi viene prodotta dalla MBS srl e commercializzata direttamente ma sono previsti nel futuro accordi di commercializzazione o licenza. L'idea imprenditoriale e' legata alla produzione e commercializzazione di un kit di analisi con fiale monouso per l'esecuzione rapida di analisi microbiologiche di campioni di alimenti, sfruttando il cambiamento di colore del contenuto della fiala, indotto dalla presenza di batteri.

L'analisi è effettuabile ovunque si presenti la necessità, da personale senza specifiche nozioni microbiologiche e non è necessaria alcuna altra strumentazione oltre ad un incubatore fornito su richiesta. Il kit può sostituire integralmente sia le analisi classiche (conta su piastra) sia quelle più innovative (metodiche immunologiche o genetiche) con netti vantaggi competitivi in termini di tempi, costi e competenze.



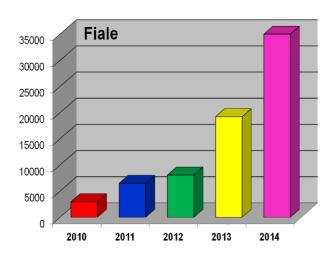
## Facilità d'uso

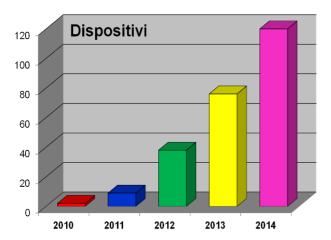
L'analisi microbiologica in 5 semplici passi



La stima del mercato di riferimento e' di circa 200.000.000 analisi microbiologiche /anno nella sola Europa per il settore agroalimentare ed Ambientale (acqua e aria). La maggior parte di tali analisi (70-80%) possono essere effettuate con MBS-HACCP&ACQUE Easy Test. Il prodotto è già stato acquistato da numerosi clienti in Italia ed all'estero, prevalentemente Cina, ma anche Svezia ed India, con una promozione del prodotto che è avvenuta esclusivamente attraverso un sito web (peraltro non pubblicizzato). Tale fase ha permesso la ottimale messa a punto del prodotto in funzione delle più disparate esigenze del cliente.

#### Le vendite





Dopo aver dimostrato la validità tecnico-scientifica e commerciale del prodotto, la soc. MBS srl è in procinto di compiere un grande salto dimensionale per proporsi come azienda competitiva nel mercato mondiale dei kit per analisi microbiologici.

# SESSIONE "Interferenti Endocrini: Ambiente, Alimentazione e Salute"

# L'INBB E GLI INTERFERENTI ENDOCRINI

Damiano Gustavo Mita<sup>a d</sup>, Alberta Mandich<sup>b d</sup> e Oliana Carnevali<sup>c d</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio Nazionale Interferenti Endocrini – INBB

Anche se la sua storia è ancora molto giovane, il rapporto tra INBB ed Interferenti Endocrini è ben consolidato e sviluppato.

Secondo la definizione adottata dalla Unione Europea "un Interferente Endocrino (IE) è una sostanza esogena, o una miscela, in grado di alterare la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi alla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione" (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, Weybridge, UK, 2-4/12/1996). L'elenco di questi composti è molto vasto ed include pesticidi organoclorurati, bifenili policlorinati (PCBs), ftalati, diossine, furani, vernici antifouling, bisfenolo-A e numerosi altri composti organici antropogenici. Molti di essi possiedono caratteristiche chimico-fisiche tali da consentirne la persistenza nell'ambiente per lunghi periodi di tempo e l'accumulo nel grasso e nei tessuti di animali, uomo compreso, attraverso la catena alimentare. L'allerta sugli IE noti e su quelli emergenti riguarda il rischio derivante dall'esposizione attraverso l'alimentazione inculcando, anche nel comune cittadino, la consapevolezza della insidiosità di tali sostanze che, anche se presenti in piccole concentrazioni, sono in grado di indurre/incrementare effetti patologici spesso multi generazionali.

Caratteristica comune degli IE è quella di "disregolare", attraverso meccanismi di competizione o di antagonismo, strutture endocrine come ipotalamo, ipofisi, gonadi, tiroide, paratiroide, surrene , pancreas, rappresentando un concreto pericolo per la salute dell'uomo e dell'ambiente. Questo avviene attraverso fini cambiamenti molecolari che, da un lato, impediscono alla cellula di rispondere correttamente ai normali stimoli esercitati dall'ormone endogeno e dall'altro si ripercuotono su diverse funzioni, compresa quella nervosa e immunitaria. L'esposizione ad inquinanti ambientali ed in particolare agli IE, compreso i metalli pesanti, viene associata con sempre maggiore frequenza a numerose patologie quali un aumento di malformazioni del tratto urogenitale maschile (criptorchidismo, ipospadia) alla nascita e di neoplasie al testicolo durante

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Genova

<sup>&</sup>lt;sup>c</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche

<sup>&</sup>lt;sup>d</sup> Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi"

l'adolescenza, endometriosi, aumento dell'incidenza di aborti e di parti pretermine, pubertà precoce, anomalie nello sviluppo neuronale e del comportamento riproduttivo, obesità e diabete, tumore mammario e della prostata e alterazioni della funzionalità tiroidea. Inoltre la comparsa di alterazioni cliniche o subcliniche correlate a disturbi dell'apprendimento, dell'attenzione e dell'emozionalità sembra essere riconducibile all'esposizione, nel periodo embrionale, a contaminanti ambientali quali gli organoclorurati, gli organofosfati, gli erbicidi ed i metalli pesanti.

Lo stadio embrionale e fetale e l'infanzia sono considerati i periodi più sensibili e delicati poiché esposizioni ad inquinanti ambientali in queste fasi possono causare malattie e disabilità che si sviluppano nel corso della vita o nelle generazioni successive.

In Italia, l'esposizione dell'ambiente e della popolazione a IE è stata ed è oggetto di iniziative scientifiche di rilievo come il sito dedicato del Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale dell'Istituto Superiore di Sanità, il Censimento dei ricercatori italiani coinvolti in questo tipo di ricerca o la costituzione di un Gruppo di Lavoro per la Sorveglianza dell'Esposizione a Interferenti Endocrini organizzato dal Comitato Nazionale per Biosicurezza e le Biotecnologie. Questo gruppo ha avuto come obiettivo principale lo sviluppo di linee guida per la valutazione della esposizione a IE che potessero essere di indirizzo sia per la ricerca scientifica che per azioni a favore della salute e della qualità della vita della popolazione generale.

Non c'è settore di interesse degli Interferenti Endocrini nel quale l'INBB non abbia dato il suo contributo sia nel settore della ricerca che nel settore della formazione/divulgazione.

#### a)- Attività di ricerca

Siccome ci sembra dispersivo elencare il contributo delle singole unità operative INBB nell'ambito della propria attività di ricerca istituzionale, ci soffermeremo brevemente sulle attività nell'ambito di progetti nazionali e/o regionali che hanno visto il coordinamento o la semplice partecipazione dell'INBB. Ambiente, Alimentazione e Salute sono i settori in cui l'INBB è stato protagonista attivo.

*a.1)- Ambiente.* I primi rapporti hanno riguardato l'attività di ricerca congiunta tra INBB e ISPESL nell'ambito di numerosi progetti (a partire dal 2001 e fino al 2010) di attività ordinaria e finalizzata del Ministero della Sanità. Altri progetti significativi finanziati sono stati quelli con la Regione Campania (2005-2006), con il Centro Ricerche Scuola del Mare (2007-2008) e attraverso la FILAS (2008-2009). In modo autonomo, poi, l'INBB ha coordinato un progetto, tutto di sue unità, nell'ambito di un progetto

MIUR per giovani (Futuro in Ricerca) basato su biosensori e biorisanamento (2010-2013).

- a.2)- Alimentazione. Per quel che riguarda il settore Alimentazione appare significativo il contributo dell'INBB con il coordinamento dell'attività di ricerca nell'ambito del progetto di ricerca finalizzata del Ministero della Sanità (fondi 2009, attività 2011-2015) dal titolo: Food and Environmental Safety: the problem of the endocrine diosruptors". Il progetto, svolto in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno di Portici ha visto il coinvolgimento di cinque unità INBB, una unità dell'IZSM ed una unità del CNR.
- *a.3)- Salute.* Per quel che riguarda il settore Salute rimane fondamentale il contributo di persone, idee e risultati dato da più unità INBB, in collaborazione con l'ISPESL al progetto Nazionale "Medicina di Genere" del Ministero della Sanità, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (2009-2011).

Alla luce di queste osservazioni risulta evidente come l'INBB nel corso degli ultimi anni è stato in grado negli ultimi anni di organizzare una task force in grado di studiare e risolvere tutta una serie di problematiche di interesse salutistico ed ambientale. Tra i risultati ottenuti dai ricercatori INBB ricordiamo:

- la messa a punto di biosensori, classici ed innovativi, per l'identificazione di IE in matrici di ogni tipo: liquidi biologici, alimenti, tessuti ed organi, ecosistemi;
- lo studio dei meccanismi molecolari alla base di patologie indotte da IE ed in particolare endometriosi, obesità, diabete, malattie cardiovascolari e tumori:
- la messa a punto di sistemi non invasivi per la rilevazione di biomarker di estrogenicità e l'applicazione di endpoints morfologici per la valutazione degli effetti (anti)estrogenizzanti-(anti)androgenizzanti in specie acquatiche in ambiente naturale;
- la valutazione dell'effetto dell'esposizione a contaminanti obesogenici sulla riproduzione, sulla detossificazione, sul metabolismo lipidico e sul controllo dell'appetito in specie acquatiche;
- l'individuazione di biomarker di esposizione tramite l'osservazione di differenze di espressione genica in soggetti (ad esempio pesci, molluschi, anfibi, etc) cresciuti in ambienti inquinati ed in ambienti non inquinati;

- la messa a punto di sistemi di risanamento tramite processi di biorisanamento (enzimi immobilizzati e/o biofilm) e di fotorimediazione:
- lo studio della risposta "di genere" agli interferenti endocrini.

La solidità di queste expertises è facilmente documentata dalle numerose collaborazioni, nazionali ed internazionali, della struttura INBB o delle singole unità di ricerca. Tra le collaborazioni ricordiamo: Istituto Superiore di Sanità, CNR, Istituti Zooprofilattici, ISPRA, Agenzie Regionali per la protezione e l'Ambiente, IRCS, Regioni, ecc.

#### b)- Attività di formazione e divulgazione

L'impegno dei ricercatori INBB nel settore specifico è anche evidenziato dai report nei convegni Convegni Nazionali INBB, tra i quali si ricordano quelli relativi all'VIII Convegno Nazionale del 23-24 ottobre 2008, al IX Convegno Nazionale, tenutosi a Roma il 21-22 Ottobre 2010 ed al X Convegno Nazionale, tenutosi a Roma il 22-23 Ottobre 2012. Sempre nell'ambito delle attività INBB ricordiamo il Convegno monotematico "La ricerca biologica e clinica sugli interferenti endocrini: attualità e prospettive" organizzato con l'ISPESL e tenuto a Roma il 27-28 ottobre 2005, il Workshop "Biosensori per l'ambiente e la salute" tenuto nel 2006, Il Workshop tenuto presso il CNR il 14 Novembre 2014.

Sempre nell'ambito della divulgazione vanno ricordate l'organizzazione e la pubblicazione (2014) di un Censimento conoscitivo dei gruppi che in Italia conducono ricerche nel campo degli Interferenti Endocrini, le loro tematiche, le pubblicazioni prodotte negli ultimi cinque anni e le collaborazioni internazionali. Si tratta di un censimento che segue un'analoga iniziativa effettuata cinque anni prima dall'INBB in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità.

Ricordiamo che è possibile reperire gli atti di tutti questi eventi presso il sito www.inbb.it.

Nell'ambito della pubblicazioni scientifiche specifiche è doveroso citare la pubblicazione del volume "Endocrine Disruptors" (Eds. Marino & Mita) e di un numero speciale monotematico di Open Biotechnology Journal (Bentham Science Publisher-Guest Editor: Mita) la cui pubblicazione è prevista nell'ultimo trimestre 2015.

Per finire ricordiamo due workshop, con attribuzione di crediti formativi per Biologi, Medici e Veterinari, organizzati da INBB e ISZM di Portici, sul tema degli interferenti endocrini e sicurezza alimentare. Il primo workshop è stato tenuto nel settembre 2013, il secondo sarà tenuto il prossimo 22 e 23 ottobre.

A conclusione di questo breve report sul rapporto tra INBB e settore di ricerca relativo agli interferenti endocrini ci piace ricordare due ulteriori iniziative attivate dall'INBB:

- la costituzione di una piattaforma programmatica su "Ambiente e Salute" mirata a presentare e organizzare le unità di ricerca INBB su potenziali progetti di ricerca, nazionali o internazionali, nei settori di pertinenza degli interferenti endocrini;
- l'istituzione nel 2013 di un Laboratorio Nazionale INBB sugli Interferenti Endocrini attivo nell'Istituto di Genetica e Biofisica del CNR di Napoli.

# LA RICERCA ITALIANA NEL CAMPO DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI

#### Damiano Gustavo Mita

Laboratorio Nazionale Interferenti Endocrini – INBB

Da più di un decennio l'INBB ha aumentato il suo interesse verso il settore degli Interferenti Endocrini favorendo lo sviluppo delle attività di ricerca sia al proprio interno che verso la comunità scientifica esterna. Nell'ambito di questa politica scientifica è nata l'esigenza di organizzare un censimento conoscitivo dei gruppi che in Italia conducono ricerche nel campo degli Interferenti Endocrini, le loro tematiche, le pubblicazioni prodotte negli ultimi cinque anni e le collaborazioni internazionali.

Diciamo subito che necessariamente il censimento non è stato, e non poteva essere, esaustivo in quanto condotto "porta a porta" e basato sulla mia conoscenza personale degli operatori del settore. Tra le domande si chiedeva di inquadrare la propria attività di ricerca nell'ambito dei settori ERC ed in base ad una ventina di parole chiave ritenute più significative.

Anche se il popolo dei ricercatori operanti nel settore degli Interferenti Endocrini è decisamente molto più vasto del numero di coloro che hanno risposto al censimento riteniamo, comunque, che il quadro che emerge dalle risposte possa considerarsi abbastanza rappresentativo della comunità scientifica nazionale.

Nella tabella seguente sono riportati, dal punto di vista statistico, i risultati del censimento.

ISTITUZIONE	NUMERO ISTITUZ.	NUMERO UNITA' TOTALI	PERCENTUALE (%)
Università	22	60	80,1
Enti Pubblici Ricerca	4	7	9,3
IRCS	2	4	5,3
Zooprofilattici	1	1	1,3
Aziende Ospedaliere	2	2	2,7
Società Private	1	1	1,3

Per quanto riguarda la distribuzione territoriale questa risulta così ripartita: 39,2% al Nord, 24,3 % al Centro, 36,5 % al Sud. Ad evitare equivoci,

ricordiamo che questa distribuzione è riferita esclusivamente al numero di schede pervenute e non alla situazione reale.

Per quanto riguarda la suddivisione per tematiche è significativo sottolineare l'elevato numero di unità che operano nei settori di competenza di questa sessione: Ambiente (28 unità), Alimentazione (24 unità), Salute (34 unità).

Per maggiori dettagli e per visionare i contenuti delle schede pervenute si rimanda al sito INBB (www.inbb.it).

# ANIMALI REPORTER NELLA RICERCA TOSSICOLOGICA

### Adriana Maggi, Paolo Ciana and Nicoletta Rizzi

Centro di Eccellenza sulle Malattie Neurodegenerative Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari Università di Milano

I test più classici per lo studio di sostanze tossiche in campo ambientale o alimentare permettono di evidenziare effetti di grande entità, ma non piccole variazioni nella fisiologia di un intero organismo se non con l'utilizzo di un significativo numero di osservazioni e quindi il sacrificio di un numero elevato di animali da esperimento; queste tecniche generalmente sono di natura statica e permettono di studiare l'effetto della esposizione solo in tempi definiti. Inoltre tali metodologie sono generalmente inadatti a valutare gli effetti negativi della esposizione prolungata a basse dosi di prodotto tossico e a misurare con precisione l'effetto cumulativo di una esposizione prolungata. Tali limitazioni nella valutazione del rischio tossicologico devono essere superate con la messa a punto di modelli appropriati per un esame rapido, riproducibile, efficace e a costi contenuti in soggetti viventi.

Lo studio degli interferenti endocrini rappresenta un validissimo esempio dei limiti della tossicologia moderna in quanto i modelli classici ad oggi utilizzati non permettono di valutare con certezza la varietà e ampiezza di effetti che questi composti hanno nei diversi organi dell'animale esposto. Il nostro laboratorio ha proposto di utilizzare l'imaging molecolare per lo studio di composti estrogenici e ha messo a punto un esempio di modello animale in cui l'integrazione nel genoma di topo del gene della luciferasi sotto il controllo di un promotore modulato degli estrogeni permette di seguire a livello spazio-temporale l'effetto della esposizione di composti attivi sui recettori degli estrogeni presenti a livello ambientale o alimentare. La generazione di questo modello ha richiesto una serie di accorgimenti per assicurare che il gene della luciferasi, reporter dell'azione estrogenica, fosse ugualmente espresso e sensibile alla azione trascrizionale dei recettori per gli estrogeni in tutte le cellule del topo mutato.

I risultati ottenuti indicano che tale modello animale è applicabile alla rapida e economica identificazione di potenziali interferenti endocrini e alla valutazione della loro effettiva tossicità in organi riproduttivi e non bersaglio della azione di interferenti endocrini. Esempi della efficacia della metodologia messa a punto e della su applicabilità a altri settori della tossicologia verranno illustrati.

# INTERFERENTI ENDOCRINI E SVILUPPO NEUROCOMPORTAMENTALE E METABOLICO

#### Paola Palanza

Dipartimento di Neuroscienze, Università di Parma

L'incidenza di alcune patologie quali i disordini neuro comportamentali /autismo, ADHD, ansia e depressione infantili), anomalie riproduttive (pubertà precoce, ovaio policistico), obesità e patologie correlate è in costante aumento nella popolazione e queste patologie tendono a manifestarsi sempre piu' precocemente, anche in adolescenza o infanzia. Il rapido aumento registrato nell'incidenza di questi disordini è non soltanto attribuibile a cause genetiche o allo stile di vita, ma anche a fattori agenti durante le fasi precoci della vita (in utero o prima infanzia) e a modificazioni epigenetiche. Secondo l'ipotesi dell'origine ontogenetica di salute e malattia (DOHaD), l'obesità avrebbe le sue radici nelle fasi precoci dello sviluppo dell'individuo (Barouki et la 2012). Dati scientifici indicano che alcune sostanze presenti nell'ambiente e in grado di agire in modo simile agli ormoni endogeni, chiamate collettivamente "INTERFERENTI ENDOCRINI" (IE) sono in grado di indurre alterazioni neuro comportamentali, obesità e insulino-resistenza in modelli animali o sono correlati a maggiore incidenza di queste patologie in adulti e bambini. In particolare, gli studi preclinici su modelli animali indicano che l'esposizione fetale o neonatale a interferenti endocrini può alterare lo sviluppo a livello di specifici circuiti cerebrali che regolano il comportamento, la riproduzione, l'alimentazione e il bilancio energetico. La ricerca su tali problematiche è particolarmente attuale in considerazione del dibattito in sede regolatoria (Commissione europea ed EFSA e FDA in USA) sui nuovi limiti e sulle strategie di valutazione dei possibili effetti nocivi, in particolare sui bambini, di alcuni interferenti endocrini uso comune, quali il bisfenolo A (BPA) o gli ftalati, presenti nell'ambiente e negli alimenti e sulla possibilità di bandirne o limitarne l'uso. Gli indici comportamentali sono particolarmente sensibili alle perturbazioni del sistema neuroendocrino, poichè essi rappresentano il punto finale di sistemi altamente integrati ed anche sottili alterazioni in ognuna delle componenti di tali sistemi può riflettersi nell'alterazione del comportamento. In particolare lo studio di comportamenti sessualmente dimorfici e dei loro substrati neurali si propone come un modo particolarmente sensibile di evidenziare l'azione distruttrice o semplicemente modulatrice degli IE estrogenici. Livelli appropriati di ormoni sessuali sono indispensabili per il normale sviluppo e la differenziazione sessuale degli organi e del sistema nervoso centrale, e, conseguentemente, del comportamento e del metabolismo.

La nostra ricerca ha evidenziato che nel topo ed altri roditori i comportamenti sessualmente dimorfici sono particolarmente sensibili all'azione di basse concentrazioni (compatibili con quelle presenti nell'ambiente) di BPA durante lo sviluppo perinatale. Infatti quando esposti in utero e/o nella prima settimana dopo la nascita a BPA, mentre i topi di controllo mostrano chiare differenze sessuali nel comportamento in risposta ad un ambiente nuovo e nell'apprendimento di un percorso, la prole esposta a BPA presenta una riduzione o un annullamento delle differenze sessuali (Tabella I - Laviola et al. 2005; Gioiosa et al. 2007). Il primo periodo postnatale sembra più sensibile all'azione del BPA rispetto alla sola esposizione prenatale (Gioiosa et al. 2013).L 'esposizione prenatale a bisfenolo A altera alcuni substrati neurali: l'attività del sistema noradrenergico nel locus coeruleus e l'area preottica, la produzione di tirosina idrossilasi in LC e l'attività del sistema NO e kisspeptina. I dati hanno indicato che l'esposizione perinatale riduce le differenze sessuali in queste aree rispetto ai controlli. Abbiamo inoltre valutato gli effetti sul metabolism: solo I maschi esposti prenatalemnte a BPA hanno mostrato un'alterazione degli indici metabolici (consumo di cibo, peso corporeo, regolazione glicemica). Insieme con altri studi (vedi Palanza et al. 2008, per una sintesi), questi dati confermano che l'esposizione a basse dosi di un interferente endocrino come il bisfenolo A, durante il periodo critico della differenziazione sessuale del sistema nervosa centrale, può esercitare effetti a lungo termine sul comportamento e il SNC degli adulti in un modello animale.

TABELLA 1. Sommario degli effetti dell'esposizione pre- o peri-natale al BPA (10 microg/Kg peso/ giorno) sulle differenze sessuali nel comportamento di maschi e femmine di topi in diversi paradigmi sperimentali.

Test Risposta Comportamentale CONTROLLI BPA F>M 1F=MRicerca della novità Risposta F<M 1F>M Attività di alla Novità<sup>a</sup> (Novelty-test sostituzione pre-pubertà) (grooming) **Eplorazione** Esplorazione F>M  $\downarrow$ F=M

di un'arena <sup>a</sup> (Free- exploratory Open Field)	Locomozione Risk-taking (tempo al centro e alla luce)	F>M F>M	↓F <m↑ F=M</m↑ 
Labirinto a croce <sup>a</sup> (Elevated Plus Maze)	Esplorazione Ansia	F>M F <m< td=""><td>F=M †F=M</td></m<>	F=M †F=M
Condiziona mento <sup>b</sup> (indotto da anfetamina; Conditioned Place Preference)	Memoria per la ricompensa (Preferenza per il compartimento associato alla droga)	F>M	↓F=M

F=M, il comportamento non differisce tra maschi e femmine; F>M, livelli di comportamento sono significativamente maggiori nelle femmine che nei maschi; F<M, livelli di comportamento sono significativamente minori nelle femmine che nei maschi. \$\frac{1}{2}\$riduzione statisticamente significativa del comportamento in seguito all'esposizione perinatale; \$\frac{1}{2}\$ aumento statisticamente significativo del comportamento in seguito all'esposizione perinatale. \$^{a}\$Esposizione al BPA dal giorno 11 di gravidanza al giorno 7 di allattamento (da Gioiosa et al., 2007). \$^{b}\$Esposizione al BPA dal giorno 11 al 18 di gravidanza (da Laviola et al. 2005).

#### Bibliografia

- 1. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. 2012. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. Environ Health. 2012;11:42.
- Gioiosa L, Fissore E, Ghirardelli G, Parmigiani S, Palanza P. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. Hormones & Behavior. 2007; 52:307-316;
- 3. Gioiosa L, Parmigiani S, vom Saal FS, Palanza P. 2013. The Effects of Bisphenol A on Emotional Behavior Depend upon the Timing of Exposure, Age and Gender in Mice. Hormones & Behavior 63: 598–605
- 4. Laviola, G., Gioiosa, L., Adriani, W., Palanza, P., 2005. d-Amphetamine-related reinforcing effects are reduced in mice exposed prenatally to estrogenic endocrine disruptors. Brain Res. Bull. 65, 235-240.
- 5. Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S. Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice. Environ Res. 2008; 108(2):150-7;

# TECNOLOGIE MOLECOLARI E TRACCIABILITÀ DEL DNA PER IL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

#### Vito De Pinto

Dip. Sc. Biologiche, Geologiche e Ambientali, Sez. di Biologia molecolare, Università di Catania, e Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Sez. di Catania.

Lo sviluppo di nuovi e sempre più efficienti sistemi di tracciabilità molecolare per risalire da un prodotto commerciale di origine animale alla sua origine di specie, ed eventualmente geografica, è oggi un obiettivo fondamentale per garantire l'origine, la sicurezza e la qualità dei prodotti alimentari a fronte delle sempre più frequenti frodi, in particolar modo nel settore ittico. I nuovi strumenti messi a disposizione dalle tecniche biomolecolari consentono l'identificazione delle specie ittiche con un grado di affidabilità e sensibilità di gran lunga superiore a tutti gli altri metodi diagnostici precedentemente utilizzati, dal momento che si basano sullo studio del patrimonio genetico. L'ampia differenziazione del prodotto "lavorato" presente sul mercato, nel caso del pesce, richiede inoltre l'identificazione inequivocabile e rapida delle specie commercializzate anche quando non sono più visualizzabili le caratteristiche morfologiche del materiale di partenza. Inizialmente si era ricorso a metodi di identificazione delle proteine, come l'isoelettrofocalizzazione (IEF), (FDA 1995). L'IEF è però di scarsa utilità sia per la sua complessità pratica sia per la preparazione del campione. Nel 2003 è stato introdotto un nuovo sistema di identificazione di specie, il DNA barcoding, che studia la variabilità di una regione del genoma mitocondriale, la subunità I della Citocromo Ossidasi (COI), chiamata "DNA barcode" (1).

Nel nostro Dipartimento abbiamo inizialmente utilizzato l'analisi del DNA barcode per l'identificazione delle aree geografiche di provenienza del pesce spada, un prodotto largamente richiesto nella nostra regione. Per quest'analisi abbiamo però dovuto affiancare al barcode l'analisi di un'altra sequenza mitocondriale (D-loop) che, presentando una maggiore variabilità, permette un dettaglio più fine della differenza intra-specie (2). Il barcode classico si è rivelato estremamente potente nell'identificazione di filetti e preparati da pesce piatto, un prodotto molto diffuso nelle mense e con ampie possibilità di frode per sostituzione (3). Infine, recentemente, con lo scopo di ridurre od eliminare l'utilizzo del sequenziamento, è stata messa a punto una nuova metodica, semplice ma efficace, denominata Barcode-RFLP che ricerca la presenza di siti di restrizione nella sequenza amplificata

del barcode COI. Uno studio sulle acciughe, altra specie ittica di largo consumo sia fresca che conservata, ha dimostrato la fattibilità di questa metodica (4).

Lo scopo finale di questi studi rimane la ricerca di un adattamento di queste o di future tecniche di riconoscimento all'applicazione immediata o "sul campo".

- 1) Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S., & deWaard, J. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergence, among closely related species. Proceedings of the Royal Society London Biological Science, (Suppl) 270, S96–S99.
- 2) Pappalardo, A.M., Guarino, F., Reina, S., Messina, A., & De Pinto, V. (2011). Geographically widespread swordfish barcode stock identification: a case study of its application. PloS One 6(10), e25516.
- 3) Pappalardo, A., & Ferrito, V. (2015a). DNA barcoding species identification unveils mislabeling of processed flatfish products in southern Italy markets. Fisheries Research, 164, 153–158.
- 4) Pappalardo & Ferrito, V. (2015b). A COIBarc-RFLP strategy for the rapid detection of *Engraulis encrasicolus* in processed anchovy products. Food Control 57, 385-392.

# IL PROGETTO LIFE BIOCOPACPLUS: UN RIVESTIMENTO ECOSOSTENIBILE PER L'IMBALLAGGIO METALLICO PER ALIMENTI DALLE BUCCE DI POMODORO

## Angela Montanari

Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari (SSICA)

Il progetto LIFE+ BIOCOPACPLUS "Sustainable bio-based coating from tomato processing byproducts for food metal packaging" (LIFE 13ENV/IT/000590), propone un'innovativa applicazione industriale dei sottoprodotti dell'industria vegetale, con un duplice obiettivo, valorizzare gli scarti di pomodoro e produrre un imballaggio metallico sostenibile e sicuro.

Cuore del progetto, coordinato da SSICA, è lo sviluppo di una bio-vernice ottenuta dalla cutina, un componente delle bucce di pomodoro, da applicare sulla superficie interna ad esterna di scatole metalliche per alimenti. Il progetto si basa su due importanti considerazioni:

- a) Il pomodoro è uno dei vegetali più coltivati al mondo, 162 milioni di tonnellate nel 2012 [1]. In Europa sono prodotti c.a. 200000 ton. di scarti all'anno [2], attualmente utilizzati come fertilizzanti e per la produzione di biogas [3].
- b) Le vernici di origine petrochimica attualmente impiegate nel settore dell'imballaggio alimentare sono state oggetto di numerosi allarmi. Il problema della migrazione di monomeri e oligomeri, residui del processo di polimerizzazione, o di additivi, quali BADGE e ftalati, ha portato all'aumento dell'attenzione dei consumatori ai temi della sicurezza dei materiali. In particolare a partire dal 2009 grande allarme è nato intorno al tema BPA, presente nelle vernici epossidiche. Inoltre da gennaio 2015 in Francia [4] è vietato l'uso di imballaggi contenenti BPA.

Il piano di lavoro del progetto prevede l'individuazione di un metodo di estrazione della cutina dalle bucce di pomodoro. La cutina estratta sarà quindi polimerizzata per ottenere la bio-resina, costituente principale della nuova vernice. La vernice, opportunamente formulata, verrà applicata al supporto metallico sulle normali linee industriali. Infine saranno realizzate le scatole, che verranno riempite con diversi tipi di alimenti. Gli aspetti sensoriali e igienico sanitari dei nuovi imballaggi saranno analizzati in conformità alla legislazione.

I risultati inziali ottenuti riguardano l'ottimizzazione del metodo di estrazione. Sono state prese in esame e valutate diverse variabili, che hanno influenza sull'efficienza di estrazione, per individuare le condizioni migliori nello scale-up del metodo a livello semindustriale. E' stato definito un protocollo e la cutina è stata caratterizzata mediante analisi FTIR, GC-MS e JPC (Figg.1-3).

Il raggiungimento degli obiettivi del progetto avrà un impatto sicuramente positivo sull'intera filiera agro-industriale, dagli agricoltori alla grande distribuzione, fino al consumatore, che avrà a disposizione un prodotto sicuro, con minori rischi di migrazione di sostanze pericolose, come il BPA. L'uso di una vernice eco-sostenibile ottenuta dai sottoprodotti dell'industria del pomodoro contribuirà inoltre a ridurre l'impatto ambientale e consentirà un uso più efficiente delle risorse.

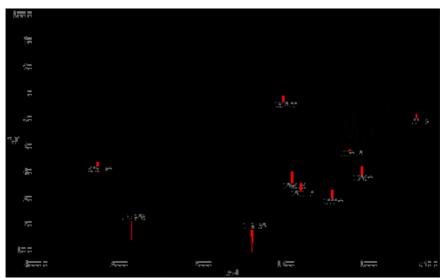
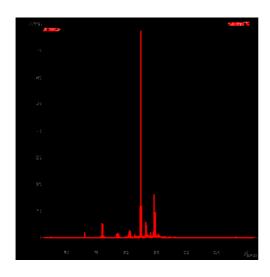
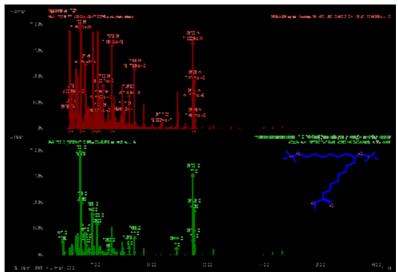


Fig. 1: Spettro FTIR della cutina





Figg. 2-3: Cromatogramma e spettro GC-MS della cutina

# Bibliografia

- [1] F. Jang, Y. Hsieh, Carbohydrates Polymers, 122, (2015), 60-68
- [2] M.R. Ventura, M.C. Pieltain, *Animal Feed Science and Technology*, 154, 3–4, (2009), 271–275.
- [3] M.S. Lenucci , M. Durante , J. Agric Food Chem., 61,15, (2013), 3683-92
- [4] http://www.senat.fr/petite-loi-ameli/2012-2013/202.html

# L'ALTRA FACCIA DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI: L'EFFETTO ANTI-COLESTEROLEMICO DI UN FLAVONOIDE PRESENTE NEGLI ALIMENTI

#### Veronica Cartocci

Dipartimento di Scienze, Sezione Scienze e Tecnologie Biomediche, Università Roma Tre, Roma.

Diverse ricerche sperimentali ed epidemiologiche sostengono il potenziale effetto benefico di alcuni componenti della dieta, tra cui i flavonoidi, sulla salute umana. Come esempio, l'adozione di diete ricche di frutta e verdura, insieme al mantenimento dell'attività fisica e di un'appropriata massa corporea, possono ridurre nell'uomo l'incidenza del cancro del 30-40% (Galluzzo et al., 2006). I flavonoidi, metaboliti secondari di molte piante vascolari utilizzate nella dieta umana, sono stati acclamati per i loro effetti sulla riduzione dell'incidenza di patologie vascolari, osteoporosi, patologie neurodegenerative e sulla riduzione dell'infiammazione sia cronica che acuta (Galluzzo et al., 2006; Marino et al., 2011). Eppure i flavonoidi possiedono una lunga storia nella scienza. La loro attività biologica, infatti, fu riportata negli anni 40 dello scorso secolo come il principio antiestrogenico che causava l'infertilità negli allevamenti di ovini nell'Ovest dell'Australia. Questi effetti fecero inserire i flavonoidi nella nascente classe degli interferenti endocrini: sostanze in grado di alterare la sintesi, il trasporto e l'azione degli ormoni, principalmente di quelli steroidei (Galluzzo et al., 2006). Il nostro gruppo di ricerca si occupa da anni di individuare i meccanismi di azione dei flavonoidi dipendenti o indipendenti dal legame con i recettori degli ormoni steroidei sessuali nell'ottica di definire gli effetti positivi e/o quelli negativi di queste sostanze (Totta et al., 2004; Bulzomi et al., 2010; Galluzzo et al., 2009; Galluzzo et al., 2006; Galluzzo et al., 2008; Pellegrini et al., 2014a; Pellegrini et al., 2014b; Bulzomi et al., 2012). I risultati ottenuti hanno messo in evidenza la capacità di due differenti flavonoidi (naringenina e quercetina) di legare i recettori per gli estrogeni α e β modificandone selettivamente il meccanismo di azione. In particolare, è stato messo in evidenza come, in presenza di naringenina (Nar), un flavanone presente principalmente nel pompelmo e nell'arancia ai quali fornisce il tipico gusto amaro (Erlund et al., 2002), i recettori modificano la loro associazione a proteine di segnale modificando, in questo modo, il bilancio tra proliferazione/apoptosi, proliferazione/ differenziamento e sintesi/degradazione dei recettori estrogenici (Totta et al., 2004; Galluzzo et al., 2009; Galluzzo et al., 2008; Marino et al., 2011 Marino et al., 2012).

Accanto agli effetti protettivi nei confronti della proliferazione cellulare, studi condotti "in vivo", hanno ampiamente dimostrato le potenzialità normolipidemiche della Nar (Borraidile et al., 1999; Lee et al., 2001; Kim et al., 2006; Jung et al., 2003). Questi studi suggeriscono che la Nar possa essere utilizzata come farmaco nella prevenzione delle malattie cardiovascolari, o comunque in tutte quelle patologie che sono in qualche modo correlate a dismetabolismo lipidico.

Sebbene l'effetto antilipidemico della Nar sia oramai accertato, non sono completamente noti i meccanismi alla base di tale attività. Sebbene gli estrogeni ed i loro recettori siano profondamente coinvolti nel metabolismo lipidico, non è mai stato studiato se l'effetto anticolesterolemico della Nar sia mediato dai suddetti recettori nucleari. Scopo del nostro lavoro è stato quello di studiare il coinvolgimento degli ER nella modulazione del metabolismo del colesterolo indotta dalla Nar utilizzando come modello sperimentale una linea cellulare di derivazione epatica, HepG2, che esprime soltanto ERa. In queste cellule tale recettore non è in grado di attivare la trascrizione, pertanto questa linea cellulare costituisce un ottimo modello sperimentale per valutare, da una parte, la modulazione del metabolismo del colesterolo indotta dalla Nar in cellule di derivazione epatica, dall'altra, l'eventuale coinvolgimento in questo processo di vie non genomiche attivate dal legame di ER con il flavanone. Le cellule sono state trattate con varie concentrazioni di Nar (0.1 µM, 1 µM, 10 µM) per 24 ore, successivamente sono stati valutati i livelli delle proteine che sono coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi del colesterolo cellulare (Figura 1). L'eventuale coinvolgimento di ER nella modulazione del metabolismo del colesterolo indotta da Nar è stato saggiato utilizzando l'inibitore puro per ER, ICI 182780 (1 μM) (Figura 2), oppure con l'inibitore specifico per ER $\alpha$ , Endoxifen (1  $\mu$ M).

I risultati principali mostrano che il trattamento con Nar riduce in maniera dose dipendente i livelli dell'enzima chiave della via biosintetica del colesterolo, idrossi metil glutarril Coenzima A reduttasi (HMGR) (da rocha et al., 2013), inducendone anche l'aumento dello stato di fosforilazione. Questo indica che il trattamento con Nar è in grado di ridurre la sintesi di colesterolo. Contemporaneamente, si osserva un aumento dei livelli del recettore per le LDL (LDLr) (Fig. 1), il cui incremento è strettamente correlato alla diminuzione della colesterolemia (Trapani et al., 2012). Inoltre, il trattamento con gli inibitori per i recettori degli estrogeni mostra

che, sia ICI 182780 (Fig. 2) che Endoxfen, sono in grado di bloccare gli effetti esercitati dalla Nar ( $1\mu M$ ) sull'HMGR ma non su LDLr.

Tutti insieme i nostri dati dimostrano che gli effetti ipocolesterolemici della Nar sono strettamente correlati alla capacità di questo flavanone di modulare il *network* proteico che regola il mantenimento dell'omeostasi del colesterolo a livello cellulare agendo sia sull'enzima chiave della sintesi del colesterolo che sul recettore in grado di internalizzare le lipoproteine contenenti colesterolo. Inoltre, noi dimostriamo per la prima volta che ERa fa parte del "macchinario" utilizzato dalla Nar per esercitare i suoi effetti ipocolesterolemici. Questo risultato in particolare dà un nuovo volto ad un composto che è a tutti gli effetti un interferente endocrino e fornisce una nuova visione dell'impatto che alcuni interferenti endocrini presenti nella dieta possano avere sulla saluta umana.

#### Letteratura

Borradaile et al., (1999) Lipids 34, 591-598.

Bulzomi et al., (2010) IUBMB Life. 62:51-60.

Bulzomi et al., (2012) J Cell Physiol. 227:1891-1898.

da Rocha et al., (2013) Curr Med Chem 20, 4426-4434.

Erlund et al., (2002) Eur J Clin Nutr 56, 891-898.

Galluzzo et al., (2006) Genes Nutr. 1:161-176.

Galluzzo et al., (2008) Endocrinology. 149:2567-2575.

Galluzzo et al., (2009) Mol Nutr Food Res. 53:699-708.

Jung et al., (2003) Clin Nutr 22, 561-568.

Kim et al., (2006) J Med Food 9, 582-586.

Lee et al., (2001 Biochem Biophys Res Commun 284, 681-688.

Marino et al., (2011) Mol Aspects Med. 32:1-70.

Marino et al., (2012) Steroids 77, 910-917.

Pellegrini et al., (2014a) Genes Nutr. 9:425.

Pellegrini et al., (2014b) J Cell Physiol. 229:1061-1068.

Totta et al., (2004) IUBMB Life 56, 491-499.

Trapani et al., (2012) World J Hepatol 4, 184-190.

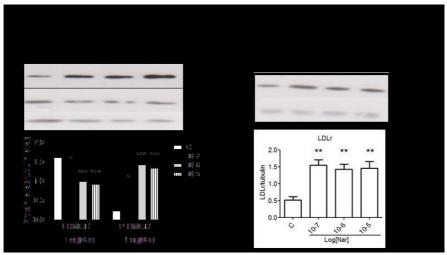


Fig. 1

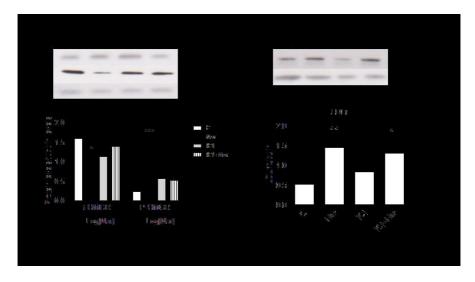


Fig. 2

## INTERFERENTI ENDOCRINI ED INFERTILITÀ: RISULTATI SPERIMENTALI SU CELLULE ENDOMETRIALI UMANE

## Maurizio Forte

Laboratorio Nazionale di Interferenti Endocrini, Consorzio Interuniversitario INBB Istituto di Genetica e Biofisica "ABT", Consiglio Nazionale delle Ricerche

Negli anni recenti si è avuto un notevole incremento delle patologie collegate all'endometrio, che il più delle volte hanno come conseguenza problemi di fertilità o impossibilità nel portare a termine la gravidanza. Molte evidenze sperimentali suggeriscono che età, dieta, genetica e inquinamento ambientale sono i fattori di rischio per la fisiopatologia endometriale. Tra gli inquinanti ambientali, gli interferenti endocrini (IE) causano un disequilibrio ormonale che si riflette in disfunzioni a carico dell'apparato riproduttivo maschile e femminile. Studi su modelli animali e cellulari, nonché indagini epidemiologiche, suggeriscono una stretta correlazione tra esposizione umana agli IE e patologie a carico dell'endometrio, endometriosi e cancro incluse. In questo lavoro abbiamo studiato gli effetti di due IE largamente utilizzati, il Triclosan (TCL) e il Bisfenolo A (BPA) su cellule endometriali stromali umane (ESCs), derivanti da campioni di donne in età fertile non affette da endometriosi. E' stato valutato il loro effetto sulla proliferazione e sul ciclo cellulare, sulla migrazione e sul meccanismo di decidualizzazione. Tali colture primarie, rappresentano un utile modello in vitro di endometrio umano, grazie alla loro abilità di differenziare in cellule della decidua a seconda delle loro condizioni di crescita in vitro (estradiolo e progesterone). I trattamenti sono stati effettuati per un tempo di 48h, sia utilizzando concentrazioni ambientali di IE, testati separatamente (10<sup>-5</sup>M, 10<sup>-8</sup>M, 10<sup>-11</sup>M), sia dopo il pre- trattamento delle ESCs con uno stimolo di decidualizzazione, quale il progesterone (10<sup>-6</sup> M). In questo modo è stato simulata l'azione di interferenza del TCL e del BPA su un endometrio in fase proliferativa e su un endometrio in fase secretiva del ciclo mestruale. Dai nostri risultati è emerso che sia il TCL che il BPA non agiscono sul meccanismo di proliferazione, tuttavia è stato registrato un aumento di cellule nella fase G2/M del ciclo cellulare, mediante analisi citofluorimetrica. Abbiamo dimostrato, inoltre, attraverso test di migrazione cellulare, la loro abilità nell'aumentare la capacità migratoria delle ESCs. Per quanto concerne il meccanismo di decidualizzazione, sia il TCL che il BPA hanno mostrato

un' up- regolazione dell'espressione genica e dei livelli proteici di marker specifici del differenziamento cellulare, quali la prolattina (PRL), il LEFTY e l'Insulin growth factor binding protein 1 (IGFBP1), aumentando l'effetto del progesterone. Questi dati suggeriscono che gli IE agiscono sul compartimento stromale dell'endometrio, interferendo con i pathway molecolari della decidualizzazione; essi sono potenzialmente in grado di innescare tale meccanismo anche in assenza di uno stimolo di differenziamento e altresì potenziare gli effetti del progesterone. In conclusione, i risultati di tale studio dimostrano che stimoli esterni, quali gli IE, possono rendere l'utero incapace di accomodare la blastocisti con conseguente difficoltà nel portare a termine una gravidanza. In aggiunta, sia il TCL che il BPA devono essere presi in considerazione come fattori di rischio per infertilità e aborti spontanei.

# SESSIONE "Una ricerca italiana di successo nella terapia di malattie epatiche e metaboliche: acido obeticolico"

## DAGLI ACIDI BILIARI NATURALI A QUELLI SEMISINTETICI UNA SORPRENDENTE EVOLUZIONE DELLA CHIMICA E BIOLOGIA MOLECOLARE

## Aldo Roda

Dipartimento di Chimica G.Ciamician, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna

Gli acidi biliari (AB) svolgono molteplici funzioni fisiologiche all'interno del circolo enteroepatico, quali stimolazioni del flusso biliare e della secrezione lipidica , trasporto e assorbimento intestinale di sostanze nutritive lipofile , solubilizzazione ed escrezione di colesterolo , oltre ad effetti antimicrobici e metabolici . Gli AB possono in parte "sfuggire" dal circolo enteroepatico per ripartirsi nella circolazione sistemica, particolarmente in fase postprandiale e raggiungere tessuti extraepatici come i muscoli e il tessuto adiposo bianco.

Dai lontani anni 70 fino alla fine degli anni 90 le conoscenze sulla biochimica, fisiologia degli AB erano limitate a queste funzioni, attribuendo agli AB un ruolo quasi esclusivo di detergenti naturali in grado di formare micelle con i fosfolipidi e trasportare sostanze lipofile ed in particolare il colesterolo. Gli AB rappresentano la via principale di escrezione del colesterolo corporeo da cui sono sintetizzati e nello stesso tempo sono responsabili della sua solubilizzazione e trasporto biliare.

In quegli anni alcuni AB naturali furono proposti e commercializzati come farmaci per la dissoluzione dei calcoli biliari di colesterolo con un discreto successo. Il primo acido biliare fu l'acido chenodesossicolico che alla dose somministrata di circa 200-400 mg/die risultò poco tollerato e sostituito poi negli anni 80 dal suo epimero acido ursodesossicolico, molecola meno detergente e citotossica che è a tutt'oggi in commercio.

Tale molecola è presente nella bile secca di orso e da millenni utilizzata nella medicina tradizionale Cinese, "Yutau", principalmente per il trattamento delle epatopatie colestatiche . La ricerca chimico-farmaceutica negli anni 90 è stata rivolta a comprendere il meccanismo di azione di tale molecola e al disegno empirico, sulle basi di evidenze sperimentali ,di analoghi semisintetici con ottimizzate proprietà chimico fisiche e migliore capacità di sciogliere i calcoli biliari e da un altro lato molecole meno tossiche in grado di agire come epatoprotettori.

Non era chiaro allora perché dal colesterolo fossero sintetizzati più AB: due AB l'acido colico e l'acido chenodesossicolico e poi perché questi due venissero ulteriormente metabolizzati a livello della flora batterica intestinale!! Era difficile comprendere il meccanismo del trasporto epatico, captazione ed escrezione biliare, e quello che regolava l'assorbimento intestinale attivo mediati da carierà e trasportatori: in parole povere si era arrivati ad una situazione stagnante e con poche prospettive di sviluppo di nuove molecole.

Ed ecco la grande svolta avvenuta negli ultimi venti anni grazie al continuo avanzamento della biologia molecolare: gli AB, da semplici tensioattivi digestivi a molecole con attività ormonale di "signaling" in una vasta gamma di funzioni biologiche, tra le quali metabolismo glucidico e lipidico, e modulazione della risposta immunitaria. Le funzioni di regolazione degli AB sono principalmente il risultato di attivazione di recettori intracellulari nucleari come FXR e il recettore di membrana TGR5 e ciò era selettivo per un particolare AB spiegando così la sintesi di diversi AB dal colesterolo. L'acido chenodesossicolico (CDCA) è il ligando più potente per il recettore FXR mentre l'acido litocolico (LCA) e acido taurolitocolico (TLCA) sono

ligandi endogeni più attivi su TGR5. FXR è stato considerato come il principale regolatore della sintesi e secrezione degli AB, e del metabolismo lipidico e glucidico nel fegato e nell' intestino. Al contrario, l'attivazione di TGR5 da parte di AB gioca un ruolo importante nella regolazione del metabolismo energetico nel tessuto adiposo bruno, sulla motilità della colecisti e secrezione di glucagone-like peptide 1 (GLP-1) nelle cellule endocrine intestinali per il controllo della motilità gastrointestinale. In parole povere gli AB hanno la funzione nel fegato di gastrointestinali modulando il metabolismo dei nutrienti co-assorbiti, come i lipidi e glucosio. L'identificazione di questi meccanismi di regolazione e della struttura 3D dei recettori ha fornito le basi molecolari per lo sviluppo di nuovi ligandi semisintetici molto più potenti degli AB naturali e quindi utilizzabili per il trattamento di malattie epatiche come la NASH, dislipidemia ,diabete e sindrome metabolica. Avendo a disposizione un target terapeutico, metodi di screening di biologia molecolare con conseguente razionale "drug design" il prof. Pellicciari a Perugia ha sviluppato un nuovo analogo dell'acido Chenodesossicolico con una sorprendente attività (almeno 100 volte superiore all'analogo naturale, come agonista del recettore FXR: l'acido Obeticolico (OCA). Questa scoperta non è stata casuale ed è nata da un'esperienza di più di venti anni di ricerche sugli AB da parte del gruppo del prof. Pellicciari e da un

approccio di notevole qualità scientifica e metodologica nel settore della "Medicinal Chemistry".

Il prof Pellicciari credendo fortemente in questa sua scoperta, con Mark Pruzanski, ha fondato alla fine degli anni 90 una startup chiamata Intercept dove ha sviluppato tale molecola unitamente con i suoi laboratori all'Università di Perugia. Tale scoperta è stata accolta con un iniziale scetticismo o meglio incredibilità da parte della comunità scientifica medica del settore, ma la ricerca e sviluppo è proseguita con notevoli investimenti e successi di tutti i trials preclinici e clinici fino ad arrivare alla fase finale di approvazione sul mercato USA da parte della FDA come farmaco per il trattamento della cirrosi biliare primitiva e con studi attualmente in corso per allargare le sue indicazioni a patologie molto più diffuse tra le quali la NASH e diabete e sindrome metabolica. Sono, quindi, stato testimone di un evento molto esclusivo ed unico iniziato negli anni 80 e che grazie alle più recenti scoperte del ruolo fisiologico degli AB ha portato allo sviluppo di un farmaco con nuove e sorprendenti indicazioni terapeutiche attivo a dosi molto basse. Questo è il primo AB di semi-sintesi entrato in commercio e sicuramente per il Prof. Pellicciari non sarà neanche l'ultimo perché la ricerca continua a Perugia per individuare molecole sempre più attive anche per altri target terapeutici. Una ricerca tutta Italiana che ha portato alla realizzazione di una società quotata in borsa sul mercato NASDAQ di Wall Street considerata una delle tre migliori Biotec USA, di cui sul Sole 24 Ore si scrive:

"Il Biotec Italiano piace negli USA .Un'altra start-up biotech italiana, Intercept Pharmaceuticals, che si basa su una farmaco inventato da Roberto Pellicciari, professore all'Università di Perugia e co-fondatore della società, raggiunge il clamoroso valore di 8,8 miliardi di dollari.

Sono particolarmente grato al caro amico prof. Pelliccari con il quale abbiamo avuto e continuiamo ad avere una fattiva collaborazione scientifica, resa concreta da numerose pubblicazioni scientifiche e da continui scambi e discussioni sulle nuove molecole sintetizzate a Perugia e in parte studiate anche nel mio laboratorio dell'Università di Bologna. Il segreto è stato quello di non dimenticare e unire le vecchie conoscenze con le più recenti e ciò ha creato un potente sinergismo con il risultato che tutti possono osservare.

## LA SCOPERTA DELL'ACIDO OBETICOLICO. STORIA E PROSPETTIVE DI UN SUCCESSO DELLA RICERCA ITALIANA

### Roberto Pellicciari

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche

TES PHARMA Srl.

Via Palmiro Togliatti 20, 06073 Loc. Taverne, Corciano (PG), Italy

La scoperta dell'Acido Obeticolico (OCA), l'acido biliare semisintetico attualmente nella fase traslazionale finale del percorso 'from bench to bed', è il frutto maturo delle ricerche sugli acidi biliari svolte a partire da metà degli anni '70 del secolo scorso da gruppi di ricerca italiani sia accademici che industriali. Ero stato convinto ad entrare nel mondo ristretto degli acidi biliari da Aldo Roda e Alan Hoffman, conosciuti a S. Diego (USA) nell'autunno del 1981 e a questo incontro erano seguiti più di 10 anni di intensa e proficua collaborazione. Poi, circa a metà degli anni '90, le mie ricerche si erano gradualmente spostate dagli acidi biliari a temi di ricerca allora più all'avanguardia. E così fino a maggio del 1999, quando tre diversi gruppi di ricerca avevano riportato che gli acidi biliari erano i ligandi endogeni del recettore nucleare FXR, sino ad allora orfano. Tra gli acidi biliari endogeni, l'acido chenodesossicolico (CDCA) si era rivelato quale il più potente agonista FXR, con un valore di EC50 = 15 μM. Questo valore, inusualmente alto soprattutto se confrontato con i valori nanomolari dei ligandi steroidici di recettori nucleari classici, era spiegabile con la funzione del recettore FXR, un 'sensore' attivato da acidi biliari solo a concentrazioni vicine alla loro soglia tossica. Una volta attivato, questo recettore era in grado di proteggere le cellule epatiche ed intestinali dalle conseguenze dannose di un sovraccarico cellulare di acidi biliari, di mantenere l'unità funzionale della circolazione enteroepatica, di regolare l'omeostasi dei lipidi e del glucosio. Erano evidenti l'importanza che assumevano gli acidi biliari nel loro nuovo ruolo di 'signaling molecules' e le potenzialità terapeutiche di questa scoperta. Per una caratterizzazione fisiologica e farmacologica del recettore FXR servivano 'chemical tools' efficienti e il CDCA e gli altri acidi biliari naturali erano inadatti a questo scopo a causa della bassa potenza e della loro tossicità alle concentrazioni necessarie per l'attivazione del recettore. A giugno del 1999 eravamo già rientrati nel campo degli acidi biliari ed eravamo alla ricerca di un 'super-CDCA', potente e selettivo che servisse a questo scopo. La chimica degli acidi biliari è particolarmente

difficile, anche per chimici di sintesi di lunga esperienza, ma il nostro lavoro era facilitato dalla memoria chimica 'storica' maturata nei lunghi anni di collaborazione con il gruppo di Aldo Roda. Iniziammo con modifiche mirate alla catena laterale e al nucleo del CDCA. Inviammo una prima serie di derivati a Tim Willson (GSK, North Carolina, USA), per il FRET screening e risultò che uno di essi, il 6-alpha-metil-CDCA era 10 volte più potente del CDCA stesso. Avevamo trovato il punto 'sensibile' del CDCA che esplorammo ulteriormente preparando una serie di C-6 alchilderivati a ingombro sterico crescente. Anche questa seconda serie di composti fu spedita a Tim Willson che, qualche tempo dopo, ci chiamò per dirci con entusiasmo che uno dei derivati, quello con un gruppo 6-alphametilico era, con un EC50=99 nM 100 volte più attivo del CDCA di partenza. Era il 'chemical tool' che cercavamo e iniziò subito, a Perugia e in North Carolina, la caratterizzazione biologica e farmacologica preliminare della nuova molecola. Pensavamo allora, con quel composto finito di sintetizzare il 15 dicembre 1999, e conosciuto oggi come Acido Obeticolico di essere sulla via buona e una che non sarebbe stata troppo lunga. Si trattava, in fondo, del CDCA, a cui era stato appena aggiunto un 'magic ethyl'...

Sono passati quasi 15 anni da allora. L'acido obeticolico ha percorso le tappe precliniche e cliniche necessarie per arrivare ai pazienti accompagnato in questa lunga strada, con grande dedizione e capacità, da Mark Pruzanski, che l'aveva 'preso in consegna' da noi nel 2002. Anche nel mio gruppo, in un contesto diverso, l'OCA ha continuato a svolgere un ruolo importante. Le conoscenze chimiche, computazionali e biologiche che questo composto ha permesso di generare, infatti, sono state alla base della scoperta di acidi biliari semisintetici di nuova generazione, alcuni dei quali verranno brevemente illustrati.

## RUOLO DELL'ASSE ENTERO EPATICO FXR-FGF19 NELLA PREVENZIONE E CURA DELLE MALATTIE EPATICHE DALLA COLESTASI ALL'EPATOCARCINOMA

## Antonio Moschetta

Università degli Studi Aldo Moro di Bari

I sali biliari sono molecole anfipatiche sintetizzate nel fegato e rilasciate nell'intestino dopo i pasti per facilitare l'assorbimento di nutrienti liposolubili. Essi hanno proprietà intrinseche detergenti e per questo motivo sono tossici. Quando i loro livelli sono anormali, e in particolare elevati, agiscono promuovendo l'insorgenza di tumori, inducendo infiammazione, iperproliferazione, danni ossidativi al DNA e resistenza alla morte cellulare programmata (apoptosi). Per questo motivo, strategie che controllano la loro concentrazione attraverso la regolazione della loro sintesi, trasporto e metabolismo, sono di fondamentale importanza per proteggere la salute di fegato e intestino. La corretta omeostasi dei sali biliari è garantita dall'attività coordinata di due importanti regolatori: il Farnesoid X Receptor (FXR) e il Fibroblast Growth Factor 19 (FGF19). FXR è un recettore nucleare ed un fattore di trascrizione che si attiva quando i sali biliari si legano ad uno specifico dominio di questo recettore. Una volta attivato nell'intestino, FXR trascrive il suo target FGF19, un ormone che viaggia nella circolazione enteroepatica fino al fegato dove agisce bloccando la sintesi dei sali biliari. La regolazione anomala dell'omeostasi dei sali biliari è nota per essere associata ad un aumentata incidenza delle malattie dell'asse enteroepatico, incluse le malattie infiammatorie intestinali e i tumori epatici e del colon-retto. La scoperta di questo asse molecolare FXR-FGF19 e dei meccanismi fisiologici alla base del loro funzionamento apre nuove prospettive terapeutiche nell'ambito delle malattie del circolo enteroepatico.

## EFFETTI DI OCA SU SINDROME METABOLICA E NASH

## Linda Vignozzi

Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio"- Università di Firenze

La sindrome metabolica (MetS) è l'insieme di alterazioni multiple di fattori di rischio quali alterata tolleranza glucidica, dislipidemia, ipertensione arteriosa, obesità viscerale e insulino-resistenza, correlate ad uno stato proinfiammatorio e protrombotico, responsabili di un aumento dei casi di incidenza di malattie cardiovascolari e steatosi epatica. Recenti studi hanno dimostrato la stretta correlazione tra MetS e comorbilità età-dipendenti come ipogonadismo/disfunzione erettile (ED). Inoltre, si ritiene che la steatoepatite non alcolica (NASH), elemento caratterizzante la MetS a livello epatico, abbia un ruolo determinante nello sviluppo di malattie cardiovascolari (CVD) associate alla MetS. E' noto che l'insulino-resistenza è considerata l'elemento di connessione tra la disfunzione del tessuto adiposo (AT) e la steatosi e infiammazione epatica in presenza di sindrome metabolica. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare gli effetti del trattamento in vivo con un agonista selettivo semisintetico del recettore FXR. l'OCA, un acido chenodesossicolico derivato dal 6α-etilchenodesossicolico, sul tessuto adiposo viscerale (VAT), sulla capacità adipogenica di preadipociti (rPADs) isolati dal VAT e sul fegato di conigli HFD e conigli di controllo. Il presente studio ha valutato questa ipotesi, utilizzando un modello animale non genomico di MetS, indotto alimentando conigli maschi adulti con una dieta ricca di grassi (HFD) per 12 settimane. Tale modello ripropone molto strettamente il fenotipo umano di MetS. Un sottogruppo HFD è stato trattato con OCA(10 mg/Kg per cinque giorni a settimana per via orale). I conigli alimentati con una dieta standard sono stati usati come controllo. Abbiamo dimostrato che il trattamento con OCA è in grado di ridurre l'insulino-resistenza e di migliorare il profilo metabolico, inducendo anche una significativa riduzione della quantità di tessuto adiposo viscerale nel nostro modello animale. Tale effetto è mediato dall'attivazione di FXR poiché il trattamento con INT-777, un agonista selettivo del recettore TGR5, non è stato in grado di migliorare i parametri metabolici sopracitati. Per valutare l'adipogenesi, le rPADS sono state trattate con differenti cocktail differenziativi. Nel VAT isolato da conigli HFD si è osservato un aumento significativo delle dimensioni degli adipociti, dell'ipossia e dell'espressione di perilipina e di GLUT4

(SLC2A4) citosolico, trasportatore del glucosio insulino-dipendente. Tali parametri erano normalizzati dal trattamento con OCA. Le rPADs isolate dai conigli HFD sono risultate meno sensibili all'insulina, dimostrato la riduzione di uptake di glucosio insulino-dipendente, la riduzione della sintesi dei trigliceridi e della capacità adipogenica nonché la alterata capacità di fusione delle gocce lipidiche. Il trattamento con OCA ha mantenuto inalterate le funzioni metaboliche precedentemente menzionate. A livello epatico, abbiamo osservato un aumento di espressione di markers di steatosi e di infiammazione nei conigli HFD: alterazioni normalizzate dal trattamento con OCA. Sia l'analisi istomorfologica che l'analisi di espressione genica hanno dimostrato la presenza di NASH nei conigli HFD. Numerosi geni implicati nel processo infiammatorio (tra cui TNFα), nell' attivazione delle cellule stellate, nella fibrosi e nel metabolismo lipidico mostravano una associazione negativa con la massima risposta rilasciante indotta dall'acetilcolina (Ach) nel pene. Considerando la presenza di queste correlazioni, è stata eseguita un'analisi multivariata per verificare la relazione specifica di ogni singolo gene espresso con la risposta massima indotta dall' Ach. I geni epatici sopra citati sono stati quindi introdotti, come covariabili, in una serie di analisi iterative di regressione lineare, ed è emersa esclusivamente una associazione tra il TNFα espresso a livello epatico e la risposta alla Ach. In accordo, i livelli circolanti di TNFα sono risultati 15 volte più alti nei conigli HFD rispetto ai conigli di controllo. Il trattamento con OCA ha mostrato una riduzione dei livelli circolanti di TNFα e della sua espressione genica a livello epatico nonché un parallelo

In conclusione, la somministrazione di OCA nel modello di coniglio di MetS migliora la funzionalità del VAT e del fegato. OCA, infatti, è in grado di ripristinare l'insulino sensibilità in un tessuto adiposo incapace di completare la sua funzione di accumulo energetico; contrastando le alterazioni metaboliche indotte dalla MetS e la deposizione patologica di AT. Inoltre, OCA è in grado di aumentare la responsività all' Ach in conigli HFD, riducendo i livelli circolanti di TNF $\alpha$ , la cui azione sembra avere un ruolo determinante nella patogenesi della ED associata alla NASH indotta dalla MetS.

aumento dell'espressione di eNOS a livello penieno con un incremento

della responsività all'Ach.

## ACIDO OBETICOLICO NEL TRATTAMENTO DI MALATTIE EPATICHE CRONICHE: NUOVE PROSPETTIVE PER LA TERAPIA DI CIRROSI BILIARE PRIMITIVA E NASH

## Luciano Adorini

Intercept Pharmaceuticals, New York, USA

Il farnesoid X receptor (FXR) e' un recettore nucleare espresso a livelli elevati nel fegato, intestino e reni. Gli acidi biliari sono gli agonisti naturali di FXR, che regola l'espressione del gene codificante il colesterolo 7 alfaidrossilasi, l'enzima limitante nella sintesi degli acidi biliari. Questi meccanismi controllano la dimensione del pool di acidi biliari, favorendo la coleresi e riducendo l'esposizione epatica agli acidi biliari prevenendo così il danno epatico indotto da colestasi. Inoltre, FXR ha un ruolo critico nella regolazione del metabolismo glucidico e lipidico, e la sua attivazione ha effetti anti-infiammatori e antifibrotici. Questi meccanismi di azione sottolineano il razionale terapeutico per agonisti FXR nelle epatopatie colestatiche quali la cirrosi biliare primitiva (PBC), patologia in cui l'attivazione di FXR protegge il fegato anche dallo sviluppo di fibrosi e cirrosi. Inoltre, l'attivazione di FXR inibisce la steatosi epatica in modelli animali di steatosi epatica non alcoolica (NAFLD) e steatoepatite non alcoolica (NASH), e migliora vari parametri di malattia, inclusi iperlipidemia, infiammazione, fibrosi epatica, intolleranza al glucosio e sensibilità all'insulina.

L'acido obeticholico (OCA) e' il  $6\alpha$ -etil derivato dell'acido chenodesossicolico (CDCA), l'acido biliare naturale che e' l'agonista endogeno di FXR nell'uomo. OCA e' un agonista selettivo di FXR ed è  $\sim$  100 volte più potente di CDCA. Numerosi studi preclinici hanno dimostrato la capacità di OCA di indurre coleresi ed esercitare una azione epatoprotettiva, di aumentare la sensibilità all'insulina e regolare il metabolismo del glucosio, di modulare il metabolismo lipidico e di indurre attivita' antinfiammatorie con marcati effetti antifibrotici.

Molteplici studi clinici hanno dimostrato che OCA è sicuro ed efficace. In tre studi clinici di OCA in pazienti con PBC, una malattia colestatica di origine autoimmune, OCA ha dimostrato di ridurre significativamente la fosfatasi alcalina sierica (ALP), un importante marcatore del livello di malattia che correla bene con gli esiti clinici dei pazienti affetti da PBC. In uno studio clinico di fase II in pazienti con diabete mellito di tipo II e

NAFLD, la somministrazione di OCA è stata ben tollerata, ha aumentato la sensibilità all'insulina e ridotto i marcatori di infiammazione e fibrosi epatica. Questi dati sono stati confermati ed estesi in uno studio in pazienti affetti da NASH. Questo studio ha arruolato 283 pazienti con NASH in otto centri statunitensi. I pazienti sono stati randomizzati per ricevere una dose di 25 mg di OCA o placebo per 72 settimane. I pazienti arruolati nello studio sono stati qualificati basati su una diagnosi determinata da biopsia epatica all'inizio dello studio, con un punteggio di attività NAFLD (NAS) di quattro o superiore e con un punteggio di almeno uno in ogni componente della scala NAS (steatosi, infiammazione lobulare, rigonfiamento epatocitario). Lo studio ha raggiunto significativamente gli obbiettivi primari e secondari, dimostrando riduzioni significative in tutti i componenti NAS e riduzione significativa della fibrosi epatica. Questo ultimo risultato e' particolarmente importante, in quanto la fibrosi epatica avanzata è attualmente il miglior predittore di mortalità correlata al fegato nei pazienti affetti da NASH.

Agonisti FXR, quali OCA, rappresentano quindi una interessante classe di farmaci per i pazienti con malattie epatiche croniche, in quanto, oltre al loro ruolo fondamentale nella regolazione degli acidi biliari, carboidrati e il metabolismo dei lipidi, possiedono anche potenti proprietà anti-infiammatorie e anti-fibrotiche. L'esperienza clinica con OCA nei pazienti con malattia epatica cronica indica che gli agonisti FXR sono efficaci e sicuri, con effetti collaterali limitati a esacerbazione di prurito e modeste modificazioni dell'assetto lipidico. Studi clinici più estesi e di maggior durata sono attualmente in corso per valutare ulteriormente la sicurezza di questo composto ed esplorare gli effetti benefici di OCA in pazienti affetti da malattie croniche del fegato.

## SESSIONE "Medicina Rigenerativa: nuovi paradgmi in biologia cellulare"

## MEDICINA RIGENERATIVA: NUOVI PARADIGMI IN BIOLOGIA CELLULARE

### Carlo Ventura

Dip. Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna

Centro di Ricerca Medicina Rigenerativa SWITH – Lugo (RA) Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi"

Le cellule staminali offrono una speranza senza precedenti per la cura e forse la guarigione di tessuti gravemente danneggiati che non possono essere salvati nemmeno dai trattamenti farmacologici o chirurgici più avanzati. Questa prospettiva ha aperto la strada ad un nuovo paradigma nella gestione di malattie complesse, la cosiddetta "Medicina Rigenerativa", che ha la potenzialità di guarire malattie oggi cronicizzate e di aiutare un invecchiamento sano e attivo, con eccezionali ricadute di natura socioeconomica.

Il settore della Medicina Rigenerative e delle Cellule Staminali ha ricevuto un notevole impulso dalla recente osservazione che mediante trasferimento genico con vettori virali di soli tre-quattro geni, è possibile riprogrammare cellule somatiche umane adulte non-staminali (es. fibroblasti della cute) o cellule staminali umane adulte multipotenti (es. cellule staminali mesenchimali) fino a diventare addirittura cellule staminali similembrionali. Accanto a questo scenario prettamente scientifico si è aperto anche un complesso contesto normativo ed economico. Infatti, nell'ambito di una terapia cellulare, le cellule staminali si configurano giuridicamente come farmaci e come tali devono essere quindi isolate, caratterizzate, espanse e crioconservate secondo modalità strettamente codificate a livello internazionale (le cosidette "GMP"). Dal punto di vista economico, le ricadute della Medicina Rigenerativa sono cruciali per la sostenibilità dei costi della sanità pubblica in una popolazione sempre più anziana. Il fatturato dei prodotti a base cellulare cresce ad un ritmo del 10-15% /anno e si prevede che raggiungerà i 6.6 Miliardi di Dollari nel 2016.

L'INBB è attivo nel campo soprattutto nell'ambito del Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria Cellulare dell'INBB, presso l'Università di Bologna, diretto dal Prof. Carlo Ventura, con la realizzazione di strategie innovative di medicina rigenerativa del danno cardiovascolare. Sempre come risultato delle attività del Laboratorio INBB sono state identificate molecole naturali in grado di fungere da registi della cardiogenesi in cellule staminali e sono state sintetizzate nuove molecole a

"logica differenziativa e paracrina". Sono stati sviluppati cocktails di molecole naturali in grado di aumentare l'attività paracrina di cellule mesenchimali staminali umane, anche a supporto della sopravvivenza e funzionalità in vivo di isole pancreatiche. E' stata prodotta la prima evidenza in letteratura della capacità di campi magnetici di modulare il grado di multipotenza della cellule staminali, assieme alla loro capacità differenziativa verso fenotipi multipli. E' stata prodotta la prima evidenza in letteratura della possibilità di riprogrammare con campi elettromagnetici cellule umane adulte somatiche non-staminali in senso cardiaco, neuronale e muscolare scheletrico, senza dover ricorrere a trasferimento genico con vettori virali e senza alterare in senso pro-oncogenico l'omeostasi cellulare. La scoperta della proprietà delle cellule di emettere vibrazioni nanomeccaniche rilevabili e udibili come onde sonore ha aperto prospettive senza precedenti per lo studio delle condizioni di salute cellulare e per la modulazione dei destini differenziativi cellulari. Nel tentativo di sviluppare sistemi di terapia cellulare rapidamente trasferibili in ambito clinico, sono stati realizzati per la prima volta un metodo ed un dispositivo capaci di isolare dal tessuto adiposo umano una frazione micronizzata contente una nicchia vasculo-stromale intatta e, al suo interno, cellule staminali mesenchimali e periciti. Tale forma di tessuto, a differenza del lipoaspirato, è crioconservabile, anche da donatore cadavere, senza alcuna perdita della architettura della nicchia vasculo-stromale e della vitalità dei suoi elementi cellulari. L'impegno dei ricercatori INBB nel settore specifico è anche riportato dalle relazioni sulle attività svolte presentate nell'ambito dei Convegni Nazionali INBB, tra i quali si ricordano quelli più recenti relativi al IX Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 21-22 Ottobre 2010 e del X Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 22-23 Ottobre 2012, il cui programma dettagliato con gli abstract delle relazioni è presente sul sito www.inbb.it

Recentemente, l'INBB ha stabilito un accordo di partnership con la Fondazione Ettore Sansavini (FES) per la Ricerca Scientifica – ONLUS (Lugo – Ravenna) mirato a sviluppare una specifica struttura di ricerca impegnata in studi di medicina rigenerativa dotata di strutture e tecnologia di avanguardia. E' nato così a Lugo "Stem Wave Institute for Tissue Healing (SWITH)". SWITH è diretto dal Prof. Carlo Ventura e può contare su un gruppo di quattro Ricercatori anziani, tutti provenienti dal Laboratorio INBB di Biologia Molecolare e Bioingegneria Cellulare di Bologna.

Scopo principale di SWITH è quello di indagare non solo le basi molecolari delle dinamiche cellulari, ma anche di esplorare la Biologia alla luce della

Fisica, scoprendo le informazioni che sottendono l'orchestrazione dei ritmi e dei destini cellulari. In particolare, SWITH mira a realizzare ricerche e metodi innovativi che possano ottimizzare le capacità riparative delle cellule staminali, accelerando lo sviluppo di una Medicina Rigenerativa basata sul recupero e sul potenziamento della naturale capacità di autoguarigione dei tessuti danneggiati.

SWITH è stato inaugurato l'8 Maggio 2015 con una cerimonia presieduta dal Premio Nobel per la Medicina Luc Montagnier, con cui il Prof. Ventura collabora da tempo.

Di seguito vengono illustrate brevemente le linee di ricerca in via di sviluppo nel contesto della sinergia creatasi tra INBB e FES:

- Identificazione di molecole naturali registe della cardiogenesi. Questi studi hanno portato ad identificare le endorfine come registi naturali del processo della cardiogenesi in cellule staminali. Le ricerche hanno inoltre identificato per la prima volta la presenza di recettori nucleari e vie di trasduzione intranucleare del segnale per queste molecole.
- Sintesi di molecole innovative a logica differenziativa e paracrina. Per la prima volta sono stati sintetizzati esteri misti dell'acido ialuronico, butirrico e retinoico (HBR), capaci di agire con modulazione epigenetica e rimodellamento dello stato di acetilazione istonica, inducendo un notevole aumento mirato del differenziamento miocardico e vascolare di cellule staminali mesenchimali umane di diversa origine (midollo osseo, polpa dentaria, placenta a termine). Nel complesso, questi studi aprono la strada ad un salvataggio chimico, immediato e duraturo del miocardio infartuato, consentendo di evitare la formazione di tessuto fibroso cicatriziale e, nello stesso tempo, di mettere in sicurezza il tessuto cardiaco per i tempi necessari per avviare una terapia cellulare con trapianto di cellule staminali autologhe o allogeniche.
- Uso di energie fisiche per la medicina rigenerativa. Queste ricerche hanno dimostrato per la prima volta in letteratura la possibilità di utilizzare campi elettromagnetici a frequenza estremamente bassa o campi radioelettrici convogliati in modo asimmetrico per modulare la multipotenza delle cellule staminali, aumentare il potenziale differenziativo e paracrino staminale, riprogrammare cellule somatiche adulte non-staminali in elementi pluripotenti e combattere l'invecchiamento della popolazione staminale. Abbiamo inoltre dimostrato per la prima volta l'emissione di vibrazioni udibili da parte di cellule, aprendo la strada all'utilizzo del suono come "firma vibrazionale" di processi di trasformazione cellulare e come informazione utilizzabile per guidare il differenziamento e la riprogrammazione cellulare staminale e somatica.

• Sviluppo di nuovi metodi e dispositivi per l'isolamento di tessuti crioconservabili contenenti elementi mesenchimali e pericitari all'interno di una nicchia vasculo-stromale intatta. Queste ricerche hanno messo a punto un sistema ed un metodo basati sull'uso di forze meccaniche deboli per l'isolamento di una frazione micronizzata di grasso da lipoaspirati umani. Il prodotto risultante (Lipogems) è emerso essere crioconservabile, anche da donatore cadavere. Dal punto di vista biologico si tratta di un tessuto che contiene intatto al suo interno il microambiente in cui vivono le cellule staminali. Dal punto di vista normativo, il prodotto Lipogems è un derivato del tessuto adiposo con le caratteristiche di un prodotto minimamente manipolato che può essere facilmente iniettato in modo autologo nel soggetto donatore. La procedura generale è molto veloce e sicura, non richiede l'espansione o la manipolazione delle cellule staminali, e quindi non è soggetta ad alcuna delle restrizioni imposte dalle normative di buona fabbricazione.

Oltre alla sinergia creatasi con FES-SWITH, l'INBB può contare su diverse altre realtà che operano nella Piattaforma relativa a "medicina rigenerativa e cellule staminali": in primo luogo le UdR INBB delle Università di Napoli Federico Secondo e di Pavia.

## TRASFERIMENTI NUCLEARI: CLONI E MEDICINA RIGENERATIVA

### CarloAlberto Redi e Manuela Monti

Dip. Biologia e Biotecnologie "Lazzaro Spallanzani", Università degli Studi di Pavia

Centro di Medicina Rigenerativa, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia

Già Hans Spemann aveva intuito la formidabile opportunità per la ricerca biologica costituita dalla tecnica dei trasferimenti nucleari: era questo il famoso "gedanken experiment" che il grande biologo (Nobel per la fisiologia o la medicina nel 1935) potè solo sognare, "il fantastico esperimento". Potè infatti solo in minima parte realizzarlo impiegando dei capelli per effettuare dei legamenti su uova di tritoni in modo tale da far "muovere" i nuclei dei primi blastomeri da un territorio citoplasmatico ad un altro: riuscì così ad ottenere dei gemelli identici. Da allora la tecnica del "nuclear transfer", e le applicazioni che si sono venute delineando, ha compiuto progressi tecnologici tali da poter essere impiegata oggigiorno per la produzione di cloni, e di cellule staminali embrionali, grazie alla riprogrammazione genetica di nuclei di cellule somatiche una volta trasferiti in citoplasti di cellule uovo. Più recentemente, ed anche grazie alla approvazione di legislazioni ad hoc (ad esempio nel Regno Unito), la tecnica viene impiegata per la sostituzione dei mitocondri a funzionamento alterato (causa di patologie devastanti a carico del sistema nervoso e muscolare) in cellule uovo in uno schema di donazione di cellule uovo portatrici di mitocondri normali. Certamente è stato il progresso tecnologico ottenuto nel campo delle strumentazioni impiegate per muovere i nuclei da una cellula ad un'altra cellula quello che ha permesso applicazioni così ambito biologico, veterinario medico: e micromanipolatori a stantuffo alle trappole ottiche (laser) passando dall'impiego di capillari di vetro per pipette "holding" ed "injecting" sino ai sistemi piezoelettrici. Il trasferimento di nuclei è oggi impiegato per diverse applicazioni: dal trasferimento di DNA per transgenizzare a quello di spermatozoi (ICSI, Intra Cytoplasmic Sperm Injection) per riproduzione assistita, in vitro, sino a quello di nuclei somatici per clonazione riproduttiva (in medicina veterinaria) e la derivazione di staminali embrionali: quest'ultima applicazione ha valso il Nobel per la fisiologia o la medicina nel 2012 a Sir John B. Gurdon (condiviso con Shinya Yamanaka): di rilievo sia la lettura dell'orazione nel corso della cerimonia di premiazione sia la biografia del premio Nobel (http://www.nobelprize.org/nobel\_prizes/medicine/laureates/2012/gurdon-bio.html) a cui si rimanda per la rilevanza degli aspetti di epistemologia genetica sottesi alla definizione di stato funzionale di una cellula. Grazie ai trasferimenti di nuclei è possibile infatti, in termini generali ed al di la delle applicazioni sopraricordate, dissezionare operativamente il sistema di interazioni nucleo-citoplasmatiche alla base delle intricate architetture funzionali che regolano il coordinato accendersi/spegnersi genico (oltre la visione genoista).

Verranno presentate le applicazioni correnti della tecnica nella prospettiva storica, in particolare ricordando l'opportunità di eliminare le patologie mitocondriali ed i vincoli biopolitici sottesi, con particolare attenzione alla Biologia delle cellule staminali ed alla possibilità di "portare in provetta le malattie" grazie alla produzione di cellule staminali embrionali derivate da individui portatori di specifiche patologie.

Verranno brevemente ricordate anche le possibilità di produzione di gameti artificiali e le conseguenti nuove opportunità di genitorialità omo- ed uniparentali.

## NUOVE FRONTIERE NELLA RIPROGRAMMAZIONE CELLULARE: UN NUOVO APPROCCIO DI MEDICINA RIGENERATIVA MEDIANTE LA COMBINAZIONE DI STIMOLI FISICI E CHIMICI

## Margherita Maioli 1,2,3

Department of Biomedical Sciences, University of Sassari,

Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering - National Institute of Biostructures and Biosystems, Bologna, Italy

Department of Regenerative Medicine, Rinaldi Fontani Institute

La terapia cellulare basata sulle cellule staminali rappresenta attualmente un importante strumento per la medicina rigenerativa. In questo contesto le cellule staminali pluripotenti indotte (IPSC) rappresentano un'ottima fonte capace di sostituire elementi cardiaci danneggiati e privi di qualunque problematica di tipo etico. In particolare cellule IPSC derivate da urine, permettono di risolvere anche le problematiche legate all'invasività di alcune tecniche di prelievo cellulare per il paziente, ed allo stesso tempo mostrano un'elevata stabilità genetica. Il processo di cardiogenesi a partire da cellule staminali sfortunatamente avviene con un'efficienza molto bassa, ed è attualmente indotto principalmente mediante media condizionati. In passato abbiamo dimostrato come utilizzando stimoli fisici, quali campi elettromagnetici a bassa frequenza, oppure le radiofrequenze di 2.4 GHz emesse dal Radio electric asymmetryc conveyor (REAC) fossimo in grado di incrementare la resa del processo cardiogenico in cellule staminali embrionali murine (Ventura C et al Faseb J. 2004) e in cellule staminali mesenchimali umane (Maioli M. et al Cell Transplantation 2012, 2014). Le radiofrequenze emesse dal REAC hanno inoltre indotto riprogrammazione di cellule somatiche, i fibroblasti in maniera bifasica, a seconda cioè a seconda del protocollo utilizzato potevano indurre un'espressione molecolare di pluripotenzialità, oppure la comparsa di caratteristiche fenotipiche di altri lineages cellulari quali quello cardiaco, neuronale, o muscolare (Maioli M et al Cell Transplantation 2013). Recentemente abbiamo voluto combinare un medium condizionato chimicamente (Activin A and A and IWR-1, a Wnt inhibitor), con uno le radiofrequenze emesse dal REAC. L'analisi dell'espressione genica ha messo in evidenza come la combinazione dei due diversi approcci differenziativi si sia rilevata altamente efficace nell'indurre l'espressione dei geni cardiogenici GATA4, Nkx-2.5, T-Box protein 5 (TBX5) e MADS box transcription enhancer factor 2 (MEF2) e dei geni cardio specifici myosin heavy chain (MHC), troponina T (cTnT) e ACT2. Anche l'analisi mediante immunofluorescenza ha rivelato simili risultati. L'efficienza del processo di cardiogenesi è stata inoltre determinata mediante la valutazione dei foci contrattili. Abbiamo quindi descritto una metodica innovativa ed altamente efficace per riprogrammare cellule IPSC verso cardiomiociti battenti, basata sulla combinazione di uno stimolo fisico, il REAC, insieme ad uno stimolo chimico, un medium condizionato, offrendo quindi nuovi futuri approcci in medicina rigenerativa.

## REGOLAZIONE EXTRACELLULARE DELLA PLURIPOTENZA IN CELLULE STAMINALI MURINE E UMANE

## Gabriella Minchiotti

Istituto di Genetica e Biofisica "A. Buzzati-Traverso", CNR

Le Cellule Embrionali Staminali (ESCs) e le cellule staminali dell'Epiblasto (EpiSCs) del topo corrispondono a due distinti stati di pluripotenza che rappresentano, rispettivamente, le cellule della massa interna (ICM) della blastocisti (naïve ground) e quelle dell'epiblasto (primed) nell'embrione precoce. Le ESCs murine sono una popolazione eterogenea in cui le cellule sono in equilibrio dinamico fra gli stati naïve e primed. Questa condizione, definita metastabile, rispecchia la plasticità dello sviluppo embrionale precoce e garantisce alle cellule la capacità di autorinnovarsi e, allo stesso tempo, le predispone alla transizione verso EpiSCs. La comprensione dei meccanismi molecolari che determinano questo fondamentale passaggio fra i due stati di pluripotenza è ancora molto limitata e circoscritta alla funzione di proteine intracellulari/fattori di trascrizione, mentre, ad oggi, il ruolo del microambiente/fattori extracellulari è quasi completamente inesplorato. La conoscenza dei meccanismi estrinseci che determinano il passaggio dallo stato *naïve* a *primed* è fondamentale sia per la comprensione dello sviluppo embrionale precoce e delle patologie umane associate a difetti di sviluppo, che per una corretta espansione e/o controllo del differenziamento delle cellule staminali, sia per studi di biologia di base che per possibili approcci terapeutici. Dati recenti del nostro laboratorio dimostrano che la proteina extracellulare Cripto ha un ruolo chiave in questo processo. Attraverso una serie completa di dati cellulari, molecolari e di attività metabolica abbiamo che Cripto è essenziale per la generazione l'autorinnovamento delle cellule pluripotenti murine ed umane ed identificato i meccanismi molecolari coinvolti.

## HINTS TO IMPROVE THE SUCCESS RATE OF CELLULAR THERAPY BASED ON MESENCHYMAL STROMAL CELLS (MSCS): SECRETOME OF SENESCENT MSCS HAS A NEGATIVE PARACRINE EFFECT ON HEALTHY CELLS BY REDUCING THE STEMNESS AND PROMOTING THE SENESCENCE

Nicola Alessio<sup>2</sup>, Giovanni Di Bernardo<sup>2</sup>, Marilena Cipollaro<sup>2</sup>, Gianfranco Peluso<sup>3</sup>, Umberto Galderisi<sup>1,2,4#</sup>

- 1. Sbarro Institute for Cancer Research and Molecular Medicine, Center for Biotechnology, Temple University, Philadelphia, PA, USA.
- 2. Department of Experimental Medicine, Biotechnology and Molecular Biology Section, Second University of Naples, Naples, Italy.
- 3. Institute Bioscience and BioResources, CNR, Naples, Italy.
- 4. Genkök Stem Cell Centre, Erciyes University, Kayseri, Turkey.

Cell senescence has been regarded as a strictly intracellular response, with the entire signaling circuitry, which takes place within the cell. Recent findings have demonstrated that several secreted molecules are associated with, and contribute to senescence proliferative arrest.

It is evident that senescence process may greatly affect also the composition of mesenchymal stem cells (MSC) secretome through a shift from a functional paracrine signaling to production of senescent-associated secreted factors that have potent autocrine and paracrine activities. Changes in secretome profiles of MSC may great impair their activities, which depends on the capability to secrete many factors, like cytokines and chemokines.

We performed a comparative analysis of human MSC secretome from young and replicative senescent cultures and evaluate if factors secreted from old MSC cultures may induce senescence, or arrest proliferation, or promote cytotoxic effects in young cells.

Our data strongly evidenced that senescence-associated secretory phenotype (SASP) implements a full senescence response in young cells suggesting that a few senescent cells in the MSC stem cell pool may be a potent trigger for ageing phenomena through a paracrine signaling cascade.

We demonstrated that secretion of IGFBP4 and IGBP7 has a significant senescent paracrine effect on young MSC. Moreover, the inhibition of these factors also reduced the percentage of apoptosis and promoted cell growth suggesting that may have a pleiotropic effect on MSC biology.

In conclusion, we could speculate that our study could pave the way to further investigations aiming to modify, in the near future, the current in vitro MSC expansion protocols for therapeutic purposes to avoid or reduce the occurrence of negative senescence related effects.

Key Words: Mesenchymal stem cells; senescence; proteome

## SESSIONE "Misfolding Proteico, Amiloidosi e Malattie Neurodegenerative"

## MISFOLDING PROTEICO, AMILOIDOSI E MALATTIE NEURODEGENERATIVE

## Gennaro Esposito

Dip. Scienze Mediche e Biologiche, Università di Udine Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi"

Negli ultimi decenni sono state descritte nuove categorie di malattie derivanti dal ripiegamento o folding anomalo di proteine. In particolare, il ripiegamento anomalo è stato riconosciuto come comune origine per un gruppo di patologie dette amiloidosi. In queste ultime, il folding degenere o misfolding è alla base della formazione di aggregati di natura fibrosa che mostrano la cosiddetta struttura cross-β, un modo di ripiegamento generico della catena polipeptidica particolarmente stabile, accessibile in precise condizioni sia *in vitro* che *in vivo*, nonostante le diversità di sequenza e di corrispondente struttura nativa. Le patologie sono associate all'accumulo di proteine con struttura alterata in ammassi fibrosi definiti amiloide, che si depositano nell'organismo in modo specifico (amiloidosi tessuto-specifiche) o aspecifico (amiloidosi sistemiche). Tuttavia non vi sono evidenze conclusive circa l'effettiva patogenicità dei depositi amiloidi.

Il lavoro dei ricercatori INBB ha contribuito in maniera significativa alla caratterizzazione degli intermedi di misfolding e dei meccanismi di aggregazione che conducono alla nucleazione, nonché all'individuazione di possibili strategie terapeutiche.

Questi risultati sono stati ottenuti mediante la coordinazione degli sforzi di ricerca di numerosi laboratori. In particolare, l'impegno di gruppi di diverse sedi universitarie, iniziato già dal 1999 con progetti congiunti PRIN, si è concretizzato in aggregazioni nell'ambito del consorzio che, come singola unità operativa INBB, sono state finanziate per progetti FIRB (2002 e 2005) e per un progetto europeo STREP nell'ambito del 6° Programma Ouadro (2006).

L'attività dei ricercatori INBB nel settore specifico è anche documentata dalle relazioni sulle attività svolte presentate nell'ambito dei Convegni Nazionali INBB, tra i quali si ricordano quelli più recenti relativi al IX Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 21-22 Ottobre 2010 e del X Convegno Nazionale INBB, tenutosi a Roma il 22-23 Ottobre 2012, il cui programma dettagliato con gli abstract delle relazioni è presente sul sito www.inbb.it

Le prospettive future della ricerca nel campo del misfolding proteico sono legate ai progressi nella capacità di governare gli eventi di destrutturazione patologica con strumenti quali l'uso di osmoliti o di chaperone molecolari, in grado di variare la posizione nel diagramma di fase di una proteina a rischio di deposizione fibrillare, oppure all'uso di proteine chaperone, sia esogene che endogene. Recentemente sono emersi risultati anche con l'uso di costrutti ridotti da anticorpi camelidi (nanobody). Ulteriori prospettive di grande interesse sono legate alle applicazioni di nanoparticelle funzionalizzate, in corso di studio in diversi laboratori INBB.

Attualmente diverse UdR INBB operano nella Piattaforma relativa al "Misfolding proteico e amiloidosi nelle malattie neurodegenerative" formate da gruppi di ricerca di Catania, Firenze, Genova, Milano, Napoli, Padova, Pavia e Udine.

## CLUES ON THE PATHOGENESIS OF SYSTEMIC AMYLOIDOSIS FROM BIOCOMPATIBLE FIBRILLOGENESIS OF GLOBULAR PROTEINS

## Vittorio Bellotti

Dipartimento di Medicina Molecolare-Uinversita di Pavia Division of Medicine National Amyloidosis Centre UCL London UK

Mechanism of amyloid transformation of globular proteins in vivo is still a mysterious and challenging scientific issue. In the last two decades, through in vitro methods we have discovered that amyloid transition of globular proteins requires destabilization of tertiary structure and the emergence of partially folded conformers suitable for the formation of properly ordered intermolecular interactions. Fibrillogenesis of globular proteins in vitro can be obtained through different types of unfolding procedures such as low pH, high temperature, and presence of organic solvent; however almost none of these conditions can occur in vivo. We have recently shown that shear forces generated by fluid flow and exposure to hydrophobic surface can prime the fibrillogenesis of two prototypic globular proteins: transthyretin and  $\beta$ 2-microglobuli (1,2). Because proteins, in vivo, are exposed to these forces we believe that the methods we are using can reveal interesting clues on the pathophysiology of the disease.

- 1. Mangione P. et al J Biol Chem. 43:30917-30, 2013
- 2. Marcoux J .et al EMBO Mol Med 2015 in press

## I DETERMINANTI STRUTTURALI E BIOLOGICI DELLA TOSSICITÀ DI OLIGOMERI PROTEICI MISFOLDED

## Fabrizio Chiti

Sezione di Scienze Biochimiche, Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche, Università di Firenze, Consorzio Interuniversitario "Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi"

La conversione di proteine in fibrille amiloidi è un fenomeno associato ad un gran numero di malattie neurodegenerative e non neuropatiche. Gli oligomeri che si formano precocemente nel processo o che vengono rilasciati dalle fibrille mature sono tossici nei confronti delle cellule, ma i fattori strutturali inerenti gli oligomeri stessi e i fattori biologici inerenti le cellule bersaglio che subiscono la loro azione sono oggetto di studio e ad oggi non del tutto compresi.

Usando diverse condizioni sperimentali, la mutagenesi sito-specifica e chaperoni molecolari, abbiamo convertito una proteina in oligomeri che mostrano diversi livelli di tossicità. Da tali studi è emerso che l'esposizione di residui idrofobici al solvente e la flessibilità di tali residui sono determinanti chiave della tossicità degli oligomeri, così come la loro dimensione. Mediante l'utilizzo della mutagenesi sito-specifica abbiamo formato aggregati con dimensioni diverse e con diversi livelli di esposizione al solvente dei residui idrofobici ed abbiamo osservato che la tossicità di tali oligomeri correla con una combinazione di piccole dimensioni ed alta idrofobicità in un grafico tridimensionale.

La tossicità degli oligomeri è dovuta all'abilità di queste specie aberranti di interagire con la membrana plasmatica e causare un elevato influsso di ioni calcio dall'ambiente extracellulare all'interno del citoplasma, con conseguente apoptosi. Mediante la modulazione dei livelli di GM1 sulla membrana plasmatica abbiamo reso gli oligomeri tossici in specie non tossiche (abbassamento dei livelli di GM1) e gli oligomeri non tossici in oligomeri tossici (mediante innalzamento dei livelli di GM1). Ciò avviene perché cambiando i livelli di GM1 di membrana è possibile modulare l'affinità degli oligomeri per la membrana. Quando livelli uguali di oligomeri diversi sono legati alla membrana è possibile osservare livelli uguali di tossicità.

In conclusione, I dati indicano che la tossicità di oligomeri proteici di tipo *misfolded* dipende sia da determinanti strutturali inerenti gli oligomeri stessi, come la loro piccola dimensione ed esposizione al solvente di residui

idrofobici, sia determinanti biologici inerenti la composizione di membrana, come la presenza/quantità del ganglioside GM1 che determina in ultima analisi l'affinità degli oligomeri per la membrana.

## MISFOLDING PROTEICO E SISTEMI DEGRADATIVI NELLA SLA: RUOLO PROTETTIVO DELLA SMALL HEAT SHOCK PROTEIN B8

## Valeria Crippa

Istituto Nazionale Neurologico "C. Mondino", Pavia

L'aggregazione proteica è una caratteristica di diverse malattie neurodegenerative, compresa la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA). La SLA è una malattia del motoneurone che si manifesta in forma sporadica (sSLA) nel 90-95% dei casi, mentre il restante 10% dei pazienti (SLA familiare, fSLA) mostra mutazioni in specifici geni (per es. SOD1, TDP43, FUS, UBQLN2, C9ORF72, PFN1, etc...). Tali mutazioni si traducono, nella maggior parte delle proteine mutate associate alla fSLA, nella produzione di proteine con conformazione errata (misfoldate), che tendono ad aggregare, e devono per questo essere degradate per proteggere i motoneuroni dalla loro formazione. La rimozione degli aggregati è regolata dal sistema di controllo qualità delle proteine (PQC), che è composto dalle proteine chaperones (come le Heat Shock Proteins) e dai due principali sistemi di degradazione, il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) e il sistema autofago-lisosomiale (APLP). E' stato dimostrato, dal nostro e da altri gruppi di ricerca, che il sistema PQC è alterato nella SLA. Infatti, le proteine mutate associate alla fSLA aggregano sequestrando diversi componenti del sistema PQC e portando ad un'alterazione di entrambi i sistemi degradativi. Inoltre, è stato dimostrato che un blocco farmacologico dell'attività dell'UPS o dell'APLP si traduce in un severo aumento della formazione di aggregati proteici. Appare, quindi, evidente che, il sistema PQC giochi un ruolo chiave nel contrastare l'accumulo di proteine misfoldate e la conseguente formazione di aggregati intracelluari, che potrebbero essere tossici per la cellula. Comprendere come poter modulare il sistema PQC sarebbe quindi molto importante per la SLA e per le altre malattie da *misfolding* proteico.

Nei nostri studi, condotti in un modello animale di SLA (topi transgenici per la forma umana della SOD1 mutata G93A, topi Tg SOD1-G93A), abbiamo scoperto che un importante componente del sistema PQC, la proteina *small heat shock protein B8* (HSPB8), è espresso ad alti livelli nei motoneuroni che sopravvivono allo stadio terminale di malattia. Tale sovra-espressione è stata anche osservata nel midollo spinale di pazienti fSLA e sSLA, suggerendo un possibile effetto protettivo di questa proteina *chaperone*. In modelli motoneuronali di fSLA, abbiamo dimostrato che la sovra-espressione della HSPB8 previene l'aggregazione delle forme mutate

di SOD1 e TDP43, promuovendone la degradazione via autofagia. Infatti, HSPB8 forma un complesso con la *co-chaperone* BAG3 e con le proteine HSC70 ed E3-ubiquitina ligasi CHIP, permettendo il riconoscimento del substrato da degradare da parte della proteina p62 e il suo successivo inserimento all'interno dell'autofagosoma, per la degradazione. La modulazione dell'espressione di HSPB8, e dei suoi *partners*, potrebbe essere, quindi, protettiva per i motoneuroni.

A tale scopo, abbiamo sviluppato un sistema reporter, che ci ha permesso di studiare la regolazione dell'espressione di HSPB8 nei motoneuroni attraverso il controllo trascrizionale del suo gene. Abbiamo trasfettato stabilmente la linea cellulare motoneuronale murina NSC34 e la linea di neuroblastoma umano SH-SY5Y con un costrutto che contiene il gene della luciferasi sotto il controllo del promotore umano di HSPB8 (promB8). Su tali cellule, in collaborazione con il Centre for Integrative Biology (CIBIO) di Trento, abbiamo effettuato un'analisi high-troughput screening di una libreria commerciale di 2000 composti (The SPECTRUM Collection, MicroSource, USA). Tale analisi ci ha permesso di selezionare una lista di composti attivi, tra cui abbiamo ulteriormente indagato i primi 18 per 1) tossicità (saggio MTT), 2) IC50 e 3) capacità di aumentare i livelli di espressione della HSPB8 endogena (Real-Time PCR), sia in cellule NSC34 che in cellule SH-SY5Y. Abbiamo identificato due composti capaci di aumentare significativamente e con un effetto dose-risposta i livelli di espressione della HSPB8 endogena, in cellule SH-SY5Y. Entrambi i composti sono risultati capaci di contrastare l'aggregazione proteica di TDP43 mutato. Stiamo verificando che tale effetto sia HSPB8-dipendente.

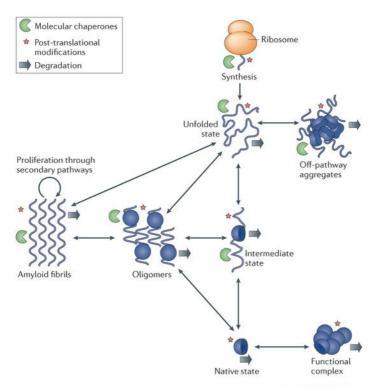
Grants: Ministero della Sanità (GR-2011-02347198); ARISLA (ALS\_HSPB8)

## PRINCIPI FISICO-CHIMICI DELL'OMEOSTASI DELLE PROTEINE E APPLICAZIONI PER CONTRASTARE LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

## Michele Vendruscolo

Department of Chemistry, University of Cambridge, UK

L'obiettivo della nostra ricerca e' di scoprire i principi che governano l'omeostasi delle proteine, inclusi i meccanismi utilizzati dalle cellule per regolare i livelli di espressione delle proteine, le loro conformazioni e le loro interazioni. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo stabilito recentemente il Centre for Misfolding Diseases presso il Dipartimento di Chimica dell'Universita' di Cambridge, dove abbiamo adottato un programma interdisciplinare in cui metodi e concetti di chimica, fisica, ingegneria, genetica e medicina vengono integrati. Usiamo combinazione di approcci in vivo, in vitro e in silico per studiare delle proteine attraverso l'analisi degli effetti comportamento di un gruppo specifico di proteine risultanti dalle alterazioni delle loro sequenze o delle condizioni del loro ambiente. Questo programma sta generando una comprensione dei meccanismi chimici e fisici tramite i quali le proteine esercitano la loro funzione biologica, e ci sta permettendo di investigare efficacemente i comportamenti normali e aberranti di sistemi biologici, e in particolare le conseguenze del fallimento nel mantenimento dell'omeostasi delle proteine sull'invecchiamento e le malattie neurodegenerative.



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

## MICROSCOPIA A FORZA ATOMICA DI AGGREGATI AMILOIDI

## Annalisa Relini

Dipartimento di Fisica, Università di Genova

La microscopia a forza atomica (AFM) è una tecnica versatile e poco invasiva che negli ultimi anni si è rivelata fondamentale per l'analisi del processo di aggregazione amiloide. Attraverso alcuni esempi relativi a proteine modello, come il dominio N-terminale del fattore di maturazione dell'idrogenasi di E. coli HypF, o a proteine legate a patologie da amiloide, tra cui beta2-microglobulina e atassina, verranno presentate alcune applicazioni della tecnica AFM nell'ambito di questa tematica.

Nel processo di aggregazione, proteine monomeriche si assemblano in oligomeri, che a loro volta si organizzano in protofibrille lineari o anulari; infine le protofibrille evolvono in fibrille mature del diametro di pochi nanometri e lunghezza tipica dell'ordine del micron. La tecnica AFM permette di ottenere informazioni quantitative sulle caratteristiche morfologiche e strutturali degli aggregati proteici nei diversi stadi del processo di aggregazione. Oltre alle dimensioni degli aggregati, sono accessibili informazioni ultrastrutturali, come indicazioni sul numero di protofilamenti costituenti le fibrille. Inoltre attraverso un approccio basato sulla teoria dei polimeri, dall'analisi del contorno degli aggregati prefibrillari o fibrillari è possibile valutarne parametri nanomeccanici come il modulo di Young. Infine è possibile testare l'effetto di inibitori del processo di aggregazione, dalle piccole molecole come le tetracicline ai chaperoni molecolari.

Un secondo aspetto riguarda i meccanismi di tossicità degli aggregati amiloidi. Tra questi meccanismi vi è la capacità di destabilizzare la membrana cellulare. Esperimenti su membrane artificiali hanno messo in evidenza i principi di base di questo comportamento. Infatti l'interazione di aggregati proteici con doppi strati lipidici ne altera lo spessore e le proprietà meccaniche. In particolare, misure AFM effettuate inserendo varianti patologiche e non patologiche di atassina 1 in membrane modello hanno mostrato che la forza di rottura della membrana è inversamente correlata alla tossicità della proteina.

Un terzo aspetto riguarda lo studio del materiale ex vivo. L'analisi di fibrille ex vivo mediante AFM può fornire non solo i parametri morfologici e strutturali degli aggregati, ma anche preziose informazioni sui cofattori che intervengono nella deposizione degli aggregati in vivo, così da guidare la

progettazione degli esperimenti volti a riprodurre il processo in vitro verso condizioni il più possibile vicine a quelle fisio-patologiche. Questo è il caso della beta2-microglobulina, che nell'amiloidosi da emodialisi si deposita in associazione con le fibre di collagene, a differenza della variante D76N, legata ad un altro tipo di amiloidosi. Infine è molto interessante, anche se piuttosto ardua, la visualizzazione degli aggregati amiloidi direttamente nei tessuti provenienti da biopsie. Questo approccio può servire ad identificare i pattern caratteristici formati dagli aggregati e il loro stadio di maturazione, migliorando gli strumenti diagnostici.



L'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (I.N.B.B.) è un Consorzio Interuniversitario che ha ricevuto il riconoscimento della personalità giuridica con D.M. - MURST del 11/12/1995 ed è vigilato dal Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MIUR). Il MIUR nomina due membri, in sua rappresentanza, nel Consiglio Direttivo ed i 3 membri del Collegio dei Revisori dei Conti (il cui presidente è un funzionario del Ministero Economia e Finanza).

Per il quinquennio 2014-2018 Presidente dell'INBB è il Prof. Giovanni Antonini, Vicepresidente il Prof. Aldo Roda e Direttore il Dott. Pietro Ragni.

L'attività dell'I.N.B.B. consiste prevalentemente nel coordinamento scientifico e gestionale (in ambito nazionale ed internazionale) di progetti di Ricerca e Formazione, che vedono impegnate direttamente le Unità di Ricerca I.N.B.B. presso gli atenei consorziati; un particolare interesse è rivolto ai Programmi dell'Unione Europea, con piacere registriamo, nel 2015, la valutazione positiva di un nostro progetto (primo su 462 presentati) nel settore "dispositivi medici" del Programma Horizon 2020. Grazie ai progetti realizzati ed all'autorevolezza delle pubblicazioni dei ricercatori aderenti, il Consorzio ha ottenuto un esito molto positivo nella VQR 2006/10 dell'ANVUR e nell'ultimo bando competitivo del MIUR riservato ai Consorzi interuniversitari di ricerca, nel 2012.

Il Consorzio è costituito esclusivamente da università pubbliche italiane (attualmente 23) ed è strutturato nelle seguenti 9 sezioni: Milano, con afferenza degli atenei di Parma, Torino e Milano Bicocca; Udine, con afferenza dell'ateneo di Verona; Bologna, con afferenza degli atenei di Firenze e Siena; Genova; con afferenza dell'ateneo di Sassari; Padova, con afferenza dell'ateneo di Trento; Napoli, con afferenza dell'ateneo di Napoli Federico II; Bari, con afferenza degli atenei di Bari Politecnico e del Molise; Roma, con afferenza degli atenei Politecnico delle Marche, di Camerino, Roma Tor Vergata, Roma Tre e L'Aquila; Catania, con afferenza dell'ateneo di Messina.

All'I.N.B.B. aderiscono più di 600 ricercatori universitari (per lo più Professori ordinari ed associati) ammessi in base ad una selettiva

valutazione delle pubblicazioni scientifiche. Ciascuno di loro aderisce ad uno dei sei settori di ricerca previsti dallo statuto del Consorzio: Biomolecole, Biostrumentazione e Bioelettronica, Biosistemi e Bioregolazioni, Biotecnologie, Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari, Cellule.

L'I.N.B.B., Consorzio senza scopo di lucro, si è avvalso, fino al 2012, di un contributo permanente da parte del MIUR. Tale contributo ed in generale una parte importante dei finanziamenti per ricerca sono impiegati per sostenere le risorse umane che si impegnano scientificamente nei settori di riferimento e che sono il vero valore aggiunto del Consorzio. Fra dipendenti, borse di studio e contratti di ricerca, in media sono attive una trentina di posizioni per anno, il 90% di esse è dedicato all'ambito scientifico.

Il Consorzio I.N.B.B., oltre alle Unità di Ricerca istituite presso le università consorziate, ha attivato, negli anni, un Laboratorio Nazionale ad Osilo (SS) con la Sezione di Medicina di Genere ed un Laboratorio sugli Interferenti Endocrini, presso la sede del CNR a Napoli; è inoltre fra i fondatori del Laboratorio SWITH per studi avanzati sulle cellule staminali a Lugo di Romagna (RA).

Lo statuto ed altre informazioni sono reperibili sul sito: www.inbb.it.

## CON IL PATROCINIO DI:







## **CON IL CONTRIBUTO DI:**













Viale delle Medaglie d'Oro, 305 00136 Roma Tel. 0635340153 Fax 0635451637 e-mail: <u>inbbamm@inbb.it</u>

www.inbb.it