



ATTI
XIV CONVEGNO NAZIONALE

***“Ricerca e Innovazione per Ambiente,
Salute ed Alimentazione”
Dedicato alla memoria
del Prof. Gustavo Mita***

CENTRO CONVEGNI CAVOUR

ROMA, 17-18 NOVEMBRE 2022

Comitato Scientifico

Giovanni Antonini
Oliana Carnevali
Alberta Mandich
Giuseppe Palleschi
Pietro Ragni
Francesco Ricci
Aldo Roda
Giuseppe Spoto
Filippo Surace
Maria Svelto
Carlo Ventura

Organizzazione

Cristiana Citton
Deborah Di Lorenzo
Lucia Occhioni

INDICE

Programma Convegno Nazionale	<i>Pag. 7</i>
Introduzione del Presidente	<i>Pag. 12</i>
Alta formazione e ricerca: un nuovo Rinascimento per l'Italia della Conoscenza	<i>Pag. 23</i>
Abstract comunicazioni scientifiche	
<i>EDCs a threat to wildlife and human health: old challenges and novel techniques</i>	<i>Pag. 41</i>
<i>Trasferimento Tecnologico e Spin-off</i>	<i>Pag. 55</i>
<i>Biosensori</i>	<i>Pag. 79</i>
<i>Nuove prospettive di rigenerazione tissutale</i>	<i>Pag. 89</i>
<i>Progetti Europei - strategia per presentare una proposta vincente</i>	<i>Pag. 103</i>
<i>Sessione Poster</i>	<i>Pag. 109</i>

XIV CONVEGNO NAZIONALE I.N.B.B.

Programma

h. 9,00 Registrazione dei partecipanti

h. 9,30 Apertura dei lavori

PROF. GIOVANNI ANTONINI – Presidente INBB e Direttore Dip. Scienze Univ. Roma Tre

h. 9,50 – 11,30 Tavola Rotonda

“ALTA FORMAZIONE E RICERCA: UN NUOVO RINASCIMENTO”

Coordina: PROF. GIOVANNI ANTONINI – Presidente INBB e Direttore Dip. Scienze Università Roma Tre

Introduzione: DOTT. PIETRO RAGNI – Direttore INBB

DOTT. LUIGI BOGGIO – Commissario ALISEI

PROF. LUIGI NICOLAIS – Professore Emerito Federico II, Presidente di Materias e Presidente della Fondazione Cotec

PROF.SSA MARIA SVELTO – Presidente Distretto H-BIO Puglia

PROF. PAOLO VISCA – Prorettore alla Ricerca Università Roma Tre

h. 11,30 – 13,30

Sessione: ***“EDCs a threat to wildlife and human health: old challenges and novel techniques”***

Chair: PROF.SSA OLIANA CARNEVALI – Univ. Politecnica delle Marche e PROF.SSA ALBERTA MANDICH – Univ. Genova

PROF. LUIGI NICOLAIS – Professore Emerito Federico II, Presidente di Materias e Presidente della Fondazione Cotec “Gustavo Mita, uno scienziato e un amico”

PROF. ADRIAN COVACI – Univ. Antwerp (Belgio) “Exposure to phthalates and plasticizers of premature newborns in Neonatal Intensive Care Unit”

PROF.SSA YU AIT BAMAI – Univ. Hokkaido (Giappone) e Univ. Antwerp (Belgio) “Introduction of the Hokkaido study and impact of PFAS on childhood asthma and allergies and infectious diseases: the Hokkaido study on environment and children’s health”

DOTT.SSA MARTA LOMBÒ ALONSO – Univ. Leon (Spagna) “A paternal legacy: the transmission of edc epimutations to the future generations”

PROF.SSA MARIA DE FALCO – Univ. Napoli “Federico II” “Effects of phthalates in combination with endogenous hormones on human prostate cells”

h. 13,30

Pausa Pranzo e Poster

h. 14,30 – 16,30

Sessione: “***Trasferimento Tecnologico e Spin-off***”

Chair: DOTT. PIETRO RAGNI – Direttore INBB e DOTT. FILIPPO SURACE – CEO CUBE-LABS

PROF.SSA SILVIA BISTI – BioAurum Srl “Phytotherapy in neurodegenerative diseases”

PROF. MASSIMO CONTINI – Univ. Firenze e BioAurum Srl “A novel predictive model for early diagnosis of neurodegenerative diseases based on ocular movements delay detection”

PROF. MASSIMO MASSETTI – Rescue Code Srl “The hybrid scalpel: an instrumental evolution in cardiac surgery”

PROF. SAVERIO BETTUZZI – Adamas Biotech Srl “Il contributo di Adamas Biotech alla ricerca nutraceutica e nella lotta contro la sindrome da COVID-19”

DOTT.SSA DANIELA LA NOCE – CNR-UVR “L’esperienza CNR nella creazione di imprese spin off”

h. 16,30 – 18,30

Sessione: “Biosensori”

Chair: PROF. GIUSEPPE PALLESCHI – Univ. Roma “Tor Vergata” e PROF. GIUSEPPE SPOTO – Univ. Catania

DOTT.SSA CRISTIANA CALICETI – Univ. Bologna “Jag1Fluc: sviluppo e applicazione di una proteina ricombinante bioluminescente come biomarcatore per la diagnosi precoce del cancro al colon”

PROF. ALESSANDRO BERTUCCI – Univ. Parma “Programmable DNA-based electrochemical sensors for molecular diagnostics”

PROF.SSA EUGENIA PECHKOVA – Univ. Genova “Ordine intermolecolare della Ficocianina in film nanostrutturati di Langmuir-Blodgett (LB): metodi e applicazioni a biosensori”

DOTT.SSA FRANCESCA SPINELLA – Eurofins Roma “Chip-based NGS and dPCR approach to deeply evaluate tumor genotype in both tissue and plasma samples might greatly improve the tracing of preneoplastic cells in HNSCC primary tumor”

DOTT.SSA ROBERTA D’AGATA – Univ. Catania “High-performance plasmonic imaging sensor to reveal oncogenic DNA with a liquid biopsy approach”

PROF. AZIZ AMINE – Univ. Casablanca (Marocco) "Recent advances in biosensors based on molecular imprinting polymers"

VENERDÌ 18 NOVEMBRE

h. 9,15 – 11,15

Sessione: “Nuove prospettive di rigenerazione tissutale”

Chair: PROF. CARLO VENTURA – Univ. Bologna e Lab. Nazionale INBB “Decifrare un codice morfogenetico per un nuovo approccio alla medicina rigenerativa”

DOTT. GABRIELE D’UVA – Univ. Bologna “Cardiogenesi diretta: nuove strategie molecolari per la rigenerazione del cuore”

PROF. UMBERTO GALDERISI – Univ. Campania “Luigi Vanvitelli” “Muse stem cells as a new cell-based model for the study of neural diseases”

PROF.SSA MARGHERITA MAIOLI – Univ. Sassari e Coordinatore corso Dottorato Scienze Biomediche “Nanomaterials and Natural Compounds in Skin Regeneration and Rejuvenation”

DOTT. CARLO CORTELLA – Fondatore SOLS “Regenerative environments to recreate cellular equilibrium”

h. 11,15 – 12,30

Sessione: “Progetti Europei - strategia per presentare una proposta vincente”

Chair: PROF. FRANCESCO RICCI – Univ. Roma “Tor Vergata” “ERC starting and consolidator grants”

PROF. ALESSANDRO BERTUCCI – Univ. Parma "Marie Skłodowska-Curie postdoctoral fellowships: tips and tricks"

PROF. ALESSANDRO PORCHETTA – Univ. Roma “Tor Vergata” “Staff exchange - Marie Skłodowska-Curie actions: an example of winning proposal”

PROF. GIUSEPPE SPOTO – Univ. Catania "EIC programme: Pathfinder projects”

h. 12,30 ***Premiazione del Concorso e Chiusura del Convegno***

INTRODUZIONE

DEL PRESIDENTE DEL CONSORZIO INBB

Giovanni Antonini

Presidente Consorzio Interuniversitario INBB;

Direttore Dipartimento di Scienze dell'Università Roma Tre

Care amiche e cari amici, care colleghe e cari colleghi e autorità,

È con enorme piacere che inauguriamo oggi il XIV Convegno Nazionale INBB dal titolo “Ricerca e Innovazione per Ambiente, Salute ed Alimentazione”. Il convegno è dedicato alla memoria del Prof. Gustavo Mita, già Presidente dell’INBB e carissimo amico della maggior parte dei presenti. Il prof. Mita è scomparso nel 2019, all’inizio della fase pandemica e solo ora siamo stati in grado di organizzare un evento per ricordare la sua figura umana e di validissimo ricercatore.

Permettetemi innanzitutto di salutare e ringraziare i membri del Comitato Scientifico e del Comitato Organizzatore che hanno permesso lo svolgimento del convegno. È con grande riconoscenza che ringrazio gli sponsor Coswell, CUBE LABS, Fondazione Aiutiamoli a Vivere ONG, Hortus Novus e SOLS. Come anche ringrazio, anche a nome del Convegno, tutti i relatori che hanno accettato di partecipare ai vari panel del Convegno.

Malgrado di regola i Convegni Nazionali INBB si tengano ogni 2 anni, abbiamo dovuto saltare un anno per la pandemia. Tuttavia, durante il periodo pandemico, le attività dell’INBB sono potute proseguire senza impedimenti grazie alla dedizione delle nostre preziose collaboratrici: Cristiana, Deborah e Lucia, senza le quali non sarebbe stato possibile niente di ciò che è stato fatto. In secondo luogo desidero sottolineare e ringraziare la direzione attenta e puntuale del dr. Pietro Ragni, la

collaborazione del vice-presidente prof. Aldo Roda, del Collegio dei Revisori dei Conti, della Giunta Esecutiva, del consulente amministrativo dr. Parravano e di molti degli aderenti.

Situazione Consortile

L'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi è un Consorzio interuniversitario di Ricerca Tematica (CIRT) nato nel '93; ha ricevuto il riconoscimento della personalità giuridica con un decreto del Ministero (MIUR - Ministero per Istruzione, Ricerca e Università) dell'11/12/'95 ed è supervisionato dallo stesso Ministero, che nomina due membri del Consiglio Direttivo del Consorzio ed i tre membri del Collegio dei revisori dei conti (il cui presidente è un funzionario del Ministero dell'Economia). INBB non ha fini di lucro e continua a essere annoverato nella lista delle Amministrazioni Pubbliche inserite nel conto economico consolidato individuate ai sensi dell'articolo 1, comma 3 della legge 31 dicembre 2009, n. 196 e ss.mm. (Legge di contabilità e di finanza pubblica). I due principali enti di ricerca pubblici italiani (CNR - Consiglio Nazionale delle Ricerche e ENEA - Ente Nazionale per le Energie Alternative) nominano anche essi un membro nel Consiglio Direttivo.

All'I.N.B.B. aderiscono circa 700 ricercatori universitari (per lo più Professori ordinari e associati) e degli Enti Pubblici di Ricerca, ammessi in base ad una selettiva valutazione delle pubblicazioni scientifiche, che vengono divisi nei sei settori di ricerca del Consorzio, individuati nello statuto: Biomolecole, Biostrumentazione e Bioelettronica, Biosistemi e Bioregolazioni, Biotecnologie, Unità Funzionali Biologiche Supramolecolari, Cellule.

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. In particolare, il Consorzio Interuniversitario I.N.B.B., secondo il suo statuto, opera con gli obiettivi di seguito indicati.

- Procedere alla costituzione e alla gestione delle sue sezioni e dei laboratori nazionali di ricerca e, successivamente agli accordi convenzionali, costituisce unità di ricerca di organizzazioni di ricerca pubbliche e private.
- Incoraggiare lo sviluppo della cooperazione scientifica tra le università partner e altri istituti di ricerca pubblici e privati, nazionali e internazionali, che operano nel campo delle Biostrutture e dei Biosistemi.
- Fornire alle università partecipanti attrezzature, laboratori e centri che possano supportare il lavoro dei dottori di ricerca e nella formazione dei ricercatori.
- Promuovere e incoraggiare, compresa la concessione di borse di studio e di ricerca, la preparazione di esperti nella ricerca di base, negli sviluppi tecnologici e nelle applicazioni di Biostrutture e Biosistemi.
- Realizzare attività di trasferimento tecnologico dei risultati di ricerche nazionali e internazionali nel settore sanitario, ambientale ed agro-alimentare, comprese le attività pianificate e finanziate ai sensi del Decreto Legislativo n. 297/99 e successivi regolamenti.
- Realizzare, in collaborazione con le principali organizzazioni ambientali e l'industria sanitaria, dell'implementazione di materiali, prodotti e attrezzature tecnologicamente avanzate.
- Condurre studi e ricerche commissionate da organizzazioni governative, istituzioni pubbliche e private, aziende pubbliche e private, impiegando le risorse a supporto delle problematiche nelle varie area di competenza.
- Partecipare allo studio, all'attuazione e alla gestione di iniziative nel quadro di progetti scientifici e accordi di cooperazione internazionale, compresa la partecipazione a nuove società.

Tra le misure di supporto che l'INBB offre ai propri aderenti, è opportuno ricordare:

- supporto della Direzione INBB nella presentazione di progetti nazionali ed europei;
- lo sviluppo di network tematici di ricerca e partecipazione alle iniziative scientifiche del Consorzio;
- possibile partecipazione come Consorzio (con una o più Unità di Ricerca) a cordate progettuali e maggiore facilità di “collaborazioni di filiera” nella elaborazione di progetti complessi;
- procedure semplificate per l'amministrazione dei contratti e dei progetti pubblici;
- possibili facilitazioni finanziarie da parte del Consorzio per gli aderenti in attesa dei fondi;
- rapporti semplificati e flessibili con aziende private;
- una efficace Procedura per il Trasferimento Tecnologico;
- incremento delle risorse economiche acquisite dalle università ai fini del calcolo dell'FFO per le università.

Come è noto, erano già attivi tre Laboratori Nazionali I.N.B.B.:

- Laboratorio Nazionale con la Sezione di Medicina di Genere, Univ. Sassari (Resp. Prof.ssa Flavia Franconi);
- Laboratorio Nazionale per studi avanzati sulle cellule staminali a Bologna (Resp. Prof. Carlo Ventura);
- Laboratorio Nazionale “Proteomica e Metabolomica per l'ambiente e la salute” (ProMetAS) presso l'Univ. Federico II di Napoli (Resp. Prof.ssa Angela Amoresano).
- A questi laboratori si è aggiunto quest'anno il Laboratorio Nazionale INBB di Nanomateriali per l'Ambiente e la Salute la cui istituzione in convenzione, lanciata nel 2021, è stata approvata dal Consiglio del Dipartimento di Scienze dell'Università Roma Tre il 9/02/2022 (Resp. prof. Giovanni Antonini). Il gruppo di lavoro attivo nel

nuovo possibile Laboratorio Nazionale si porrebbe all'interfaccia tra chimica, fisica, scienza dei materiali, biologia ed ingegneria sviluppando una ricerca interdisciplinare nell'ambito della Soft Matter, con applicazioni biologiche, biomedicali e ambientali/ecologiche. In particolare, i diversi laboratori locali associati nel Laboratorio Nazionale si occuperebbero del design teorico, della realizzazione e caratterizzazione di nuovi materiali funzionalizzati, nonché della loro applicazione.

Le attività di ricerca

L'INBB, nell'ultimo settennio (2015-21), ha coordinato e gestito numerosi progetti che si sono esplicitati nel finanziamento di € 1.491.496 per tre progetti europei, € 1.191.886 per quattro progetti nazionali, € 426.207 per cinque progetti regionali, € 2.073.197 finanziati da enti, associazioni e fondazioni nazionali ed internazionali e circa € 4.549.336 per 79 contratti di ricerca con aziende farmaceutiche, biotech, chimiche nazionali ed internazionali.

Per citare i due esempi più significativi a livello internazionale: nel 2014 I.N.B.B. ha presentato, nell'ambito del bando Horizon 2020 PHC-10-2014, come coordinatore di una partnership con 13 istituzioni dell'UE e aziende la proposta Ultraplacad (dispositivi PLAsmonic ULTRAsensibili per la diagnosi precoce del carcinoma) sulla scoperta precoce e non invasiva del tumore del colon; è stata valutata come prima (voto 15/15) su 461. Il progetto, coordinato dal nostro Prof. Spoto, è iniziato nel 2015 ed ha terminato con successo la sua attività nel dicembre 2018 e l'INBB ha ricevuto l'audit dei funzionari della Corte dei Conti della Commissione Europea che si sono informalmente complimentati per la gestione; infine il progetto è stato segnalato dall'UE come una delle buone pratiche in ambito sanitario (<https://ultraplacad.eu/>). Nel 2017 INBB, come coordinatore, ha vinto, grazie all'azione del prof. Rustichelli che lo ha diretto, un ambizioso

progetto COST: BIONECA "Biomateriali e tecniche fisiche avanzate per cardiologia rigenerativa e neurologia"; che con più di 70 ricercatori affiliati provenienti da 40 Paesi risulta essere uno dei più grandi COST partnership in Europa ed ha già prodotto due nuove proposte all'interno di H-2020 Horizon; il progetto si è concluso nel 2021 con un interessante convegno a Praga e con la produzione dell'evocativo video illustrativo: <https://bioneca.eu/documents/>. Infine sempre nell'ottobre 2021, con il convegno di Lisbona, è terminato il progetto "BIO-ALL", finanziato dal Programma EU Erasmus Plus, con la produzione di un set di materiali formativi finalizzati ad agevolare il rapporto fra l'accademia e le imprese nell'ambito delle Life Sciences.

Nel Luglio 2021 si è realizzato il G20 coinvolgente i venti paesi più industrializzati; nel suo interno si è tenuta la convenzione "Women20 (W20)" con donne rappresentanti di quei paesi, riunite per discutere di questioni come l'emancipazione sociale, economica e politica delle donne. La nostra Prof.ssa Franconi è stata la coordinatrice della Commissione "W20 Equity in Health" che ha promosso il documento finale sulla Medicina di Genere, declinata per superare le diseguaglianze di salute e di donne e scienza. Per altro la collega era stata la keynote speaker del Convegno organizzato dal Senato della Repubblica il 15/06/2021 dal titolo: "Idee in pratica: per una sanità attenta alle differenze di sesso e genere" cui ha partecipato anche il Ministro per la Salute On. Speranza.

L'AIRC (Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro) ha affidato all'INBB, negli ultimi anni, due importanti progetti di ricerca: "Regolazione trascrizionale della longevità degli enterociti da parte dei co-attivatori del recettore dell'ormone nucleare: rilevanza nel cancro del colon" e "Asse metabolico epatico nel carcinoma del colon e epatocarcinoma: ruolo di recettori nucleari e enterokine "che, grazie all'operato del loro responsabile, il nostro Prof. Moschetta, hanno già prodotto risultati molto interessanti e l'ultimo è nella parte finale di

esecuzione. Nel 2020 l'AIRC ha affidato all'INBB un nuovo progetto triennale al nostro giovane Prof. D'Uva di Bologna dal titolo: "Dissecting the cross- regulation between EGFR and ERBB2 in basal-like breast cancer", Grant AIRC MFAG 2020 ID 24684, il progetto è iniziato nel gennaio 2021 e sta procedendo con successo.

Inoltre, è importante sottolineare anche le attività di ricerca congiunta organizzate direttamente con società private; tra queste, negli ultimi anni, vi è il progetto "L'uso della vibrazione meccanica (acustica/subsonica) ed elettromagnetica per un nuovo paradigma nella medicina rigenerativa e nel benessere umano" ora supportato da Eldor Corporation, uno dei leader mondiali nel settore automobilistico; il cui scopo è la creazione di attuatori vibrazionali multifrequenza. Queste ricerche sono eseguite a Bologna dal Laboratorio INBB sulle cellule staminali ad opera del gruppo coordinato dal nostro Prof. Ventura.

Infine proprio quest'anno abbiamo avuto l'ottima notizia dell'assegnazione al nostro Prof. Ricci di Tor Vergata del progetto ERC "ELECTROCHEMICAL DNA-BASED SENSORS FOR IMMUNOTHERAPY MONITORING" e ci complimentiamo con lui per aver ottenuto un successo in un bando EU altamente competitivo.

Trasferimento Tecnologico

A partire dal 2016 I.N.B.B. ha implementato la linea di attività legata al trasferimento tecnologico di alcuni dei risultati più promettenti della ricerca dei suoi aderenti. Dopo un appropriato processo di selezione, I.N.B.B. ha identificato Cube Labs come partner di riferimento per incoraggiare l'accelerazione dell'innovazione, condividendo il suo modello di valorizzazione dei risultati della ricerca e il suo approccio pragmatico e olistico ai bisogni dei singoli ricercatori. Nel 2020 abbiamo rafforzato con un Accordo Quadro con Cube Labs la collaborazione già avviata, in modo che diventi un'azione congiunta

strategica per il prossimo futuro, tale collaborazione è stata prorogata a tutto il 2025.

Ne parleranno i colleghi diffusamente nel panel dedicato agli spin off; ricordo qui soltanto che grazie alla Procedura per il Trasferimento Tecnologico siamo stati in grado in tre anni (dal 2017 al 2019) di costituire, insieme con Cube Labs, 11 spin off nell'ambito delle Scienze della Vita. Nel frattempo, per gli spin-off esistenti, la valorizzazione per il mercato è già stata implementata, anche con l'attività di raccolta fondi e contatti qualificati con importanti interlocutori finanziari e commerciali. Già cinque di essi sono stati finanziati dal mercato della ricerca e nuovi supporti sono previsti nei prossimi mesi. È importante anche sottolineare che con ciascun spin off finanziato si sono stipulati accordi con INBB per un opportuno supporto operativo e scientifico che ha anche permesso l'attivazione di cinque contratti con giovani ricercatori.

Publicazioni

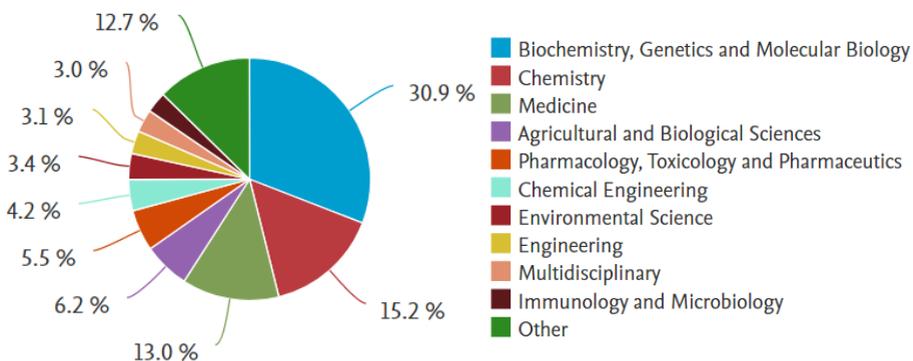
Partendo dalla sua tradizione di alta qualità, nel corso del 2014 il Consorzio I.N.B.B. ha deciso, come noto, di considerare gran parte delle sue attività di ricerca divise su sei piattaforme; inoltre dal 2018 I.N.B.B. ha specificato che le sue linee di ricerca siano riferite ai tre settori d'interesse: alimentare, ambientale e sanitario.

La produzione di ricerca è il primo obiettivo di I.N.B.B.; nella valutazione effettuata direttamente dal MIUR (2012) di tutti i consorzi di ricerca italiani, INBB aveva ottenuto un ottimo posizionamento in classifica: secondo su quindici con 99,5 / 100. Successivamente I.N.B.B. è stato uno dei pochi Consorzi Interuniversitari di Ricerca Tematica (al tempo erano una ventina) che si sono sottoposti volontariamente alla Valutazione della Qualità della Ricerca (VQR) da parte dell'Agenzia Nazionale di Valutazione del Sistema Universitario e della Ricerca (ANVUR) sia nella prima VQR (2004-

2010), sia nella seconda VQR (2011-2014), e nella terza VQR (2015-2019).

In Totale, su SCOPUS sono presenti 1,315 pubblicazioni presentate da 191 ricercatori con affiliazione INBB. Tutte le pubblicazioni con affiliazione INBB sono sul sito SCOPUS

<https://www.scopus.com/affil/profile.uri?afid=60082163> (consultato in data 08/10/2022), con la seguente ripartizione:



Situazione patrimoniale e finanziaria

L'I.N.B.B., che è un Consorzio senza fini di lucro, ha ottenuto nel 2021, come gli altri Consorzi di ricerca (CIRT) riconosciuti dal MUR e autonomamente sottomessi alla VQR, un contributo finanziario da parte del MUR nell'ambito dei fondi FFO '20. Anche per il 2021 abbiamo presentato una richiesta di finanziamento che è attualmente all'esame degli organi competente del MUR.

Sono state attivate, grazie ai progetti e contratti finanziati, ventisette posizioni lavorative durante l'anno scorso, prevalentemente per giovani ricercatori; considerando dipendenti, borse di studio e contratti

di ricerca, altrettanto pensiamo di fare entro il 2022. Il 90% di queste risorse sono dedicate esclusivamente ai temi scientifici.

I.N.B.B., nei più di 5 lustri di vita, si è caratterizzato costantemente per una sana gestione, tal che, pur in presenza di una crisi generalizzata come quella causata dalla chiusura di tutte le attività economiche a causa dell'epidemia di Covid-19, non evidenzia problemi di *going concern* e pertanto sceglie di predisporre il bilancio d'esercizio con il presupposto di continuità. Ha un patrimonio netto di circa cinquecentomila Euro ed un bilancio chiuso sempre in attivo negli ultimi otto anni.

Conclusioni

Care amiche e cari amici, in questo periodo di forti cambiamenti nell'Università e nel settore Ricerca della Nazione, con forti riduzioni di risorse pubbliche destinate in entrambi i settori e nonostante la drammatica situazione pandemica, il nostro Consorzio è stato fra i pochi (9 in tutto) a riuscire a essere produttivo, nonostante la non continuità del supporto ministeriale ed anzi a migliorare le proprie prestazioni. Questi ottimi risultati sono stati frutto del "lavoro di squadra" della struttura organizzativa ed amministrativa del Consorzio e del lavoro di molti aderenti, in particolare, dei membri della Giunta Esecutiva e del Consiglio Direttivo.

E' quindi con particolare orgoglio che presenteremo nel XIV Convegno Nazionale INBB alcune delle principali attività di ricerca svolte da alcune delle Unità Operative dell'INBB; celebreremo la memoria del prof. Gustavo Mita, con un ricordo personale e con relazioni sugli sviluppi delle sue ricerche e lanceremo nella Tavola Rotonda una proposta per recuperare i ritardi nell'alta formazione e nella R&S che abbiamo voluto intitolare "Un nuovo Rinascimento per l'Italia della Conoscenza".

ALTA FORMAZIONE E RICERCA: UN NUOVO RINASCIMENTO PER L'ITALIA DELLA CONOSCENZA

Pietro Ragni

Direttore Consorzio Interuniversitario I.N.B.B.;

Dirigente Tecnologo ISB - CNR

Le lezioni all'indomani della pandemia

Durante quest'anno stiamo finalmente uscendo da un biennio di pandemia che ha sorpreso e frustrato tutta l'umanità ed ha lasciato lutti e danni ingenti. Per affrontare questo flagello la politica, la popolazione ed il sistema produttivo hanno dovuto cambiare il loro *modus operandi* sotto vari aspetti. Sofferamoci sui due più rilevanti per quanto riguarda la formazione e la ricerca.

Il primo è stato quello della **centralità dell'accademia e della ricerca per la politica**. In Italia e non solo, spesso le decisioni sono effettuate in funzione dei desideri (veri o presunti) dell'elettorato. Per affrontare la pandemia il governo e la politica sono dovuti ricorrere alle esperienze del mondo accademico e della ricerca, sia per varare decisioni strategiche per contenere gli effetti funesti della pandemia, sia per trovare un efficace rimedio per vincerla. Non era mai capitato in precedenza che gli esperti fossero così ascoltati ed in effetti, grazie alle loro indicazioni, i paesi che hanno adottato misure anche impopolari hanno ottenuto risultati relativamente positivi a differenza di quelli (USA e Brasile per esempio) che le hanno ignorate o sottovalutate. In correlazione è aumentato¹ il numero dei cittadini che usufruiscono di contenuti tecnico-scientifici sui media e, soprattutto sul web (passati dal 50% del '10 al 73% nel '20).

¹ G. Pellegrini, B. Saracino “Annuario Scienza Tecnologia e Società”; Il Mulino, 2022

Il secondo **successo della ricerca è stato quello di riuscire a mettere a punto in un tempo record vari vaccini subito operativi ed efficaci**. Questo è stato possibile grazie alle ingenti risorse economiche dedicate dai vari governi dei paesi più avanzati ed all'operare della comunità scientifica di riferimento scambiando le informazioni e le nuove conoscenze in modo da ottenere, in brevissimo tempo, un risultato strategico per l'umanità, che sembrava inattuabile fino a pochi mesi prima e che, in condizioni normali, avrebbe richiesto almeno tre anni. Si è verificata una situazione in parte simile a quella della ricerca cooperativa finalizzata con il "Progetto Manhattan", che coinvolse 130.000 ricercatori e tecnici negli USA ed in parte in Canada e UK per raggiungere in meno di due anni la realizzazione della bomba atomica.

Dovremmo così aver imparato almeno **tre lezioni**: 1) l'importanza delle conoscenze accumulate nelle università e nei centri di ricerca, per consentire ai governi di prendere decisioni politiche avvedute nell'interesse della popolazione e del sistema produttivo; 2) l'importanza di supportare, soprattutto nei settori di maggior interesse sociale ed economico, il mondo della ricerca, per velocizzare l'ottenimento di risultati innovativi; 3) l'importanza del formare al meglio le giovani generazioni per assicurare al Paese le competenze strategiche per il futuro. È facile riconoscere in **questi assunti gli stessi che sono alla base dell'Agenda 2030**, approvata dall'ONU nel '15 con i 17 goal per lo sviluppo sostenibile. Anche questo è un appuntamento improcrastinabile per l'umanità e alcuni avanzamenti si erano già ottenuti, almeno in alcuni paesi, in questi anni; prima che la sciagurata e vile guerra lanciata dalla Russia, fra gli altri effetti nefasti, rallentasse gli sforzi a livello planetario. Su queste tematiche forse non c'è la piena consapevolezza dell'opinione pubblica che quanto indicato nel programma d'azione non è un'opzione, è un obbligo se vogliamo consegnare ai nostri nipoti un pianeta non completamente compromesso!

Se davvero queste lezioni sono state comprese e condivise, la conseguenza logica dovrebbe essere quella di investire maggiormente su due versanti: l'istruzione superiore e la ricerca e sviluppo; settori sui quali l'Italia ha non pochi ritardi.

Istruzione terziaria: situazione allarmante

In Italia davvero è sconcertante come i vari governi succedutisi non abbiano colmato il divario dell'investimento nell'istruzione rispetto ai maggiori paesi europei, ed abbiano **peggiorato drasticamente la situazione**, infatti se nel '08 la percentuale di PIL dedicata all'istruzione era del 4,8%, nel '18 si è precipitati a poco più del 3% contro il valore medio europeo nell'anno che era del 4,6%, attestandoci all'8,2% rispetto alla spesa pubblica, contro il 9,3% dell'UE. In Fig. 1 i dati del 2016 per i paesi OCSE.

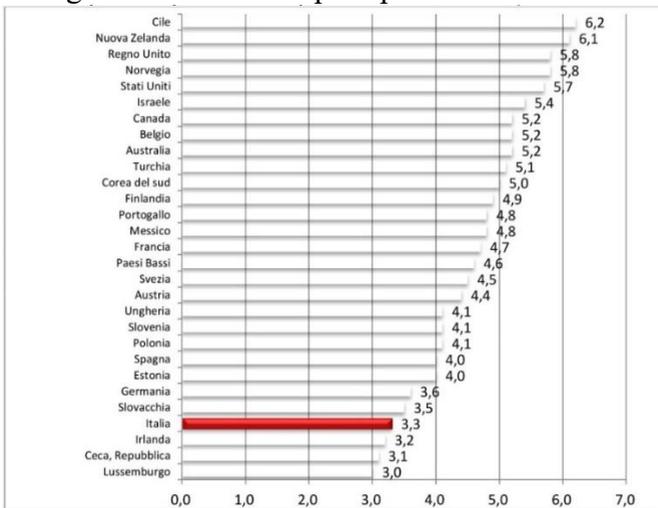


Fig.1 Comparazione spesa percentuale per la formazione sul PIL per il '16 da "Education at a glance"

Se i fondi destinati alle scuole pre-primarie, primarie e secondarie sono quasi in linea con lo standard europeo (3,2% contro il 3,4%), i

fondi pubblici dedicati per l'istruzione terziaria sono veramente ridotti, tal che la spesa italiana per la terziaria risulta essere la più bassa dell'UE, sia in percentuale del PIL (lo 0,3 % contro lo 0,8 %) sia in percentuale della spesa pubblica (il 7,7 % contro il 16,4 %), condannando il nostro Paese all'ultimo posto della classifica europea. “È opportuno notare che, mentre la spesa pubblica per l'istruzione è diminuita complessivamente del 7 % nel periodo 2010-2018, nello stesso periodo la spesa per l'istruzione superiore è stata ridotta del 19 %.”² Solo in parte la crescita della spesa privata (pari a circa il 30% del totale) ha alleviato la situazione nazionale.

Alcuni hanno ipotizzato che la scelta di disinvestire nella formazione e nella terziaria pubblica sia dovuta anche alla consapevolezza del calo demografico nel Paese. Anche se **il problema della denatalità** avviene ogni anno più drammatico, certo non può essere preso come opportunità di risparmio, anche nella Finanziaria 2021, per investire di meno nei futuri laureati, invece di investire per migliorare il sistema della formazione terziaria. A maggior ragione perché bisognerebbe incidere sulle storiche differenze sociali (i diplomati provenienti da famiglie meno abbienti molto spesso non possono iscriversi all'università) e geografiche (molti ragazzi del Meridione si iscrivono in atenei del Nord) che sussistono peggiorando.

Per quanto riguarda il mondo accademico, in Italia **i professori universitari under 30 sono sempre meno dell'1%**, invece in Germania lo staff accademico sotto i 30 anni supera il 24%. Inoltre la percentuale delle donne fra i professori universitari è modesta (44%) e l'Italia, anche per la parità di genere, si classifica negli ultimi posti fra i paesi OCSE³. D'altra parte nelle materie STEM (Science,

² Dati ISTAT elaborati su <https://www.educazioni.org> › uploads › 2021/01

³ OCSE, indagine sull'educazione nel mondo, 11/IV/2022

Technology, Engineering, Mathematics) il numero delle donne iscritte per Ingegneria e corsi ICT è di circa il 30% confermando una storica disparità di genere che si concreta in atteggiamenti volti a scoraggiare le donne a scegliere queste discipline. In conclusione il sistema nazionale dell'istruzione terziaria è largamente sotto finanziato dal pubblico, ha docenti di età più avanzata, continua a non affrontare le disparità di genere, sociali e geografiche.

In Italia si è creato **un ciclo vizioso** che vede, da una parte un sistema produttivo in maggioranza composto da aziende con basso livello tecnologico e dunque poco ricettivo nei confronti dei nuovi laureati, dall'altra lo Stato che disinveste sia in R&S, sia nell'educazione terziaria. Questo genera **tre risultati negativi**: disincentiva i giovani diplomati dall'isciversi all'università, si ha un numero di laureati e dottori della ricerca pari alla metà o meno rispetto ai Paesi più avanzati e si ha un alto tasso di disoccupazione fra i laureati (stimato al 15%).

Occorre segnalare un'ulteriore stortura del sistema: **l'emigrazione all'estero di un gran numero di laureati**. L'ISTAT⁴ sottolinea che nel 2020, per assistendo ad alcuni rientri, soprattutto dal Regno Unito dopo la "Brexit", è continuato un significativo fenomeno migratorio di italiani verso l'estero; un quarto di loro è laureato (31.000 ; +5,4% rispetto al '19). Fra gli espatriati i giovani (fra 25 e 34 anni) sono poco più di 40.000 di cui 18.000 laureati; rispetto a cinque anni prima questo numero è cresciuto del 17%. In Fig. 2 l'evoluzione negli anni fra il 2011 ed il 2020.

⁴ ISTAT "[Report Migrazioni](#)" – Febbraio 2022



Fig.2 Percentuale dei giovani espatriati laureati tratto da “Report Migrazioni” dell’ISTAT

Ovviamente molti fra i laureati emigrati si sono formati in materie importanti per lo sviluppo economico e sociale, incluso, come purtroppo abbiamo imparato in questi mesi, nel settore delle scienze della vita e della salute in particolare. Se si considera che *il costo medio in Italia è di 164 mila euro per formare un laureato e 228 mila per un dottore di ricerca, è come se regalassimo all’estero decine di migliaia Ferrari ogni anno!*

Infine bisogna aggiungere⁵, a proposito di migrazioni, che sono **quasi sempre dal Mezzogiorno al Centro–Nord fin dall’iscrizione all’università**. Il 28,0% dei giovani del Mezzogiorno decide di conseguire la laurea in atenei del Centro e del Nord; inoltre molti dei laureati del Meridione trovano lavoro in regioni del Centro-Nord; questo significa che il Mezzogiorno perde quasi un terzo dei diplomati del proprio territorio.

Una situazione sconcertante che dovrebbe essere davvero affrontata dal nuovo governo. **L’unico segnale positivo** da registrare è l’impegno, grazie al PNRR, preso dal governo Draghi, come

⁵ Almalaurea “Rapporto 2022”

ricordato dal Ministro dell'Università e della Ricerca: *“migliorare l'orientamento dalla scuola all'università con un investimento aggiuntivo di 250 milioni del PNRR, investire sulle competenze e sul diritto allo studio, aumentando il valore delle borse di studio soprattutto per coloro che scelgono di spostarsi, ampliando la platea dei beneficiari e premiando le ragazze che decidono di intraprendere percorsi STEM con un supporto aggiuntivo”.*

Ricerca e Sviluppo: luci ed ombre

In Italia l'impegno pubblico e privato nel settore della Ricerca e Sviluppo (R&S) è leggermente migliorato negli ultimi undici anni (vedi Fig. 3 elaborata su dati OCSE⁶ del '22) passando dal 1,22% nel 2010 al 1,51% nel 2020, ma questo dato è in parte dovuto al diminuire del PIL nazionale.

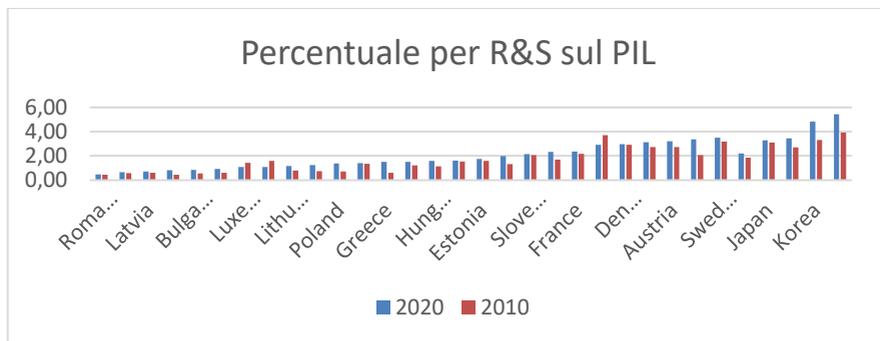


Fig.3 Percentuale per R&S sul PIL elaborazione da OCSE “Main Science and Technology Indicators”

Questa lenta crescita ci lascia come **paese ancora in ritardo sulla media per EU27 (2,20%)** e dietro i principali paesi di riferimento

⁶ OCSE “Main Science and Technology Indicators”, September 2022

(Francia al 2,35% e Germania al 3,13%). A livello mondiale i quattro paesi che investono maggiormente in R&S restano USA e Giappone (oltre il 3%) e Corea del Sud ed Israele (circa 5%). In particolare la spesa pubblica in R&S ammonta a 9 miliardi di Euro/anno, contro i 17 della Francia ed i 30 della Germania. Sono numeri che parlano da soli e se ne comprende l'esiguità considerando che singole imprese investono molto di più: dai 22,5 della Alphabet (USA), ai 17,4 della Huawei (CHI), ai 13,9 della Volkswagen (DE).

Il cambio di sede legale della FIAT con l'ingresso nel gruppo Stellantis nel '21 (è la decima impresa per spese R&S in Europa) e la pandemia hanno ulteriormente⁷ fatto diminuire, nel '21, gli investimenti in R&S del 13,7% all'insieme dell'UE; l'Italia è stato il paese che ha avuto il risultato peggiore, seguita da Finlandia (-9,0%) e Francia (-8,0%). Per la congiuntura e la capacità di risponderci, mentre l'insieme dell'industria europea ha subito contrazioni per la R&S, a differenza di quanto è successo per USA e Cina. Se l'Italia aveva nel 2008 ben 52 imprese fra le prime 1000 imprese EU per spesa in R&S, nel 2021 ne erano rimaste solo 42; fra di loro 21 fra le top 2500 a livello mondiale, avendone perse 3 in un anno. Per altro l'Italia è l'unico, fra i 10 paesi EU con maggiore spesa in R&S, ad avere più R&S investita sul territorio di quanta riportata dalle imprese che hanno sede nel paese, a dimostrazione del fenomeno che non solo **vi è poca spesa per la R&S, ma si assiste all'”esportazione” di parte di essa da parte di imprese con sede in altri paesi.**

Scienze della vita: pochi medici e imprese in crescita

⁷ The 2021 EU Industrial R&D investment scoreboard, EUR30902EN, 2022

Per le facoltà collegate alle Scienze della vita la problematica della contrazione del numero degli iscritti ha subito finalmente un'inversione a seguito della pandemia. Non abbiamo modo di trattare tutti i singoli casi, ma accenniamo che per Medicina e chirurgia nell'A.A. 2018-19 i posti a bando erano 9.800 rispetto ai 10.083 dell'A.A. 2014-15; invece **per l'A.A. 2020-21 vi è stato un significativo incremento con 13.072 posti e in questo A.A. 2022-23 i posti a bando sono stati 14.740.**

Ancora maggiore l'impegno del governo uscente per **i posti disponibili per le scuole di specializzazioni mediche** che nell'A.A. 2017/18 erano solo 6.934, mentre il recente Decreto del MUR⁸ prevede il bando per 14.378 posti totali, 13.000 sono coperti con contratti finanziati da risorse statali, 984 sono coperti con contratti aggiuntivi finanziati con fondi regionali, 41 con contratti finanziati da altri enti pubblici e privati, mentre 353 sono quelli riservati alle categorie indicate dall'articolo 35 del Decreto Legislativo n. 368 del 1999 (sanità militare, polizia di stato, servizio sanitario nazionale).

Questi dati positivi dovrebbero essere accompagnati anche da altre misure per rendere il Sistema Sanitario Nazionale più performante, non tanto come risultati che già sono molto buoni, ma come attrattività e *governance*. Infatti da una parte⁹ **l'Italia è al quarto posto in EU-27 per longevità** con un'attesa di vita per i connazionali di 82,4 anni, contro gli 80,6 dell'EU-27; dall'altra abbiamo medici che per il 50% hanno 55 anni o più (contro i 38 di EU-27) e un **numero ridotto di infermieri** (6,2 su 1000 abitanti, contro gli 8,4 di EU-27). Inoltre vi è il problema più preoccupante dato dall'**emigrazione dei nostri giovani medici e specializzati**: più di 10.000 hanno lasciato l'Italia

⁸ Decreto nr. 1065 dell'8/IX/2022

⁹ State of Health in the EU: Italy. Country Health Profile 2021

fra il 2010 ed il 2020 (si consideri che il costo della formazione di uno specializzato arriva ai 250 mila Euro) verso altri paesi EU, UK, USA ed anche verso gli Emirati Arabi.

Il paradosso è che siamo un Paese che ha grande bisogno di medici, ma anche quello che possiede il **poco invidiabile record di medici in fuga all'estero**, tanto da essere, in Europa, più del 50% di quelli che hanno deciso di espatriare dal loro paese. Le cause sono molteplici: stipendi bassi soprattutto nel pubblico, carichi di lavoro pesantissimi, blocco del turn over e, per i neolaureati, difficoltà a completare la formazione con la specializzazione per l'esiguo numero dei posti messi a bando. La preoccupazione per l'immediato futuro è che, se non si attuano efficaci provvedimenti per la struttura del SSN, **non sarà disponibile un sufficiente numero di medici per sostituire quelli che presto andranno in pensione.**

Dopo una buona crescita nei primi dieci-quindici anni del 2000, si osserva una diminuzione del numero di iscritti e laureati per le facoltà di Farmacia e Chimica e Tecnologie Farmaceutiche, anche perché per i loro laureati è diminuita in parte l'opportunità di occupazione a seguito della saturazione del mercato, della scadenza dell'esclusiva di molti farmaci, con conseguente diminuzione dei profitti, e il crescere del ricorso ai farmaci "generici". In compenso però sono in crescita alcuni settori che possano garantire una buona ricettività: cosmetica, erboristeria e nutraceutici. cresce il numero di iscritti per Ingegneria Biomedica ed il mercato del lavoro è ben ricettivo nei confronti dei neolaureati.

Passando brevemente al versante della R&S per le imprese nel settore delle Scienze della Vita in Italia finalmente possiamo riportare alcuni dati incoraggianti. Il settore¹⁰ ha "connotazioni molto positive in

¹⁰ The Europea House–Ambrosetti 2021 on Farminindustria, Assobiotec and Confindustria Dispositivi Medici, 2020 and BioinItaly report 2020 data

termine di produttività, competitività e investimenti in R&S e può contare su un ecosistema attivo e dinamico in grado di rispondere tempestivamente alle sfide economiche e tecnologiche di un mercato dove crescita e innovazione vanno di pari passo”. I valori numerici di maggior interesse, presi dal citato documento, sono riportati in Fig. 4.

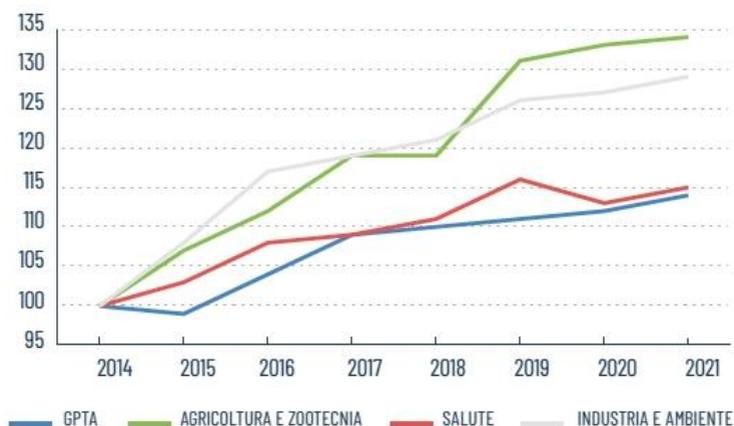
	<i>Farma</i>	<i>Biotech</i>	<i>Dispositivi Medici</i>
Numero delle imprese	291	696	4.323
Valore della produzione (miliardi k€)	32,2	12,1	11,0
Investimenti in R&S (miliardi k€)	1,65	2,30	0,93
Numero di dipendenti	66.500	13.313	94.153

Fig. 4 Valori numerici delle imprese della catena delle Scienze della Vita.

In particolare **il comparto biotech si consolida come uno dei fattori significativi dell’innovazione nazionale** poiché, anche in un periodo di crisi come quello provocato dalla pandemia, è riuscito a continuare a valorizzare le nuove conoscenze in termini economici. Sono considerati quattro ambiti di applicazione per il biotech: 1) **Salute** - ricerca e produzione di prodotti (farmaci, integratori, nuove terapie, vaccini, ecc.) per la diagnosi, la cura e la prevenzione delle malattie; 2) **GPTA** (Genomica, Proteomica e Tecnologie Abilitanti) – moderni metodi biotecnologici nell’ambito delle discipline “omiche”, maggiormente applicabili nel settore della salute; 3) **Industria e Ambiente** – metodi biotech per riqualificare processi produttivi convenzionali, per utilizzare le biomasse in bio-prodotti o nella produzione di energia e, in generale, in settori quali l’alimentare, il nutraceutico, il cosmetico, la diagnosi e bonifica ambientale e il

restauro e conservazione dei beni culturali e ambientali; 4) **Agricoltura e zootecnia** – metodi biotech per il miglioramento delle produzioni animali e vegetali, con maggiore produttività e migliore qualità, con caratteristiche di adattabilità all’ambiente e resistenza ai patogeni e sviluppo di prodotti biologici ed ecocompatibili per la difesa di piante e animali.

Nel Rapporto 2022¹¹ Assobiotech ha sottolineato come “Il numero di imprese attive nelle biotecnologie in Italia, dopo una lieve flessione a fine 2020 (...), è tornato a crescere nel 2021, superando con 790 aziende il livello raggiunto a fine 2019”. È significativo che **la crescita ha interessato tutti i quattro ambiti del comparto**, pur se quello di industria e ambiente ha segnato un +29% fra il 2014 ed il 2021 e l’ambito per agricoltura e zootecnia ben il +35% nello stesso intervallo temporale, come mostrato nella Fig. 5.



¹¹ ASSOBIOTECH – Federchimica “Report BioInItaly 2022”

Fig. 5 Andamento del numero di imprese in ciascuno dei 4 ambiti posto l'indice 2014 pari a 100. Fonte: "Report BioInItaly 2022", Assobiotec

Occorre comunque tener conto che la ripartizione per ambito di applicazione per le imprese biotech non è omogenea; infatti si riscontra che circa la metà delle imprese sono prevalentemente concentrate nell'ambito della Salute, 30% nell'ambito Industria e Ambiente e circa il 10% ciascuno degli altri due ambiti. Ancora meno omogeneo è il fatturato prodotto dalle imprese biotech, infatti il solo ambito Salute produce più dei tre quarti del totale nazionale, mentre Industria e Ambiente si attestano sul 17%; Agricoltura e Zootecnia circa sul 8% e GPTA sul 1%. Le imprese biotech sono concentrate particolarmente in quattro regioni (Lombardia, Lazio, Toscana e Piemonte) nelle quali viene prodotto il 90% del fatturato del comparto. Bisogna infine tener conto che circa il 66% delle imprese del comparto sono micro (meno di 10 addetti) ed il 16% piccole (meno di 50), anche se le ridotte dimensioni non inficiano la loro innovatività e produttività.

Due fattori molto significativi del comparto biotecnologico sono: l'importanza degli **investimenti *intra muros* per la R&S** che sono aumentati del 37,5% fra il 2014 e 2020 e la **percentuale degli addetti alla R&S rispetto al totale di dipendenti** che si attesta al 36,4%. Ciò fa concludere, nel citato report di Assobiotec: "il comparto delle biotecnologie si conferma un motore dell'innovazione nazionale, contribuendo al 5% della R&S dell'intero manifatturiero, pur rappresentando una quota molto più bassa del comparto".

Infine è interessante rilevare un altro fattore collegato con la R&S e cioè quello della **costituzione degli spin off da ricerca pubblica**. Su un totale di 1970 spin off creati fra il 2009 e 2019 in Italia, a partire da brevetti prodotti da università ed enti e istituzioni di ricerca, il 17% (335 spin off) rientrano nel comparto delle Scienze della Vita ed il 7%

(140) nel comparto Biomedicale e fra essi vi sono anche i 10 fondati dal Consorzio I.N.B.B. e Cube Labs. Pertanto anche questo indicatore mostra la dinamicità del settore nel panorama innovativo del Paese.

Promuovere un nuovo rinascimento per l'Italia della Conoscenza

Durante il Convegno INBB del 2019 avanzammo¹² la proposta di un Piano Straordinario per l'Alta Formazione e la Ricerca che permettesse al Paese di recuperare ritardi ormai non sostenibili. Poco è stato fatto, anche a causa della pandemia. Nel 2021 quattordici autorevoli scienziati italiani proposero un "Appello al Governo e al Paese"¹³ per utilizzare i fondi garantiti dal PNRR in modo da colmare il gap accumulato verso i paesi competitori nella UE. In apertura di tale documento, viene riportato quanto affermato dal Governatore della Banca d'Italia, Ignazio Visco: *"Con una popolazione calante, continuare a migliorare gli standard di vita e riportare la dinamica del prodotto intorno all'1,5 per cento (il valore medio annuo registrato nei dieci anni precedenti la crisi finanziaria globale) richiederà un incremento medio della produttività del lavoro di poco meno di un punto percentuale all'anno. È un obiettivo alla nostra portata ma che, per essere conseguito, necessita un netto recupero nei campi della ricerca, della digitalizzazione e dell'istruzione."*

Gli esponenti della scienza e dell'economia concordano su questa urgenza. La speranza è che il nuovo governo dia seguito a quanto già riportato nei progetti del PNRR e soprattutto pianifichi interventi strutturali sostenuti nel prossimo quinquennio.

¹² Atti XIII Convegno nazionale I.N.B.B., Roma 24-25/X/2019; ISBN 978-88-97987-23-9

¹³ <https://www.lincci.it/it/news/recovery-alla-ricerca-appello-al-governo-e-al-parlamento> (10/3/2021)

Quanto auspichiamo è **un nuovo Rinascimento per l'Italia della Conoscenza!**

Concretamente la nostra proposta, tenendo conto delle evoluzioni demografiche e finanziarie, delle indicazioni poste da Agenda 2030 e dei rallentamenti indotti dalla sciagurata guerra d'invasione delle Russia, si articola su 11 punti strategici, come di seguito riportato.

- 1) **Incrementare come minimo di 0,3% all'anno la quota di PIL dedicata al settore della R&S** (l'Appello più ambiziosamente indicava lo 0,5% annuo) e **di altrettanto la quota di risorse per il sistema universitario.**
- 2) **Riformare la *governance* del sistema R&S varando finalmente un'Agenzia nazionale**, di cui si discute da tempo, in grado di coordinare e ripartire le risorse nelle aree più significative sia scientifiche sia produttive e supportare con priorità **la crescita del sistema nel Meridione**, (per il quale occorrerebbe un **piano di rilancio *ad hoc***).
- 3) Favorire un **maggior collegamento del sistema R&S con il sistema produttivo**, anche attraverso **opportuni strumenti di interfaccia (come la Fraunhofer Academy, che in Germania gestisce i programmi di formazione professionale per il trasferimento tecnologico).**
- 4) Incentivare la R&S pubblica e l'impresa ad operare nella **ricerca cooperativa su obiettivi competitivi** di interesse strategico, a partire da quelli dell'energia e della sanità.
- 5) Supportare finanziariamente e strutturalmente le attività di **promozione del trasferimento tecnologico**, per far decollare un **fertile ecosistema di spin-off e laboratori di servizio** che possa evolversi con collegamenti opportuni con gli atenei, i centri di ricerca e le imprese, valorizzando al meglio le conoscenze nell'interesse del Paese.

- 6) Supportare **le imprese ed il SSN nell'assunzione di giovani laureati e diplomati** con livelli stipendiali comparabili con la media europea per contrastare la loro migrazione forzata;
- 7) Impostare un **supporto preferenziale ai settori della R&S specificatamente dedicati agli ambiti scientifici e tecnologici collegati con i goal dell'Agenda 2030** e con i significativi cambiamenti da promuovere.
- 8) **Premiare le imprese che affrontino concretamente le indicazioni previste da Agenda 2030**, introducendo significativi miglioramenti produttivi ed organizzativi compatibili con lo sviluppo sostenibile.
- 9) Intervenire rapidamente ed incisivamente sulle pratiche di **snellimento burocratico delle procedure** di assegnazione e rendicontazione dei fondi per la ricerca, che sono da tempo divenute un vero impedimento operativo per le istituzioni pubbliche e private e scoraggiano la partecipazione a nuovi progetti.
- 10) Intervenire gradualmente, ma con convinzione e visione strategica ed integrata, nel supportare i giovani con minori possibilità economiche a **poter affrontare i costi della frequenza universitaria fino al congiungimento della laurea**. Il che vuol dire edilizia per il diritto allo studio (in parte prevista nel PNRR), supporti economici e premi per i più costanti e bravi.
- 11) **Rinforzare gli atenei ed i centri di ricerca delle regioni del Meridione** per consentire, nel tempo, una diminuzione del gap esistente con le altre regioni ed il serio sviluppo di centri d'eccellenza attrattivi che **permettano, ai giovani laureati, di realizzarsi nel territorio d'origine**.

Abbiamo cercato di sintetizzare alcuni degli aspetti valutati da più parti centrali per dare **un nuovo rilancio al mondo accademico e scientifico**. Ovviamente ci potranno essere diverse sensibilità, diversi criteri di priorità, ma certo il fattore tempo gioca a detrimento per il Paese. Bisogna intervenire rapidamente per rendere competitivi il sistema dell'alta formazione e quello della R&S non solo nell'interesse del Paese, ma anche per offrire ai nostri giovani opportunità qualificate per studiare e poi lavorare in Italia ed ancora per essere attrattivi verso i giovani che potrebbero vedere l'Italia come loro patria adottiva.

Per questo auguriamo che il nuovo governo asseconi gli sforzi del mondo dell'università e della ricerca e le concrete necessità del sistema sociale e produttivo, inaugurando così un periodo di rinascimento per il Paese.

SESSIONE
***“EDCs a threat to wildlife and human
health: old challenges and novel
techniques”***

GUSTAVO MITA, UNO SCIENZIATO E UN AMICO

Luigi Nicolais

Professore Emerito Federico II, Presidente di Materias e Presidente della Fondazione Cotec



Ho conosciuto il prof. Mita, Gustavo, nei primi anni della mia carriera universitaria sia per interessi comuni che tramite un comune amico, il prof. Mosè Rossi.

Dal primo momento abbiamo condiviso il comune entusiasmo per la ricerca e per la formazione di giovani leve di ricercatori, nei settori di nostra competenza.

In varie occasioni ci siamo incontrati sia nelle società scientifiche, sia a livello ministeriale spinti dal comune desiderio di vedere una maggiore attenzione da parte della politica per il ruolo che la ricerca ha nello sviluppo del Paese.

Dal punto di vista accademico gli si deve riconoscere il grande impegno scientifico, l'innovazione e l'eccellente contributo pionieristico a livello internazionale nell'area della biofisica.

Gustavo ha sempre amato la ricerca scientifica e l'ha onorata con impegno costante, passione e determinazione dimostrando fino

all'ultimo un innato entusiasmo come quello di un giovane ricercatore con la saggezza di un maturo e competente professore.

Da attento docente universitario si preoccupava ed occupava della difficile situazione dei giovani nella ricerca in Italia, perché affermava sempre che “il futuro sono loro” e si impegnava costantemente nel far crescere giovani scienziati creando borse di studio o bandendo l'assegnazione di premi a loro destinati come avvenne nel 2019 in occasione nell'ultimo convegno nazionale I.N.B.B.

In particolare, nel CNR fu Segretario e Vicepresidente del Comitato Medicina e si è sempre distinto nel cercare la mediazione fra posizioni a volte contrapposte, opponendosi ai desideri di “colonizzare” l'ente per gli interessi esclusivi dell'accademia e favorendo un reale crescita della comunità scientifica CNR anche nel rispetto del principio dell'autonomia.

È stato eletto Presidente del Consorzio I.N.B.B. nel 1999 ed è riuscito, con il supporto dello staff, a far crescere e prosperare un'istituzione innovativa per i tempi lungo i 15 anni della sua presidenza.

Dal lato umano, i colleghi dell'università, quelli del CNR, dell'INBB, i presidenti della FISBI, i suoi studenti e tutti coloro che hanno avuto l'onore di conoscerlo e lavorare con lui, possono testimoniare la sua disponibilità, l'atteggiamento affettuoso, la capacità di relazione e la generosità nei confronti degli altri. Inoltre, parlando con lui si apprezzava il grande amore con cui parlava di sua moglie Adriana e dei suoi due figli che lo riempivano di orgoglio.

A Gustavo non si poteva non volere bene: sapeva essere grato ai suoi colleghi e sapeva dimostrarlo, elogiando pubblicamente il lavoro e la bravura di ognuno, impegnandosi sempre affinché questo venisse riconosciuto.

Purtroppo, questi ultimi anni di pandemia hanno ritardato il doveroso riconoscimento ed affetto dovutogli, ma in tutti rimane indelebile il ricordo di un grande scienziato ed amico.

INTRODUCTION OF THE HOKKAIDO STUDY AND IMPACT OF PFAS ON CHILDHOOD ASTHMA AND

ALLERGIES AND INFECTIOUS DISEASES: THE HOKKAIDO STUDY ON ENVIRONMENT AND CHILDREN'S HEALTH

Yu Ait Bamai^{1,2}, Chihiro Miyashita¹, Reiko Kishi¹

¹ *Center for Environmental and Health Sciences, Hokkaido University, Japan,*

² *Toxicological Center, University of Antwerp, Belgium*

Email address: (yu.aitbamai@uantwerpen.be)

Background: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health (the Hokkaido Study) is an ongoing birth cohort study, which aims to examine the effects of exposure to environmental chemicals on adverse health outcomes, such as birth outcomes, allergies, infectious diseases, and neurobehavioral developments among children, as well as to identify high-risk groups based on genetic susceptibility to environmental chemicals. In this presentation, our findings regarding per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS), particularly in relation to children's allergies and infectious diseases, will be illustrated, as well as future challenges will be discussed.

Methods: A total of 20,926 pregnant women were recruited between 2003 and 2012 from 37 hospitals/clinics in Hokkaido, Japan. Maternal blood samples were collected from 3rd trimester pregnant women for PFAS measurements. Allergies at 1.5, 4, and 7 years of age were defined using the questionnaire of the International Study on Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). History of infectious diseases until 7 years of age were assessed the mother self-reported questionnaires from 1.5 to 7 years of age. The odds ratios of allergies and infectious diseases were calculated by generalized estimating equation models and logistic regressions, respectively.

Results and Conclusions: Decreasing year trends of maternal PFOS and PFOA levels and increasing trends of PFNA and PFDA levels in blood collected between 2003 and 2011 were observed, respectively.

Prenatal exposure to PFOS, PFOA, PFDA, and PFUnDA reduced the risks of childhood rhino-conjunctivitis and eczema up to age of 7 years, whereas, PFOA and PFDA increased the risks of infectious diseases. Our results, suggesting immunosuppression effects of prenatal exposure to PFAS were consistent with the previous findings in other countries. Not only the effects of single chemicals, but also of chemical mixtures are warranted in the further studies.

EXPOSURE TO PLASTICIZERS OF PREMATURE NEWBORNS IN NEONATAL INTENSIVE CARE UNIT

Paulien Cleys^{1,\$,*}, Lucas Panneel^{2,3,\$}, Govindan Malarvannan³, Philippe G Jorens^{3,4}, Antonius Mulder^{2,3}, **Adrian Covaci**¹

¹Toxicological Centre, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium,

²Neonatal Intensive Care Unit, Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium,

³Laboratory for Experimental Medicine and Pediatrics, University of Antwerp, Wilrijk, Belgium,

⁴Department of Intensive Care Medicine and Clinical Pharmacology, Antwerp University Hospital, Edegem, Belgium,

^{\$} Shared first authors, E-mail presenting author: adrian.covaci@uantwerpen.be

Background: Phthalates, plasticizers used to increase elasticity of plastics, can leach from medical devices into the human body. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) was the most popular plasticizer. Due to adverse health effects, its use was restricted in medical devices (EU MDR 2017/45), and is now replaced by alternative plasticizers (APs). Neonatal intensive care unit (NICU) patients may be exposed to high amounts of plasticizers via parenteral nutrition, administered intravenously through plastic infusion circuits. This study aimed to 1) characterize current plasticizer exposure leaching from parenteral nutrition and 2) to quantify current plasticizer exposure in premature neonates and 3) to identify patients at higher risk.

Methods: Various plasticizers were identified in medical devices by LC-MS/MS and GC-MS. To assess leaching during clinical use, we developed *ex vivo* leaching experiments, based on a clinical theoretical assumption – to mimic the *in vivo* nutrition situation. Multiple urine samples were collected per patient during the NICU hospitalization, resulting in 249 urine specimens from 26 preterm and 10 control neonates. These were analyzed for phthalate and AP metabolites by LC-MS/MS. Exposure through medical devices was analyzed as predictor for urinary plasticizer metabolites using univariate non-parametric tests.

Results: Leaching of plasticizers present in the medical devices occurred in lipid emulsions, with different leaching profiles between different types of lipid emulsions, while no exposure occurred during administration of non-lipid solutions. In a clinical setting, a neonate was estimated to be exposed to doses (ng/kg bw per day) of DEHP (320), ATBC (86800), TOTM (900), BBzP (700), DnBP (620), and DEHT (250) through parenteral nutrition. The estimated DEHP exposure was below the tolerable daily intake. Median urinary phthalate metabolite concentrations were lower compared to past NICU studies. Detection frequencies of phthalate metabolites were > 90%. Detection of AP metabolites ranged 11-95%, with secondary DINCH-metabolites the most prevalent (DINCH > DEHTP > DPHP > DEHA > DINP > TOTM). Secondary DEHP metabolites (secDEHPm) were used to assess predictors of exposure. Respiratory support and blood products were significantly associated with increased urinary secDEHPm.

Conclusions: NICU patients are exposed to a wide range of plasticizers and the influence of the type of lipid nutrition and administration time on the plasticizer exposure is plasticizer-specific.

We show a favorable evolution of DEHP exposure in the NICU and we map neonatal exposure to APs. Nevertheless, despite changing legislation, respiratory support and blood products remain as important sources of phthalate (including DEHP) exposure. Sources of AP exposure in the NICU need further investigation.

EFFECTS OF PHTHALATES IN COMBINATION WITH ENDOGENOUS HORMONES ON HUMAN PROSTATE CELLS

Maria De Falco^{1,2}, Aldo Mileo¹, Vincenza Laforgia^{1,2}

1. Department of Biology, University Federico II of Naples, Naples, Italy.

2. National Institute of Biostructures and Biosystems (INBB), Rome, Italy.

Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) raise many concerns due to their chemical and physical features, such as high hydrophobicity and low water solubility. For these reasons, EDCs can persist in different environmental matrices, so human beings are daily exposed to them, through ingestion or skin contact. EDCs can biomagnificate in food chain and bioaccumulate in adipose tissue¹. EDCs can mimic endogenous hormones, affecting the homeostasis of several organs, often reproductive, such as prostate gland²⁻⁴. Dibutylphtalate (DBP) belongs to a subclass of EDCs widely used as plasticizer in personal care products, children's toy, pharmaceuticals, food products. In the present work, we studied the effects of DBP on human prostate epithelial cells (PNT1A) with or without endogenous hormones, testosterone (T) and 17 β estradiol (E₂), to assess effects of DBP alone and in mixture with natural hormones. Firstly, we observed cell viability showing that all mixtures increased cell proliferation, with a potential antagonistic effect of DBP versus estradiol. Secondly, we observed the localization of estrogen (ERs) and androgen (AR) receptors, and we showed that DBP, alone or in combination with T or E₂, was able to interact mainly with ER α . Thirdly, we showed that DBP, alone and in mixtures with T and E₂, was able to increase the expression level of ER α . On the contrary, only when DBP was in combination with natural hormones, we showed an increase of AR expression level. Moreover, we measured the migration ability of PNT1A cells after treatments, and we observed that DBP strongly increased prostate cell migration. Finally, to assess DBP role in

prostate cell inflammation, we measured cytokines and chemokines levels, and we observed that IL-9 PDGF, TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β , IL-1 β , were altered after all the treatments. DBP could play a key role in the onset of inflammation processes. In conclusion, we have pointed attention on dangerousness of EDCs alone and in mixtures because they can induce a strong imbalance of prostate cell physiology.

1. De Falco M and Laforgia V. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 18(18): 9772. doi: 10.3390/ijerph18189772
2. Forte M, et al. *Ecotoxicol Environment Saf* 2019; 180:412-9.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.035>
3. Di Lorenzo M, et al. *Ecotoxicol Environment Saf* 2018; 147:565-73.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.030>
4. Forte M, et al. *Toxicology* 2016; 357-358, 21-32.
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.024>

A PATERNAL LEGACY: THE TRANSMISSION OF EDC EPIMUTATIONS TO THE FUTURE GENERATIONS

Marta Lombó Alonso

*Cell Biology Area, Department of Molecular Biology, Universidad de León, 24071,
León, Spain*

Nowadays, plastic pollution has become one of the major concerns of the society. As a result of that, bisphenol A, a chemical plasticizer used for the manufacture of polycarbonate plastics and epoxy resins, has caught the attention of great many scientific studies. Besides the capacity of this toxicant to interfere with the endocrine system, it has been also reported to exert both genotoxic and epigenotoxic effects. Bearing in mind that the spermatogenesis is a coordinated process that relies on several steroid hormones and that entails deep changes in the chromatin, such as DNA breaks and epigenetic remodeling, it might well be affected by bisphenol A exposure. Hence, there is a great deal of evidence to show that bisphenol A has detrimental effects on male reproductive health. Hitherto, most of these works have focused on the alterations caused in sperm quality, sexual function, and the development of gonads; however, the consequences of paternal bisphenol A exposure for future generations remained still unknown.

In this scenario, the aim of this study was to determine the impact of paternal bisphenol A exposure on embryo development, using zebrafish (*Danio rerio*) as model species. For this purpose, adult zebrafish males were treated with this toxicant during the mitotic phase of spermatogenesis (two weeks of exposure). After the treatment, males were mated with non-treated females to obtain the F1 and then the F2 embryos. DNA fragmentation and the epigenetic profile (global DNA methylation and histone acetylation) of the sperm was assessed by comet assay, UPLC-MS and cell immunostaining, respectively. In the F1 progeny, we evaluated the percentage of mortality and malformations (by routine histology and by using the

transgenic line *Tg(fli1:EGFP;mlc2a: mCherry)*), the DNA repairing capacity and the epigenetic landscape (by whole mount immunostaining), the expression of genes related to histone acetylation and heart development (by qPCR) as well as the apoptotic activity (by flow cytometry). The results showed that treatment with bisphenol A triggered high levels of DNA sperm damage, which led to a dramatic increase in the apoptotic activity and embryo mortality. Even though no differences in global DNA methylation of sperm cells were found, the spermatozoa of BPA-exposed males showed higher levels of H3K27ac, being these epimutation inherited by the F1 embryos, which showed an overexpression of key genes in cardiac development. Regarding the embryo performance, the paternal treatment with BPA significantly increased the percentage of malformations, mainly consisting of cardiac edema, in both F1 and F2 larva, a generation who was never in contact with the toxicant. Eventually, the F1 embryos obtained from control males and males exposed to BPA were treated with epigallocatechin gallate. This compound is the major catechin of green tea and it had already been proved to act as an anti-estrogenic substance and as a histone acetyltransferase inhibitor. Our findings showed that the treatment with epigallocatechin gallate successfully counteracted the increased histone acetylation inherited by the F1 embryos and restored the basal levels of gene expression, thus reducing the cardiac malformations induced by paternal bisphenol A exposure.

POTENTIAL OF CARBON-RICH BYPRODUCTS OF BIOENERGY PRODUCTION TO REMOVE ENDOCRINE DISRUPTING CHEMICALS FROM WATER AND SOIL

Elisabetta Loffredo and Claudia Carnimeo

Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti, Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari, Italy

A very important paradigm of recent years is the preservation of the environment. In response to current emergencies, such as the recycling of the huge mass of organic wastes, the production of renewable energy and the reduction of environmental pollution, innovative technologies have been implemented to convert, thermochemically or biologically, biowaste into bioenergy. In addition to gaseous and liquid fuels, these processes generate solid carbon-rich byproducts that can be applied in various agricultural and environmental contexts. Biochar (BC) is the byproduct of the pyrolysis or gasification of waste biomasses to produce syngas. Due to its physicochemical properties, BC shows an adsorption capacity comparable to that of the much more expensive activated carbon. DG is the solid byproduct of anaerobic digestion of wet biomass to produce biogas and has relevant sorptive characteristics. In addition to improving soil quality and fertility, especially of degraded soil, BC and DG can regulate the fate of contaminants in agricultural systems. Both materials have been explored and applied as biosorbents for soil and wastewater remediation from heavy metals, PAH, pesticides, dyes, pharmaceuticals and so on. An added value of these materials is their contribution to the recycling of organic wastes, to carbon sequestration and to the implementation of the circular economy.

Bisphenol A (BPA) and octylphenol (OP) are well known endocrine disrupting chemicals (EDCs) with proven estrogenic activity, while many pesticides are defined by authorities as 'suspected' EDCs. These compounds are continuously released into natural water bodies through the discharge of polluted effluents or the incorporation into soil of sewage sludges and organic wastes not thoroughly decontaminated. The almost ubiquitous presence of ascertained and suspected EDCs in the ecosystems poses a serious threat to wildlife and humans.

We investigated the potential of a wood BC and a DG from mixed feedstock in removing BPA, OP and two suspected EDCs, the fungicide boscalid and the herbicide metribuzin, from water. Surface micromorphology and functional groups of BC and DG were assessed using SEM microscopy and FTIR spectroscopy, respectively. The retention capacity of these materials was evaluated by studying the sorption kinetics and isotherms. The modeling of data provided information on the biosorbents-EDCs interaction mechanisms. All compounds were adsorbed in few minutes on BC and in few hours on DG, according to a pseudo-I-order model (prevalent physisorption) or pseudo-II-order model (prevalent chemisorption) based on the molecule and the material considered. The adsorption constants, which express the retention efficiency of EDCs, were obtained fitting isotherm equilibrium data into the linear Henry equation and into the non-linear Freundlich, Langmuir and Temkin equations. Both DG and, especially, BC showed a very strong retention of the EDCs which desorbed slowly and only partially, indicating a phenomenon of hysteresis.

In conclusion, considering that these materials are 'waste from waste', have negligible costs and their performance as biosorbents is constantly improving, their use can represent a sustainable and modern approach to environmental depollution from EDCs.

SESSIONE
“Trasferimento Tecnologico e Spin-Off”

TRASFERIMENTO TECNOLOGICO E SPIN OFF

Pietro Ragni ^a e Filippo Surace ^b

^a *Direttore Consorzio Interuniversitario I.N.B.B. ; Dirigente Tecnologo ISB – CNR;*

^b *Amministratore Delegato CUBE LABS srl*

Nello Statuto del Consorzio I.N.B.B. fu, quasi trenta anni fa, previsto: “Realizzare attività di trasferimento tecnologico dei risultati di ricerche nazionali e internazionali nel settore sanitario, ambientale ed agro-alimentare”. Proprio negli ultimi anni il Consorzio ha deciso di aumentare le proprie iniziative in questo ambito ed ha promosso, presso i propri aderenti delle unità di ricerca (UdR) degli atenei affiliati, una procedura operativa per selezionare i trovati più promettenti per una *exploitation* verso il sistema produttivo.

A partire dal 2016 si è deciso di operare in base alla **Procedura per il Trasferimento Tecnologico** (PTT) messa a punto dalla direzione del Consorzio. In precedenza il Consorzio si era limitato a supportare gli aderenti per il conseguimento dei brevetti, con la PTT l’obiettivo è stato quello di iniziare ad aiutare le migliori idee di impresa degli aderenti ad approdare al mercato. Numerosi ricercatori dell’INBB hanno collaborato attivamente a questa procedura, presentando le proprie ricerche, le ipotesi di brevetto, le proposte di processo; garantendo la *peer review* interna, supportando la costruzione delle ipotesi di spin off.

Per ciascuna idea d’impresa dei nostri ricercatori, la PTT ha valutato **cinque caratteristiche strategiche**: livello di originalità, grado di maturazione, grado di innovazione, effettiva possibilità di protezione della tecnologia, potenziale industrializzazione. Quindi veniva condotto uno studio delle prospettive economiche e di mercato dell’idea di impresa e la possibilità tecnico-produttiva di conseguire gli obiettivi previsti nel caso si decidesse la costituzione di uno spin off.

Nel 2017 il Consorzio INBB ha **individuato in Cube Labs il partner di riferimento per l'accelerazione dell'innovazione** e per valutare le ipotesi di trasferimento in funzione dei potenziali obiettivi di mercato. Cube Labs (<https://cube-labs.com>) era una giovane ed ambiziosa impresa che già aveva iniziato ad operare da un paio di anni sulle tematiche del trasferimento tecnologico, accelerando i primi spin off ed intessendo una efficace rete di rapporti con il mercato della ricerca. Ora Cube Labs è il primo Acceleratore d'Innovazione sistematico nello spazio della Scienze della vita in Italia, sperimentato nel facilitare la cooperazione tra l'eccellente scienza accademica e scientifica nazionale ed il mercato delle scienze della vita che è sempre più commercialmente promettente. Ha sede a Roma, Milano e Lecce e sedi operative o laboratori in altre dieci regioni italiane.

La procedura elaborata da INBB è stata ulteriormente affinata ed articolata grazie alla collaborazione con Cube Labs ed ha permesso **nel triennio 2017-2019 di fondare 11 nuovi spin off partecipati dalle due strutture**. Si è così realizzata un'opera di TT a livello nazionale, visto che i nostri spin off sono nati da ricerche svolte in 7 regioni diverse e che alcuni di essi sono stati nel 2020 ospitati in nostri laboratori nel Sud. Per cui impatto nazionale, ma anche valorizzazione del Sud, poi premiata da un cospicuo supporto economico della Cassa Depositi e Prestiti tramite l'intervento diretto del Fondo Nazionale dell'Innovazione CDP VC SGR nel capitale di 4 Spin-Off.

La PTT ha previsto, dopo che l'idea d'impresa aveva superato l'esame in base alle caratteristiche sopra indicate, che Cube Labs e INBB analizzassero congiuntamente le condizioni di fattibilità sulle quali costituire un nuovo spin off, le riportiamo di seguito.

a) Dimensione sociale, economica e culturale dell'impatto

L'idea d'impresa viene analizzata rispetto al potenziale impatto che potrebbe ottenere se venisse costituito uno spin off in grado di valorizzare concretamente il trovato, il brevetto, il processo innovativo alla base dell'idea. In particolare si cerca di valutare il potenziale impatto sui futuri utenti, la dimensione economica attesa nel medio

termine, il livello scientifico e culturale dell'innovazione proposta.

b) Rilevanza rispetto al contesto di riferimento

Individuato il settore (o i settori) di mercato del futuro spin off, si cerca di valutare gli eventuali competitor già affermati sul segmento di riferimento, la consistenza della potenziale platea degli utenti del prodotto che si ambisce realizzare e lanciare, le difficoltà oggettive esistenti ad uno sviluppo delle attività rispetto al contesto di riferimento, le condizioni necessarie per industrializzare le attività dello spin off una volta che il prodotto fosse messo a punto.

c) Valore aggiunto per i beneficiari

I potenziali beneficiari del nuovo spin off sono diversi e ciascuno deve essere in grado di ricoprire un ruolo consistente e/o ricevere un significato beneficio dalla costituzione e operatività dello spin off. Possiamo individuarli in: I) il Consorzio e Cube Labs, II) l'inventore/proponente, III) il team alle spalle dello spin off, IV) il mercato di riferimento.

I) Il Consorzio riesce ad implementare le attività di trasferimento tecnologico offerte ai propri aderenti rispetto a quanto fatto in passato, deve investire nel nuovo soggetto e deve essere convinto di supportarlo per i primi anni di vita.

Cube Labs, essendo convinto dell'opportunità di dar vita al nuovo spin off, dev'essere in grado di finanziarne per larga parte la costituzione e supportarlo in una serie di aspetti complementari allo sviluppo scientifico dell'attività.

INBB e Cube Labs devono essere percepiti nel contesto di riferimento come player significativi ed affidabili nell'accompagnare le attività di trasferimento tecnologico.

II) Una trentina di aderenti sono stati interessati dalla Procedura dell'INBB ed hanno proposto loro idee imprenditoriali. Una quindicina di aderenti sono coinvolti negli spin off poi avviati. Numerosi aderenti sono stati coinvolti nelle attività di *peer review* per la PTT.

Nel momento in cui lo spin off viene costituito, l'inventore/proponente

è il primo attore dello stesso, la sua attività di ricerca è coronata da un successo anche di mercato ed in prospettiva economico. Si deve impegnare a trasferire il (o i) brevetto attorno a cui lo spin off è stato creato e si deve impegnare a continuare ad implementare la linea di ricerca fino all'applicazione; ovviamente sarà proprietario di parte del patrimonio societario ed avrà tutto l'interesse a che lo spin off si affermi sul mercato della ricerca.

Rileviamo con piacere che alcuni ricercatori, aderenti e non, anche recentemente, hanno manifestato il loro interesse a proporre quanto prima idee progettuali che potrebbero poi avviare nuovi spin off.

III) Nel momento della valutazione dell'ipotesi di creare il nuovo spin off, si fa un'analisi con l'inventore/promotore del suo team e delle sue capacità in prospettiva. Per esempio se il proponente è piuttosto anziano, bisogna essere certi che ci sia un valido allievo/a che già lavori con lui sull'argomento centrale per lo spin off, come anche, in generale, bisogna valutare se ci sono nel team del proponente tutte le competenze necessarie per l'implementazione dell'attività o se in breve sarà necessario coinvolgere qualche giovane ricercatore. Chiaramente uno o più dei collaboratori del proponente potrà essere coinvolto nell'assetto societario del nuovo spin off e/o associato nella firma del brevetto.

IV) Cube Labs in particolare si incarica, prima di decidere favorevolmente sulla creazione di un nuovo spin off, di verificare con attenzione, tramite apposita due diligence, il mercato di riferimento per valutare la possibile competitività del nuovo spin off e la presenza a meno di forti competitor rispetto al prodotto previsto, la possibile di protezione intellettuale e la sostenibilità finanziaria del progetto.

Al contempo per ampliare le opportunità di mercato e collaborazioni scientifiche per gli spin off sono stati stipulati: un accordo fra INBB, Cube Labs e Boltzmann Institute (ente di ricerca AT) nel novembre 2018 ed uno di entrambi con OnGranada (ES ente di innovazione) nel settembre 2019; una alleanza strategica di Cube Labs con Shizim Group in Israele e Poland Biomed Ventures, per catalizzare

l'innovazione del settore Life Sciences ed una collaborazione con Ulysses Advisory Group ed numerose altre istituzioni internazionali del mondo dell'innovazione sui mercati internazionali. Gli spin off costituiti sono stati collegati al progetto finanziato dal Programma Erasmus Plus denominato "BIO-ALL" ed avviato nel 2018, con l'obiettivo di realizzare un percorso formativo master per formare figure che opereranno per garantire l'interfaccia fra gli enti di ricerca (università incluse) ed il sistema produttivo nell'ambito delle Life Sciences. Ciò ha consentito la partecipazione dei ricercatori degli spin off a vari meeting internazionali nel '20 e '21 illustrando le loro linee di ricerca.

La creazione di ben 11 spin off in tre anni è il risultato più significativo ottenuto con l'adozione della nuova PTT. È stato un cambiamento di paradigma per il Consorzio con proficui impatti verso gli atenei e le UdR coinvolti, verso il mercato delle Life Sciences cui è stato offerto un ecosistema di nuovi spin off competitivi e, in prospettiva, per i consumatori/pazienti interessati ai prodotti che già ad oggi vengono offerti da alcuni degli spin off.

Riportiamo di seguito una brevissima presentazione degli spin off compartecipati da INBB e Cube Labs.

- **DTech Srl** – Piero Chiarelli (CNR Pisa) Data Costituzione dicembre 2017. Cura di infezioni semplici e complesse del cavo orale e degli impianti dentali con un idrogel biocompatibile in grado di aderire a tessuti duri e molli.
- **Biodiapers Srl** – Piero Chiarelli (CNR Pisa) Data costituzione dicembre 2017. Realizzazione di prodotti completamente biodegradabili destinati al controllo dell'assorbimento infantile, femminile e senile.
- **Cartilago Srl** - Roberto Scandurra (Roma "Sapienza") Data costituzione dicembre 2017. Sviluppo di un progetto innovativo sull'uso di due derivati peptidici che risultano

efficaci nel controllo delle infiammazioni articolari e nella stimolazione di nuovo tessuto cartilagineo.

- **Adamas Biotech Srl** – Saverio Bettuzzi (Univ. Parma) Data costituzione aprile 2018. Ricerca e sviluppo di sostanze naturali (catechine del tè verde) nel settore della cura della salute e della persona.
- **Rescue Code Srl** – Massimo Massetti (Gemelli, Roma) Data costituzione dicembre 2018. Ricerca e sviluppo di prodotti del settore cardiologico e cardiocirurgico con focalizzazione su strumentazioni innovative.
- **Orpha Biotech Srl** – Amato De Paulis (Univ. Napoli) Data costituzione dicembre 2018. Ricerca, Sviluppo, sperimentazione, produzione e commercializzazione di prodotti del settore delle malattie orfane.
- **MRC Srl** – Salvatore Guccione (Univ. Catania) Data costituzione dicembre 2018. Società si occupa della profilazione, progettazione e riposizionamento dei farmaci tramite attività di analisi computazionale e dello sviluppo di nuove soluzioni nel settore delle malattie rare, nelle malattie neurodegenerative e nell'area terapeutica oncologica.
- **Bio-Aurum Srl** - Silvia Bisti (Univ. L'Aquila) Data costituzione dicembre 2018. Realizzazione di prodotti a base di zafferano per l'uso in malattie neurodegenerative e nelle patologie a carico del sistema nervoso e di altri organi.
- **Lumina NanoBiotech Srl** – Aldo Roda (Univ. Bologna) Data costituzione dicembre 2018. Ricerca e sviluppo, di strumentazioni e biosensori portatili e miniaturizzati ad elevate prestazioni analitiche in campo diagnostico chimico-clinico, biomolecolare ed oncologico.
- **Skin Plastic Srl** – Giovanni Papa (Univ. Trieste) Data costituzione maggio 2019. Ricerca e sviluppo nel settore della dermatologia ed in particolare nel settore della chirurgia plastica, ricostruttiva ed estetica.

- **CRATI Srl** – Massimo Massetti (Gemelli, Roma) e Guido Danieli (UniCS) Data costituzione ottobre 2020. Ricerca e sviluppo di sistemi parzialmente robotizzati per interventi endovascolari assistiti con procedura TAVI per risolvere patologie della valvola aortica ed in particolare stenosi aortica e steno-insufficienze.

A ciascun spin off INBB garantisce: a) accordo di ricerca per lo sviluppo R&D a condizioni di vantaggio rispetto al mercato; b) valorizzazione tramite il proprio network e partecipazione a progetti e convegni nazionali ed internazionali; c) supporto per le attività di informazione e formazione di interesse per la diffusione commerciale dei prodotti; d) disponibilità a partecipare, anche con unità di ricerca delle università aderenti, a progetti e commesse per consentire una più rapida evoluzione delle attività societarie. Cube-Labs si occupa del supporto nella corporate governance, nella protezione intellettuale dell'invenzione, nella valorizzazione finanziaria e/o commerciale, nel curare la raccolta di capitali di rischio e di finanza agevolata, nella realizzazione del marketing package (pitch, info-memo, Business Plan, sito web), nella definizione degli aspetti di regolatorio e market access.

Per ciascun spin off avviato è stato realizzato: a) documento di presentazione dell'idea progettuale e del prodotto; b) studio del mercato di riferimento; c) logo e sito web; d) impostazione linee di sviluppo a breve e medio termine; e) adempimenti societari; f) alleanza strategica internazionale nel settore Life Sciences; g) accordi di co-investimento con primarie istituzioni finanziarie. In questo modo i nuovi spin off in breve tempo hanno avuto lo strumento per posizionarsi opportunamente nel mercato di riferimento, come dimostrano i numerosi e lusinghieri riferimenti sui media ed i numerosi articoli scientifici realizzati sulle proprie linee di ricerca, divenute il *core* del nuovo spin off, dai proponenti dell'attività di TT. Quattro degli spin off sono stati supportati da fondi reperiti sul mercato

della ricerca, di particolare rilevanza quelli garantiti da Cassa Depositi e Prestiti Venture Capital SGR all'interno del Programma Seed per il Sud. Il Fondo, facendo seguito all'iniziativa di successo, ha sottoscritto con Cube Labs un accordo quadro in cui si definiscono ulteriori possibili interventi tramite un round follow-on di investimento. Siamo inoltre in attesa di ulteriori conferme per nuovi investimenti relativi agli altri spin off costituiti che dovrebbero essere alimentati tramite una raccolta in corso effettuata da Cube Labs sul mercato dei capitali istituzionali. Cinque giovani ricercatori sono stati contrattati nell'ambito delle attività degli spin off in corso.

IL CONTRIBUTO DI ADAMAS BIOTECH ALLA RICERCA NUTRACEUTICA E NELLA LOTTA CONTRO LA SINDROME DA COVID-19

Saverio Bettuzzi

ADAMAS Biotech; e-mail: sbettuzzi@adamasbiotech.it

Consorzio InteruniversitarioINBB

In Adamas Biotech sviluppiamo soluzioni profilattiche e terapeutiche, clinicamente convalidate e basate sul metodo scientifico e sulla medicina dell'evidenza, per una gamma di indicazioni cliniche e benessere e per soluzioni innovative nel campo della nutraceutica. A causa della mancanza di requisiti normativi, la maggior parte degli integratori e dei nutraceutici sul mercato non offre concentrazioni standardizzate e garantite dei composti bioattivi, e spesso non sono clinicamente validati per l'efficacia. In Adamas Biotech sviluppiamo prodotti scientificamente convalidati che sono nettamente superiori in termini di efficacia, assorbimento, metabolismo e conservabilità del prodotto, e produciamo dati che possono portare all'approvazione di indicazioni salutistiche da parte dell'EFSA. L'efficacia delle nostre formulazioni proprietarie viene validata in studi clinici controllati. La nostra piattaforma si espande continuamente ed ora include soluzioni per la prevenzione e cura del cancro della prostata, dell'ipertrofia prostatica, delle ustioni, della psoriasi, dell'alopecia e comprende applicazioni in medicina dello sport e per il contrasto alla pandemia da COVID-19.

Il nostro studio clinico pionieristico sul COVID-19 è stato pubblicato sulla rivista specializzata COVID (Bettuzzi, S.; Gabba, L.; Cataldo, S. Efficacy of a Polyphenolic, Standardized Green Tea Extract for the Treatment of COVID-19 Syndrome: A Proof-of-Principle Study. COVID 2021, 1, 2-12. <https://doi.org/10.3390/covid1010002>). In breve:

Introduzione: Le catechine del tè verde sono potenti agenti antiossidanti, antinfiammatori e antivirali, sicuri per l'uso umano. Durante il lockdown dell'autunno 2020 (quando il vaccino non era disponibile) abbiamo progettato uno studio clinico per il trattamento domiciliare, facile da eseguire ed a basso costo. I pazienti sono stati reclutati e seguiti da medici di famiglia. In attesa del ricovero, a causa del sovraccarico delle strutture sanitarie, 10 pazienti positivi al tampone sintomatici per SARS-COV-2 sono stati trattati a domicilio per 15 giorni con un estratto di catechine altamente purificato somministrato in due sedute di inalazione, più tre capsule per via orale, al giorno (totale catechine/die: 840 mg; totale EGCG: 595 mg). Tampone rinofaringeo ed esami di laboratorio del sangue sono stati eseguiti a inizio e fine del trattamento.

Risultati e Conclusioni: tutti i pazienti hanno risposto al trattamento dopo 9 giorni (7-15gg). Sette si sono negativizzati al test del tampone nasofaringeo SARS-COV-2 dopo 9 giorni (6-13gg), contro una media di controllo di 31 giorni. Tutti i pazienti sono guariti senza complicazioni e rapidamente usciti dalla quarantena perché privi di sintomi. I marcatori di infiammazione alfa-1 anti-tripsina, proteina C-reattiva ed eosinofili sono significativamente diminuiti. IL-6 e velocità di eritrosedimentazione sono diminuite in 7 pazienti su 10. Durante lo studio non sono stati registrati effetti collaterali di alcun tipo. Questo studio descrive per la prima volta una terapia per COVID-19 molto economica e facile da eseguire al domicilio del paziente, con riduzione di ricoveri ospedalieri e costi di trattamento. I dati dimostrano la potente attività anti-infiammatoria delle catechine del tè verde purificate.

Questo risultato ha permesso ad Adamas Biotech di sviluppare, in collaborazione con DTech (entrambe società di Cube Labs), il **DTech biogel Spray**: un biogel brevettato con catechine bioattive che, somministrato nel tratto respiratorio superiore, impedisce alle particelle virali di infettare le cellule ospiti e svolge attività anti-infiammatoria locale. I componenti della formulazione sono stati

testati per la tossicità e la sicurezza e saranno presto disponibili sul mercato.

PHYTOTHERAPY IN NEURODEGENERATIVE DISEASES

Silvia Bisti 1,2 and Stefano Di Marco^{1,2,3,4}

1 Bio Aurum s.r.l., via Mangionello 12, Maglie (LE), 73024, Italy 2 Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi (INBB), Rome, Italy 3 Center for Synaptic Neuroscience and Technology (NSYN), Fondazione Istituto Italiano di Tecnologia, Genova, Italy 4 IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genova, Italy

Bio Aurum's vision is to become a key player in a unique niche of the booming nutraceuticals sector through its focus on products derived from saffron. Only recently its role as neuroprotective agent in neurodegenerative retinal diseases has been scientifically explored and largely understood by partner research groups. Researchers not only have more than a decade of basic and translational research experience in the initial target field of neurodegenerative retinal diseases but it has been able to exploit the fruits of the research by defining scientifically both the chemical profile of active saffron (patented) and ways of action. Saffron "repron" treatment has been proved to be active in age related macular degeneration (AMD) and, more recently, in Stargardt disease. Bio Aurum's will target a variety of central neurodegenerative disease including Alzheimer's and Parkinson, where aging and neuro-inflammation play pivotal role. On both saffron treatments might be beneficial. Saffron does not have a unique way of action. It was proved that it is able to modulate the activity of many genes and eventually slowing down the progression of neurodegenerative diseases. Saffron components seem to act in a synergistic way. Saffron treatment might induce "acquired resilience" and counteract dismetabolic negative events. In addition, a prototype (quoted below) to evaluate visuo-motor function for an early diagnosis of central pathologies and to monitor its progression and treatment efficacy is under test. We might diagnose and manage neurodegenerative disorders at very early stages.

A NOVEL PREDICTIVE MODEL FOR EARLY DIAGNOSIS OF NEURODEGENERATIVE DISEASES BASED ON OCULAR MOVEMENTS DELAY DETECTION

Massimo Contini 1, 2, Maria Angela Bagni1, 2, Silvia Bisti2, Matteo Moro3, Matilde Cerbai4, Bianca Martinelli Consumi2.

1University of Firenze, IT; 2INBB, IT, 3University of Genova, 4University of Torino.

After more than 15 years of research on the active principles of saffron and its efficacy as neuroprotector against neurodegeneration, what it was really still missing to start its regular administration on large scale was a system of precocious diagnosis of the most common Neurodegenerative Diseases (ND). Indeed, to counteract the neurodegenerative process efficiently, we need to intercept the early onset of these diseases. Now finally we are able face this problem.

In collaboration with BioAurum we have developed and prototyped a new device (1), already submitted for a patent request for Italy and Europe, that will help us greatly in making precocious diagnosis of ND. The basic idea is quite simple:

We are going to use the ocular movements delay detection as a predictor of an early onset of ND.

This approach starts from the following considerations;

a) There is no doubt that the most effective way to counteract ND starts with a precocious diagnosis; indeed, patients affected by ND start their treatments when they are already in a symptomatic state with a consequent important decrease to get access to a good prognosis.

- (1) KIT INTERATTIVO DI ANALISI DELLO SGUARDO PER LA DIAGNOSI PRECOCE DI PATOLOGIE NEURODEGENERATIVE
Assigned number: 102021000007313 Submitted for patent request: 25/03/2021 Inventors: MA Bagni, S Bisti, M Contini, G Rontini

- b) A motor control deficit is always present in this kind of diseases.
- c) As expression of this deficit, ocular movements deficit is present among the characteristic symptoms of these diseases (quote)
- d) From a motor control system point of view any deficit of its efficiency starts from the control loss of the most accurate and precise movements of its repertoire.

That is why ocular movements have been chosen as a tester to verify the integrity of the motor control system that involves the entire correct functioning of the CNS.

This is true indeed for theoretical reasons because:

- there is no doubt that ocular movements are among the most accurate and precise movements of our repertoire
- they are finalized to vision, they are indissolubly bound to the acquisition of the most important sensitive information for our CNS, the visual information.

practical reasons

- we have indeed the possibility to explore the integrity of these movements and their following role in sensory motor transformation as well, through visual tests commonly used for clinical purposes.
- Using these tests (in multiple different tests configurations) we will be able to detect the presence of any significant delay in activation of the oculomotor system.

For all these reasons the visual system represents a wide window through which look at the correct functioning of the entire CNS, and the ocular movements an ideal tool to test this functioning.

To detect and measure such a delay, during normal visual test execution, a new device has been developed in two different configurations,

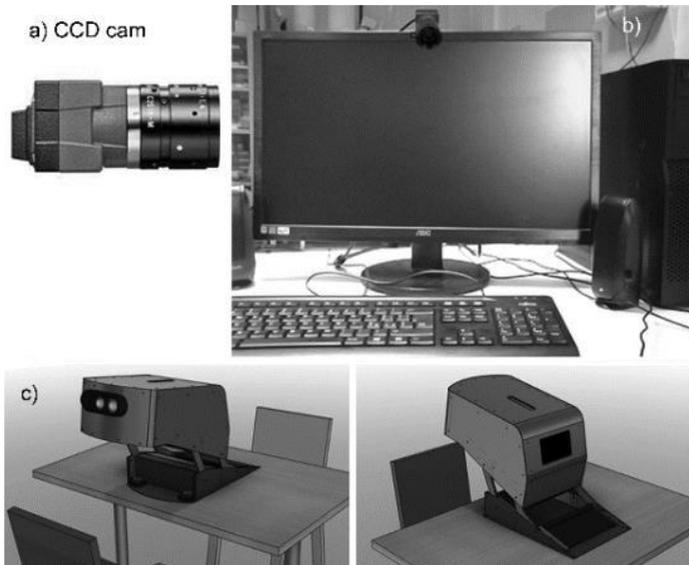
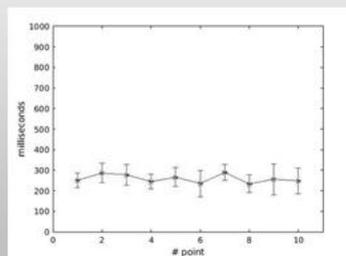
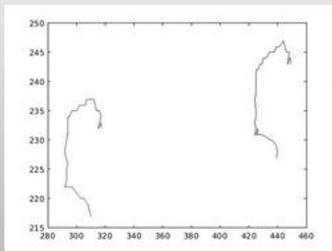


Fig.1 Normal workstation and c: portable version, based on the ability not only to track eyes movements but also to measure their activation time after any test was given.



On the left: traces of both eyes following a series of dots appearing in sequence and drawing a rectangle.
On the right: measures of time among the first ten saccades made by the eyes moving from a point to the next.

Fig. 2 Traces of both eyes

That means that you can analyzed simultaneously many different time traces for the same subject: one for saccade, one for fixation

movements, one for contrast sensitivity, one for color detection and so on, till reach a specific score for that subject, given by the integration of all those timed actions.

The specific score reached by each subject will be then confronted with a threshold value previously determined and in case of a higher value, the subject will be promptly redirected to a deeper diagnostic procedure according with neurologist/ophthalmologist suggestions.

In any case the proper set of visual tests shall be tailored on each subject by the prototype, giving us an ideal tool to monitor his or her eyes motor control system efficiency and determining if he/she will be susceptible to develop in the future some more specific deficit typical of a particular ND. Moreover, the prototype will be a useful tool in monitoring too any follow up needed to check both the evolution of the disease and the efficacy of any pharmacological treatment.

Particularly, those treatments based on precocious administration of neuroprotective effectors (like saffron) should take the maximum advantage of their association with a precocious diagnosis system like this.

Indeed, together they could build an ideal tool to delay as much as possible the beginning of the pharmacological treatment of the symptomatic state preserving at the same time as longer as possible its efficacy and ameliorating sensibly the patient prognosis.

L'ESPERIENZA CNR NELLA CREAZIONE DI IMPRESA SPIN-OFF

Daniela F. La Noce

Responsabile "Promozione e Sostegno Spin-off" CNR – Unità Valorizzazione della Ricerca

Nel quadro delle azioni finalizzate a promuovere la valorizzazione e l'utilizzazione dei risultati della ricerca e a potenziare il trasferimento tecnologico al tessuto produttivo, in cui il CNR è fortemente coinvolto, l'Ente promuove dai primi anni 2000 la nascita di imprese spin-off. Da allora ho l'onore di coordinare il settore dedicato a sostenere l'avvio e lo sviluppo di iniziative imprenditoriali con il fine primario di valorizzare il know-how e le tecnologie a valenza innovativa e gli output della ricerca condotta all'interno del CNR e di sviluppare nuovi prodotti e servizi che da questa scaturiscono.

Le imprese spin-off, oltre a rappresentare un efficace strumento di valorizzazione della conoscenza prodotta da università ed enti pubblici di ricerca - chiamati a svolgere, oltre alla mission principale, anche il ruolo di agenti di accelerazione di processi innovativi e di promotori del progresso economico e sociale - basando la loro attività su tecnologie avanzate altamente all'avanguardia, sono fonte di rinnovamento tecnologico e di crescita per il sistema economico in cui operano.

Ad oggi il CNR ha favorito, complessivamente, la nascita di oltre 75 nuove società, nei settori emergenti quali: Life sciences, Biomedicale e Biotecnologie, ICT, Intelligenza artificiale, Nanotecnologie, Nuovi materiali, Greentech e Energy, Agritech.

Va detto, innanzitutto, che le spin-off vedono il coinvolgimento diretto del personale CNR, anche non strutturato, che è il promotore

delle nuove iniziative, in collaborazione con altri attori, quali istituzioni pubbliche di ricerca, soggetti imprenditoriali e finanziari.

Tra le caratteristiche premianti delle imprese, si rileva, da un lato, che la maggior parte dei progetti si fonda su IPR nazionali e internazionali, che favoriscono l'acquisizione di posizioni di vantaggio competitivo e comportano ritorni economici in termini di *royalty* per l'Ente, e, dall'altro, la presenza nelle compagini societarie di partner industriali e istituzioni di ricerca, a testimonianza della consolidata collaborazione sviluppata in settori a elevato contenuto tecnologico e, ormai in maniera sempre più significativa, di investitori.

In questi anni, il processo di promozione e sostegno per la creazione di impresa, si è articolato in fasi successive, caratterizzate da diverse strategie e *policy*, tradotte in differenti regolamentazioni, tese a disciplinare modalità e sistemi per l'avvio delle imprese, con l'intento di implementare modelli sempre più funzionali all'attivazione dei processi, come nel caso dell'ultima revisione, che ha prodotto una risposta decisamente positiva da parte della rete scientifica dell'Ente, portando a un rilevante incremento delle proposte e delle imprese spin-off costituite.

Intervengono, infatti, come fattori di facilitazione per la diffusione dell'imprenditorialità innovativa alcune condizioni di base quali la presenza di politiche e di programmi a sostegno delle nuove iniziative e la disponibilità, presso i centri di ricerca, di regolamenti, di servizi, volti ad assistere attivamente i ricercatori lungo tutto il percorso di spin-off, di risorse e infrastrutture di supporto secondo la logica dell'incubazione di impresa. Di fondamentale importanza è, altresì, la capacità di realizzare sistemi di *networking* con i soggetti che operano nel sistema dell'innovazione - altre strutture omologhe, istituzioni e imprese - e con gli investitori finanziari, al fine di facilitare l'accesso delle costituende spin-off alle risorse finanziarie necessarie nei diversi

stadi (*early stage* ed *expansion financing*) e alle risorse manageriali e di marketing che consentono di valutare le possibilità di successo sul mercato delle idee tecnologiche. La valutazione delle potenzialità commerciali, unitamente alla stima del *time to market*, rappresenta uno degli aspetti fondamentali in sede di pianificazione del progetto al fine di limitare il rischio di insuccesso, accanto agli altri fattori costitutivi quali *IP strategy*, studio di mercato, quantificazione del fabbisogno finanziario e, di particolare importanza, composizione del team e valutazione di capacità e competenze. Proprio le caratteristiche del team imprenditoriale, con grande attenzione anche sull'aspetto motivazionale, saranno uno dei principali asset oggetto delle due diligence dei potenziali finanziatori delle start-up.

L'Unità Valorizzazione della Ricerca con il Settore Promozione e Sostegno Spin-off, supporta la rete scientifica in tutto il complesso processo che va dallo *scouting* delle idee potenzialmente meritevoli di sviluppo alla realizzazione della nuova impresa, con azioni che riguardano il tutoring e l'assistenza per il business planning, il raccordo e la negoziazione degli accordi con gli altri *stakeholder* pubblici e privati, l'istruttoria per gli Organi di governo dell'Ente, la promozione dei progetti di impresa per l'attrazione di investimenti e il networking con il settore produttivo, la gestione della partecipazione del CNR nelle società, il monitoraggio e le attività di sensibilizzazione, formazione e comunicazione, strategiche per la diffusione e implementazione di una cultura imprenditoriale presso la rete di ricerca.

Sempre più, negli ultimi anni, sono state messe in campo strategie mirate ad accrescere l'efficacia ed efficienza del sostegno, non solo in fase di progettazione e avvio ma nello sviluppo delle spin-off al fine di generare iniziative in grado di produrre ricadute positive su competitività, innovazione e occupazione e promuovere progetti di impresa sostenibili sul piano tecnologico e industriale con capacità di

crescita e di attrazione di investitori. Il Settore ha ulteriormente intensificato le azioni volte a rafforzare i rapporti tra potenziali imprenditori, sistema industriale e istituzioni finanziarie/*venture capital* e a promuovere la partecipazione delle imprese e delle idee imprenditoriali a manifestazioni, *call for ideas*, *business plan competition* nazionali e internazionali. Si sono ampliati il *network* con il sistema produttivo, per lo sviluppo di *partnership*, e le collaborazioni e i rapporti con Fondi di VC e di investimento, dedicati alla valorizzazione delle tecnologie generate dalla ricerca pubblica, per l'accesso agli investimenti e il supporto per il conseguimento degli obiettivi di industrializzazione dei progetti.

I positivi risultati, che ci si augura di moltiplicare e consolidare, riguardano non solo l'incremento del numero delle spin-off, ma anche i finanziamenti acquisiti, da parte degli investitori, per lo sviluppo delle imprese e l'aumento della sinergia con altre istituzioni e imprese, anche di grandi dimensioni, con conseguente valore aggiunto in termini di apporto dal punto di vista manageriale e di accesso al mercato. Ed è soprattutto da segnalare la nascita di imprese in grado di produrre un impatto altamente positivo in termini sociale, economico e occupazionale, anche in relazione ai settori di riferimento delle spin-off CNR costituite di recente, che hanno come *mission* la risoluzione delle sfide negli ambiti di frontiera quali: healthcare, environmental sustainability, circular economy, AI e quantum technologies.

THE HYBRID SCALPEL: AN INSTRUMENTAL EVOLUTION IN CARDIAC SURGERY

Massimo Massetti

Scientific Director, Rescue Code srl

Rescue Code is a spin off founded in the 2018 by Consorzio I.N.B.B. and Cube Labs starting from the innovative ideas of Prof. Massimo Massetti. Rescue Code develops innovative solutions in interventional cardiology and emergency cardiac surgery. Our technologies are designed to facilitate cardiac surgeons' work, reduce complications for patients and increase overall success and survival rates.

Bleeding and damage to tissues remain critical challenges during laparoscopic cardiac surgery, often complicating the procedure itself, as well as leading to potentially serious post operative problems.

Rescue Code has developed the Hybrid Scalpel (failed patent and PCT extension), a technology that simplifies and speeds the standard operating procedures of laparoscopic surgery, such as cutting, coagulation, and dissection.

The Hybrid Scalpel is the combination of a hydrodissector with a standard mono-polar electrical scalpel. The hydrodissector is driven by a fluid composed of a combination of sterile water and carbon dioxide, which separates delicate tissues and cools down the scalpel tip.



Blue button: COAG

Yellow button: CUT

The Hybrid Scalpel's design completely eliminates the carbonization of tissues that typically occur with this class of instruments, and substantially increases visibility during surgery.

Rescue Code's Hybrid Scalpel promotes:

- enhanced visibility of the operative field,
- better separation/spreading of tissue layers (blunt dissection) with aerosol,
- better exposition of the target tissue, rendering the procedure faster and easier.

SESSIONE
“Biosensori”

PROGRAMMABLE DNA-BASED ELECTROCHEMICAL SENSORS FOR MOLECULAR DIAGNOSTICS

Alessandro Bertucci

*Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability
University of Parma, Italy*

Electrochemical sensors can integrate specific sequences of synthetic DNA as molecular receptors or even dynamic DNA-based systems as interfacial processor layers. The detection of target molecules is achieved by converting programmable hybridization processes and high-affinity recognition events into measurable electrical outputs. Electrochemical DNA sensors leveraging redox-active DNA probes (E-DNA) anchored to the electrode surface are a class of devices that has enabled the rapid, reagentless, amperometric detection of clinically relevant small molecules, nucleic acids, and proteins, offering paths forward to point-of-care diagnostics and therapeutic drug monitoring. The versatility of DNA nanotechnologies allows for engineering a wide variety of molecular transduction systems that can be interfaced with many materials substrates to design unique nucleic acid-based biosensors. Carbon nanotube (CNT) electrodes are a promising electrochemical platform because they are cheaper than traditional gold electrodes, show advantageous electrocatalytic and conductive properties that augment the efficiency of electron transfer processes and the amplitude of the output current, and present a larger surface area to accommodate an increased number of probes and receptors. Carbon nanotube screen-printed electrodes (CNT-SPEs) have, however, found limited application in the design of electrochemical DNA-based sensors, mainly due to difficulties in controlling hybridization processes at the materials interface. This lecture will present design rules for new classes of CNT-based electrochemical biosensors in which dynamic DNA systems are finely controlled at the electrode surface, showing that specific hybridization

and recognition processes can be monitored by using redox-tagged DNA strands yielding a measurable amperometric signal. A strategy to reduce the non-specific adsorption of non-target sequences will be demonstrated, which allows for a precise control over the formation of specific DNA duplexes on the electrode surface. This will be shown to support the development of novel amperometric hybridization platforms based on programmable DNA strand displacement reactions and on totally artificial DNA structures templated by a small molecule, allowing for performing strand exchange reactions that can prove useful to devise new bioelectrochemistry approaches. By using a DNA aptamer sequence, the same electrode interface can be engineered into a sensing platform for the recognition of a specific protein, leveraging a dynamic process based on a high-affinity binding event. It will be shown that an electrochemical sensor enabling the single-step, reagent-free detection of the SARS-CoV-2 spike protein can be engineered by using a redox-tagged DNA aptamer targeting the protein receptor binding domain. This aptamer behaves as a dynamic probe/transducer and undergoes a binding-induced structural folding that results in a controlled suppression of the amperometric signal, allowing for the detection of target S1 protein in both physiological conditions and an artificial viral transport medium used for the collection of nasopharyngeal swabs.

[1] S. Fortunati, I. Vasini, M. Giannetto, M. Mattarozzi, A. Porchetta, A. Bertucci,* M. Careri, *Anal. Chem.* **2022**, 94, 5075-5083. [2] F. Curti, S. Fortunati, W. Knoll, M. Giannetto, R. Corradini, A. Bertucci,* M. Careri, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, 14, 19204-19211. [3] S. Fortunati, F. Pedrini, E. Del Grosso, L. Baranda, A. Bertucci,* *Anal. Sens.* **2022**, e202200037.

JAG1FLUC: SVILUPPO E APPLICAZIONE DI UNA PROTEINA RICOMBINANTE BIOLUMINESCENTE COME BIOMARCATORE PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL CANCRO AL COLON

Angela Punzo a, Alessia Silla b, Patrizia Simoni c, Sylvia Daunert d,
Aldo Roda e e **Cristiana Caliceti e,f**

a Dip. di Chimica “G. Ciamician”, Università di Bologna, Bologna (Italia).

b Dip. di Scienze della Qualità della Vita, Università di Bologna, Rimini (Italia).

c Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Università di Bologna, Bologna (Italia).

d Dip. di Biochimica e Biologia Molecolare, University of Miami, Miami (FL, US)INBB,

e Istituto Nazionale Biosistemi e Biostrutture, Roma (Italia).

f Dip. di Scienze Biomediche e Neuromotorie, Università di Bologna, Bologna (Italia).

Il cancro del colon (CRC) è il terzo tumore più comune nel mondo occidentale negli uomini e il secondo nelle donne, con circa 43.700 nuove diagnosi in Italia nel 2020 e circa 21.700 decessi nel 2021. Questi dati sono inaccettabili, considerando che il CRC ha una prognosi sostanzialmente favorevole se diagnosticato in fase precoce, per cui la ricerca di biomarcatori non invasivi (i.e. liquid biopsy) predittivi risulta essere fondamentale. Studi recenti suggeriscono un ruolo centrale dell'attivazione aberrante del “Notch signaling” nel CRC, anche se non viene comunemente utilizzato nella pratica clinica. In questo contesto, abbiamo sviluppato un biosensore che utilizza una proteina ricombinante derivata dal dominio extracellulare (ECD) della forma mutata ad alta affinità per Notch del ligando Jagged 1 (Jag1) [1] contenente una luciferasi di lucciola mutata che emette nel rosso a 610 nm “red emitting” (FLuc) [2], prodotta con il sistema del baculovirus in cellule di insetto. Lo scopo è stato quello di verificare se il legame Jag1-FLuc sia correlato a una sovraespressione di Notch nella progressione del CRC. In primo luogo, per valutare l'emissione luminosa della proteina, abbiamo valutato il nuovo costrutto in un

sistema *cell-free*. Utilizzando un semplice luminometro, sono stati analizzati i profili cinetici dell'emissione bioluminescente (BL) in presenza di diverse concentrazioni della proteina (range 0.25 -10.0 µg/mL), ottenendo una buona correlazione lineare fino a 10 µg/mL della proteina, con un LOD e LOQ rispettivamente di 0.20 ± 0.03 e 0.50 ± 0.03 µg/mL. Una volta ottimizzato il metodo, siamo passati su un modello cellulare utilizzando la linea immortalizzata di cellule umane di adenocarcinoma del colon (Caco-2) che, a nostra conoscenza, esprimono alti livelli dell'isoforma Notch3. Nelle cellule Caco-2 (1×10^5 cellule/pozzetto) abbiamo osservato che l'aumento del segnale BL era proporzionale all'espressione di Notch (intervallo di linearità di Jag1-Fluc: 0.1 - 50 µg/mL) ottenendo un LOD e un LOQ rispettivamente di 0.8 ± 0.2 e 6.0 ± 0.2 µg/mL. Abbiamo poi verificato la selettività della sonda nei confronti dei recettori Notch, pretrattando le cellule con la proteina solubile Jag1, ottenendo un $IC_{50} = 0.55 \pm 0.06$ µg/mL. Infine, sono stati eseguiti esperimenti di imaging per esaminare le performances di Jag1-FLuc sia *in vitro* su cellule Caco-2 che *ex vivo* su biopsie umane derivate da soggetti con diversi gradi di lesioni tumorali intestinali (polipi iperplastici, adenomi a basso e alto grado e tumore conclamato) dimostrando con successo la possibile applicazione della proteina bioluminescente Jag1-FLuc per l'imaging di Notch su entrambi i modelli. Il metodo è risultato semplice da eseguire e allo stesso tempo molto sensibile; in conclusione, Jag1-FLuc potrebbe rappresentare un nuovo importante strumento per la realizzazione di un biosensore cellulare utile per migliorare la diagnosi precoce delle lesioni pre-neoplastiche e neoplastiche ed anche per valutare terapie farmacologiche più mirate per il CRC.

Referenze

[1] V.C. Luca, et al. Science 355(2017) 1320-1324. [2] B.R. Branchini, et al. International Journal of Molecular Sciences 23(2022) 2451.

Ringraziamenti

Questo lavoro è stato finanziato dal PRIN 2017 (Prot. 2017Y2PAB8) e dalla Fondazione Cassa di Risparmio di Bologna (ID 20010 -COD SME 2022.0071)

HIGH-PERFORMANCE PLASMONIC IMAGING SENSOR TO REVEAL ONCOGENIC DNA WITH A LIQUID BIOPSY APPROACH

Roberta D'Agata

*Department of Chemical Sciences, Catania University, 95125 Catania, Italy;
INBB, Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Viale Delle Medaglie D'Oro,
305, 00136, Roma, Italy
dagata.r@unict.it*

Liquid biopsy (LB), which enables the analysis of tumor-derived products released in the body fluids, has recently emerged as a non-invasive and appealing alternative to tissue biopsy [1]. Among the various circulating biomarkers [2], circulating tumor DNAs (ctDNAs) have the great potential to provide a more comprehensive molecular profile associated with the onset and progression of the tumor, especially useful for those solid tumors which cannot be repeatedly sampled as colorectal cancer (CRC). Despite huge efforts, a major obstacle to the clinical applicability of LB is represented by the need to perform complex, expensive, and time-consuming enzymatic amplification by PCR to increase the oncogenic target of the disease in its earliest stages [3]. Herein, we report an innovative plasmonic Peptide Nucleic Acid (PNA)-based platform for the detection of KRAS mutations directly in plasma samples from CRC patients [4]. Our PCR-independent assay integrates on a Surface Plasmon Resonance imaging (SPRI) sensor [5], a sandwich hybridization approach between surface-immobilized PNA probes and specifically captured KRAS DNA sequences with the enhancement of SPRI signal by properly functionalized gold nanoparticles (AuNPs) [6]. Firstly, by using genomic DNA from tissues, we showed that our assay easily differentiates the most frequent RAS CRC mutations from the wild-type. For the eleven tested RAS point mutations, the method exhibited 100% sensitivity and 83% specificity. The feasibility of the assay was then investigated by running spike-in experiments with KRAS DNA

sequences in plasma from healthy donors. Finally, the plasmonic assay was efficiently applied to detect KRAS mutations in circulating DNAs from the plasma of CRC patients. Taken together, these data demonstrate a promising avenue for cancer diagnosis based on a plasmonic PNA-based assay, aimed at improving the management of CRC patients. Moreover, we established an efficient, simple and cost-effective analysis from a blood sample which could expand the potential of personalized cancer care.

We acknowledge support from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 63393 - project ULTRAPLACAD, the EIC Pathfinder Open Horizon Europe programme under grant agreement No 101046217 - project VerSiLiB, and from Università degli Studi di Catania, STARTING GRANT 2020, project PATmiREC.

-
- [1] Heitzer E., Haque I.S., Roberts C.E.S., Speicher M.R, *Nature Reviews Genetics* **2019**, 20, 71-88.
 - [2] Bellassai N., D'Agata R., Jungbluth V., Spoto G., *Frontiers in Chemistry*, **2019**, 7, 570.
 - [3] Usha S.P., Manoharan H., Deshmukh R., Alvarez-Diduk R., Calucho, E., Sai V. V. R, Merkoçi, A., *Chemical Society Reviews*, **2021**, 50, 13012.
 - [4] D'Agata R., Bellassai N., Allegretti M., Rozzi A., Korom S., Manicardi A., Melucci E., Pescarmona E., Corradini R., Giacomini P., Spoto G., *Biosensors and Bioelectronics*, **2020**, 170, 112648.
 - [5] D'Agata R., Spoto G., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, 573-584.
 - [6] D'Agata R., Palladino P., Spoto G., *Beilstein Journal of Nanotechnology*, **2017**, 8, 1-11.

ORDINE INTERMOLECOLARE DELLA FICOCIANINA IN FILM NANOSTRUTTURATI DI LANGMUIR-BLODGETT (LB): METODI E APPLICAZIONI A BIOSENSORI

Eugenia Pechkova

*Laboratori di Biofisica e Nanotecnologie, Dipartimento di Medicina Sperimentale (DIMES), Scuola di Scienze Mediche e Farmaceutiche, Università degli Studi di Genova, Via Pastore, 3 16167 Genova
eugenia.pechkova@gmail.com*

Le proteine rappresentano elementi costitutivi versatili per la realizzazione di biomateriali funzionali basati su approcci nanotecnologici. La nanotecnologia Langmuir-Blodgett (LB) fornisce un percorso per l'organizzazione delle molecole proteiche in biomateriali funzionali con applicazioni nella scienza dei materiali e nella bioelettronica (ad esempio, biosensori, dispositivi di conversione dell'energia).

La ficocianina (PC), una proteina naturale e fluorescente, si trova comunemente nella maggior parte dei cianobatteri e nelle alghe rosse come parte del loro apparato fotosintetico, il complesso del ficobilisoma che raccoglie la luce. A causa della capacità di spegnimento della fluorescenza di PC nell'interazione con i metalli pesanti, ha potenziali applicazioni nanobiotecnologiche come biosensore selettivo e sensibile per il rilevamento di metalli pesanti (come ad esempio il pericoloso Hg^{2+}) nell'ambiente [1]. Tuttavia, tali applicazioni richiedono spesso condizioni operative specifiche e una delle più importanti è la stabilità termica.

Le tecniche emergenti seguenti: CryoEM, microscopia crioelettronica in modalità di diffrazione elettronica a microbeam presso l'Arizona State University, USA [2,3], Diffrazione di raggi X con il Nanobeam in modalità di scansione presso European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Francia) [3-5] e Laser a elettroni liberi a raggi X (XFEL) presso la Stanford University (SLAC) [6] sono stati utilizzati per studiare l'autoassemblaggio molecolare indotto dalla temperatura

in nanofilm LB multistrato [7] di PC. Il loro ordine e la loro morfologia sono stati caratterizzati mediante microbilancia a cristalli di quarzo (QCM) e microscopia a forza atomica (AFM). Viene discussa l'applicazione nanotecnologica di nanofilm LB di PC altamente ordinati come materiali nanostrutturati avanzati e sostenibili [8] per biosensori innovativi di metalli pesanti (Hg^{2+}) in sistemi acquatici, utilizzando i biomateriali a basso costo come la ficocianina.

1. Bhayani K, Mitra M, Ghosh T, Mishra S. C-phycocyanin as a potential biosensor for heavy metals like Hg^{2+} in aquatic systems. *RSC advances* 6, 111599-111605, 2016.
2. Pechkova E. Emerging advanced techniques for the protein nanofilms characterization. *NanoWorld J* 7, 33-34, 2021.
3. Pechkova E., Nicolini C., Fiordoro S., Riekkel C. Mesoscale ordering of Phycocyanin molecules in Langmuir-Blodgett multilayers. *Langmuir* 38, 86-91, 2022.
4. Pechkova E., Nicolini C., Burghammer M., Riekkel C. Emergence of amyloidic fibrillation in 2D-ordered Langmuir-Blodgett protein multilayers upon heating. *Appl. Phys. Lett.* 117, 053701, 2020.
5. Pechkova E., Burghammer M., Nicolini C., Riekkel C. New structural features appear in thermally treated Langmuir-Blodgett protein multilayers. *NanoWorld J* 6, 66-67, 2020.
6. Pechkova E., Nicolini C. Langmuir-Blodgett protein multilayer nanofilms by XFEL. *NanoWorld J* 4, 48-53, 2018.
7. Pechkova E. and Nicolini C. Langmuir-Blodgett nanotemplates for protein crystallography. *Nature Protocols* 12, 2570-2589, 2017.
8. Nicolini C., Pechkova E. Science and technology for a sustainable human development. *NanoWorld J* 4, 43-47, 2018.

SESSIONE
***“Nuove prospettive
di rigenerazione tissutale”***

DECIFRARE UN CODICE MORFOGENETICO PER UN NUOVO APPROCCIO ALLA MEDICINA RIGENERATIVA

Carlo Ventura

Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB) – Eldor Lab, Bologna

Le più recenti scoperte della Biologia e della Fisica ci fanno comprendere come ogni nostra molecola sia intrisa di vibrazioni meccaniche, elettriche ed elettromagnetiche, dove per elettromagnetismo dobbiamo anche includere la radiazione luminosa. All'interno delle nostre cellule le molecole si cercano e si incontrano non soltanto toccandosi e incastrandosi ma oscillando e sincronizzandosi tra loro. Ogni più piccola parte di noi genera informazioni a partire da quella stessa natura vibrazionale che è parte dell'Universo.

La sfida oggi è comprendere come dal livello vibrazionale, molecolare, subcellulare si passi allo stato macroscopico delle “forme” che sottintendono funzioni specifiche, fino ad arrivare all'anatomia su vasta scala di tutta gli esseri viventi, nessuno escluso, dal regno animale a quello vegetale. Potremmo concepire il genoma e il proteoma come l'hardware di quanto chiamiamo “Bios”. La matrice di controllo, l'informazione che tutto specifica, ossia il codice morfogenetico, sta nella componente fisica vibrazionale che permea ogni cosa, noi stessi inclusi.

Le nostre “percezioni” a livello biofisico cellulare vanno ben al di là di quanto il tatto, la vista e l'udito possano cogliere. Abbiamo oltre trenta trilioni di cellule nel nostro corpo, e queste si sentono, si percepiscono di continuo, in una sorta di danza che è anche vibrazione meccanica, in parte suono, ed è inscindibile dalle oscillazioni elettriche e da quelle elettromagnetiche.

Una delle frontiere più affascinanti del futuro sarà vedere la Biologia con gli occhi della Fisica e magari renderci conto che la stessa Fisica

come la conosciamo cambierà quando le sue dinamiche verranno anche viste attraverso gli occhi della Biologia.

Decifrare queste vibrazioni

è a livello meccanico ed elettromagnetico è oggi possibile, sia *in vitro* che *in vivo*. Questa strategia ci sta portando a decifrare un vero e proprio “codice morfogenetico”. Le informazioni fisiche contenute in tale codice possono già essere rilasciate su cellule e tessuti per guidarne la Biologia in modo mirato. Stiamo cominciando a *riprogrammare* le cellule staminali *in situ*, aumentandone il potere rigenerativo.

Dal connubio tra Fisica, Elettronica, una nuova Chimica e l’Intelligenza Artificiale nasceranno le basi per una *Medicina Rigenerativa* e di *Precisione* che non sia più necessariamente dipendente dal trapianto di cellule e tessuti, ma basata sul potenziamento della nostra intrinseca capacità di autoguarigione.

REGENERATIVE ENVIRONMENTS TO RECREATE CELLULAR EQUILIBRIUM

Carlo K. Cortella, PhD

CEO SOLS (Switzerland)

Regeneration in living systems is a coherent natural process. However, due to a multitude of increasing factors and effects – time, damage, harmful exposure to pollutants, oxidative stress, use, injury, and disease – we see a growing decrease in this fundamental inherent regenerative ability. This is true on the micro – molecules and cells – seen in the lab, as well as on the macro scale – organisms and environments – that we experience in the world around us.

The word “environment” is today used in many ways. Here, we explore environment for its fundamental influence and causative impact on what is contained within it. Specifically, how human process, physiology, and cellular viability are affected by the environment it inhabits. This is likely best illustrated by looking at the macro environment we as humans live in.

In our modern world, we spend more than 90% of our time indoors - home, business, car, school, and gym. These places are often more polluted than the external environment around them. Closed environments can potentially have pollutants up to five times higher than their external environment, coming from multi-variant stressor influence. Most of this toxic indoor environment is invisible to the eye but still profoundly affects human well-being and health. These destructive influences negatively affect the cell physiology of the humans, animals, and plants that reside in these environments.

When we look to create a regenerative environment, it is not enough to only remove these destructive elements. Regeneration, as a process, must not only restore a neutral baseline or static equilibrium but also revitalize the natural factors necessary for its manifestation as dynamic homeostasis. Rather than controlling a specific outcome, this balance

within a dynamic equilibrium allows for a more optimal expression of the organism or cell's innate role. This entropic view of the environment allows a new proactive orientation towards regenerative technologies and applications.

From the results of early research, the use of magma13 as an environmental application appears to create this effect. magma13 is comprised of biocatalytic elements chosen for their unique nanomaterial properties, which often are present in biological systems. These properties help to enhance the natural ambient energy and show a significant and more vital biocompatibility of the space that increases environmental well-being. The application of the technology also helps neutralize specific destructive ecological stresses and other harmful environmental radiations.

Cellular research conducted through the INBB in the laboratory of Prof. Carlo Ventura has shown robust effects on stem cell expression. The feasibility study titled *Characterization of physical/biophysical effects elicited by magma13 in human somatic cells, Mesenchymal Stem Cells (hMSCs) and induced Pluripotent Stem Cells (iPS)*, observed effects including enhanced cellular regeneration, increased cellular resistance to adverse environmental change, improved gene and protein expression, anti-inflammation effects and promotion of anti-aging factors, including a decrease in cellular senescence.

The study's conclusion states: "The current findings are the completion of the whole feasibility study. All the experiments provide compelling evidence that magma13 is able to promote a profound modulation of gene and protein expression in human neural, glial, and stem cells orchestrating essential signaling responsible for the optimization of cellular homeostasis, viability, stemness features, and favorable adaptogenic patterning. Moreover, magma13 proved to be effective in maximizing the expression of cellular armamentarium responsible for protection against detrimental endogenous, as well as exogenous stressors. magma13 elicited a consistent reprogramming in the subcellular organization of F-actin, generating whirlpool/vortices-

like patterning that have been associated with the recruitment of the cytoskeleton in the optimization of cell polarity, and the activation of cell-to-cell physical connectedness and communication. Notably, magma13 downregulated the expression of players that have been unequivocally associated with aging, inflammation and tissue degeneration, such players behaving both as essential markers or causative conductors in tissue inflammation, remodeling (scarring) and aging. As demonstrated in the study, magma13 did not exert these actions with loss to any cellular viability.” (INBB/ Prof. Ventura 2022) Additionally, interesting effects have also been observed with the applications of magma13 on water and agriculture. Water studied in LifevisionLab Switzerland has shown enhanced characteristics of the macrocrystalline mineral formations within water treated with magma13 water technology. This mineral sedimentation analysis research demonstrates a novel visualization of mineral structures and how the environment can influence the organization of liquids. In research conducted at the Vinnytsia National Agrarian University (Ukraine), preliminary results have shown a strong influence of crops grown with water treated with magma13. The effects included increased crop yields for peas and sprouts and an improved breakdown of the agriculture wastewater.

The need for Regenerative Environments as prophylactic, therapeutic, and life-enhancing applications will continue to rise over the next several decades. As technologies and applications are discovered, they will help shape environment and space to enhance and regenerate positive cellular factors and expression.

CARDIOGENESI DIRETTA: NUOVE STRATEGIE MOLECOLARI PER LA RIGENERAZIONE DEL CUORE

Gabriele D’Uva^{1,2,3}

¹ Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale (DIMES), Università di Bologna, Bologna, Italia

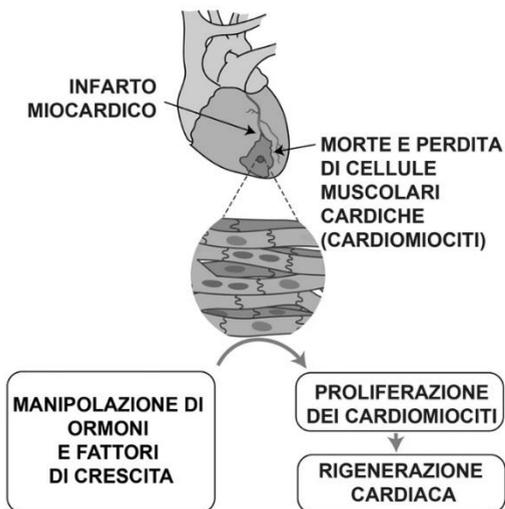
² Laboratorio Nazionale di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali, Consorzio Interuniversitario “Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi” (I.N.B.B.), Bologna, Italia

³ Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA), Università di Bologna, Bologna, Italia

Nei mammiferi, lesioni cardiache severe, come quelle indotte da infarto miocardico, possono portare alla morte di un cospicuo numero di cellule muscolari cardiache (cardiomiociti), e alla loro sostituzione con tessuto cicatriziale fibrotico.

Questa condizione, insieme all'incapacità del cuore dei mammiferi adulti di rigenerarsi, può portare a insufficienza cardiaca e morte. Lo sviluppo di strategie terapeutiche per la rigenerazione del cuore danneggiato è quindi di estrema rilevanza clinica.

Il trapianto di cuore è l'approccio più curativo, ma con gravi limitazioni, come carenza di donatori, rigetto d'organo e costi estremamente elevati. Altre terapie disponibili mirano principalmente a rallentare la progressione della malattia e a ridurre i sintomi.



Nonostante i notevoli sforzi per sviluppare tecnologie basate sulle cellule staminali per sostituire il tessuto cardiaco perduto a seguito di danni cardiaci severi e ripristinarne la funzione, finora nessuna strategia basata sul trapianto di cellule staminali adulte è stata dimostrata in grado di generare in modo efficiente nuove cellule muscolari cardiache.

Alcune specie di vertebrati inferiori, come il pesce zebra ed alcuni anfibi, hanno una capacità intrinseca nel rigenerare completamente il cuore durante tutto l'arco della loro vita. Più recentemente è stato dimostrato che anche i mammiferi durante lo sviluppo prenatale e immediatamente postnatale possiedono una notevole capacità nel rigenerare il tessuto cardiaco danneggiato. È importante sottolineare che dedifferenziamento e proliferazione di cardiomiociti endogeni preesistenti e non differenziamento di cellule staminali costituiscono il meccanismo cellulare predominante attraverso il quale i vertebrati inferiori e i mammiferi in fase neonatale rigenerano spontaneamente il cuore danneggiato. Tuttavia, il potenziale rigenerativo cardiaco dei mammiferi diminuisce drasticamente subito dopo la nascita, quando la maggior parte dei cardiomiociti subisce un'ulteriore maturazione, esce dal ciclo cellulare e continua a crescere in dimensioni. Sebbene sia stato documentato un lento tasso di rinnovamento dei cardiomiociti anche in mammiferi adulti, sia nel modello murino che nell'uomo, questo non è sufficiente per supportare un processo rigenerativo. Studi recenti hanno evidenziato che alcuni adattamenti dalla vita intrauterina a quella extrauterina, che iniziano alla nascita e continuano nell'immediato periodo neonatale, contribuiscono alla perdita della capacità rigenerativa cardiaca nei mammiferi. Queste nuove evidenze hanno aperto le porte a nuovi approcci rigenerativi volti a riattivare il potenziale rigenerativo cardiaco endogeno innescando un processo di parziale dedifferenziamento e rientro del ciclo cellulare nei cardiomiociti endogeni.

Attraverso l'analisi comparativa dei modelli rigenerativi rispetto a quelli non rigenerativi, abbiamo recentemente identificato specifici

ormoni e fattori di crescita che svolgono un ruolo importante nella plasticità rigenerativa cardiaca, la cui modulazione può rappresentare un approccio potenzialmente traslabile all'uomo per rigenerare il miocardio danneggiato.

MUSE STEM CELLS AS A NEW CELL-BASED MODEL FOR THE STUDY OF NEURAL DISEASES

Umberto Galderisi

Department of Experimental Medicine, Luigi Vanvitelli Campania University, Naples, Italy

INBB - Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi Consorzio Interuniversitario, Rome, Italy

Although adult stem cells may be useful for studying tissue-specific diseases, they cannot be used as a general model for investigating human illnesses given their limited differentiation potential. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) stem cells, a SSEA3(+) cell population isolated from mesenchymal stromal cells of bone marrow, subcutaneous fat, and skin fibroblasts, may be able to overcome that restriction.

The population of Muse cells present in fibroblast cultures obtained from biopsies of patients' skin may be differentiated into cells of interest for analyzing diseases.

We isolated Muse stem cells from patients with intellectual disability (ID) and mutations in the *IQSEC2* gene (i.e., *BRAG1* gene) and induced *in vitro* neuroglial differentiation to study cell commitment and the differentiation of neural lineages.

The *IQSEC2* gene encodes for proteins that are guanine nucleotide exchange factors for the RAS superfamily GTPase. We analyzed three patients with ID whose *IQSEC2* mutations modified the proteins' C-terminal region and produced aberrant proteins.

The neuroglial differentiation of Muse cells revealed that *IQSEC2* mutations may alter the self-renewal and lineage specification of stem cells. We observed a decrease in the percentage of SOX2(+) neural stem cells and neural progenitors (i.e., SOX2+ and NESTIN+) in cultures obtained from Muse cells with the mutated *IQSEC2* gene. The alteration in the number of stem cells and progenitors produced a bias toward astrocytes' differentiation.

Our research, in agreement with previous findings on ID, also pinpoints the importance of glia in *IQSEC2*-related neural disorders and must be further investigated.

NANOMATERIALS AND NATURAL COMPOUNDS IN SKIN REGENERATION AND REJUVENATION

Margherita Maioli

Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy mmaioli@uniss.it

Istituto Nazionale Biostrutture Biosistemi, INBB

Skin is daily stressed by UV radiation, thus undergo prematurely aging, a process associated with the progressive loss of function, affecting featured phenotypic changes. Specific nanomaterials are used to deliver natural bioactive molecules in tissue regeneration. Nanofibers could represent a novel cosmetic approach to counteract skin aging.

Myrtle (*Myrtus communis* L.) is a bush rich in bioactive molecules largely used in Mediterranean area to treat many disorders, including skin disease and able to enhance wound healing process counteracting oxidative stress.

In the present study, we applied Natural compounds and PCL nanofibers in tissue regeneration and rejuvenation using “Nano PCL-M”, a novel nanodevice able to control the delivery of bioactive molecules from myrtle extracts by the combination with polycaprolactone-nanofibers.

Skin cell populations co-cultured with Nano PCL-M in a dynamic model, were protected from UV aging: we discover that this nanodevice is able to preserve extracellular matrix features and Collagen I deposition, modulating also the molecular events related to stem cell and fibroblast senescence. Lastly, BrdU and MTT assay significantly highlights the positive effect of NanoPCL-M on proliferation and viability of both fibroblasts and skin stem cells.

Altogether, our results highlight a future translational application of NanoPCL-M to prevent skin aging.

- Bellu E, Cruciani S, Garroni G, Balzano F, Satta R, Montesu MA, Fadda A, Mulas M, Sarais G, Bandiera P, Ventura C, Kralovič M, Sabo J, Amler E, Maioli M. Natural Compounds and PCL Nanofibers: A Novel Tool to Counteract Stem Cell Senescence. *Cells*. 2021 Jun 7;10(6):1415. doi: 10.3390/cells10061415. PMID: 34200247; PMCID: PMC8227046.
- Bellu E, Garroni G, Cruciani S, Balzano F, Serra D, Satta R, Montesu MA, Fadda A, Mulas M, Sarais G, Bandiera P, Torreggiani E, Martini F, Tognon M, Ventura C, Beznoska J, Amler E, Maioli M. Smart Nanofibers with Natural Extracts Prevent Senescence Patterning in a Dynamic Cell Culture Model of Human Skin. *Cells*. 2020 Nov 24;9(12):2530. doi: 10.3390/cells9122530. PMID: 33255167; PMCID: PMC7760051.
- Bellu E, Medici S, Coradduzza D, Cruciani S, Amler E, Maioli M. Nanomaterials in Skin Regeneration and Rejuvenation. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 30;22(13):7095. doi: 10.3390/ijms22137095. PMID: 34209468; PMCID: PMC8268279.
- Krutmann J, Morita A, Chung JH. Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 2):976-84. doi: 10.1038/jid.2011.394. Epub 2011 Dec 15. PMID: 22170486.

SESSIONE
***“Progetti Europei - strategia per presentare
una proposta vincente”***

ERC STARTING AND CONSOLIDATOR GRANTS

Francesco Ricci

Laboratory of Biosensors and Nanomachines, Department of Chemistry, University of Rome Tor Vergata francesco.ricci@uniroma2.it

During this talk I will first describe the goals and objectives of my ERC consolidator grant PRO-TOOLKITS. The project's final objective is to use a multi-disciplinary, bottom-up approach to explore new research avenues aimed at the development of innovative programmable responsive nucleic acid-based modules that can be used as: i) cell-free diagnostic kits and ii) genetically encoded biosensors . After this I will give a brief overview of ERC grants and, taking the starting from my direct experience as grantee and evaluation panel member I will try to give few useful tips to future applicants.

MARIE SKŁODOWSKA-CURIE POSTDOCTORAL FELLOWSHIPS: TIPS AND TRICKS

Alessandro Bertucci

*Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental
Sustainability*

University of Parma, Italy

Questo intervento andrà ad analizzare le componenti principali di una proposta progettuale MSCA Postdoctoral Fellowship, mettendone gli aspetti più critici ai fini della valutazione e quindi proponendo suggerimenti per scrivere una proposta competitiva. Il Dr. Alessandro Bertucci è stato titolare di una MSCA Global Fellowship nel triennio 2017-2020, lavorando tra l'Università di Roma Tor Vergata in Italia e la University of California San Diego negli Stati Uniti. Il progetto finanziato – “MIRNANO” – ha portato allo sviluppo di tecnologie basate su nanoparticelle di silicio poroso e dispositivi molecolari a base di DNA sintetico per applicazioni in nanomedicina.

STAFF EXCHANGE - MARIE SKŁODOWSKA-CURIE ACTIONS: AN EXAMPLE OF WINNING PROPOSAL

Alessandro Porchetta

Department of Science and Chemical Technologies, University of Rome Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 1, 00133 Rome

The Staff Exchange action funds short-term international and inter-sectoral exchanges of staff members involved in research and innovation activities of participating organisations. To this end, we have set-up a joint multidisciplinary scientific collaborative program that through exchange, international mobility, and strongly collaborative transfer of knowledge and training activities between 4 European and 3 extra-European countries, has allowed to bring together leading experts under the field of “nanomaterials in biomedicine”. The funded project, named “Nano-OligoMed”, has the ambition to establish and support a network of international collaboration, enabling a collaborative scientific team to effectively use a diversity of approaches and strategies to generate and test hybrid nanomaterials for the efficient and safe systemic delivery of oligonucleotide-based therapeutic agents. The scientific aim of Nano-OligoMed is the creation of degradable hybrid structures that combine the rigid, inert silica with the delicate programmable oligonucleotides or artificial oligonucleotide-mimics. The international academic networking, the broadening of the research skills, the educational activities, provides to young (PhD students) and senior scientists, specific competences in the field of materials sciences, nanotechnology, molecular biology and molecular medicine.

EIC PROGRAMME: PATHFINDER PROJECTS

Giuseppe Spoto

a) Department of Chemical Sciences, Catania University, 95125 Catania, Italy;

b) INBB, Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Viale Delle Medaglie D'Oro, 305, 00136, Roma, Italy giuseppe.spoto@unict.it

Il nuovo programma quadro per il supporto della ricerca da parte della Commissione Europea include le azioni dell'European Innovation Council (EIC) tra quelle che intendono sostenere "Excellent Science". Tali azioni sono racchiuse all'interno del Pillar 1 del complesso schema del programma Horizon Europe. Le azioni dell'EIC intendono supportare innovazioni potenzialmente in grado di rivoluzionare il settore d'interesse e con significative prospettive di mercato. Lo scopo è quindi quello di individuare tecnologie fortemente innovative che possiedano caratteristiche tali da essere in grado di delineare nuove prospettive ed opportunità pur implicando il potenziale rischio che tale evoluzione non si concretizzi. La fondamentale differenza tra il piano di supporto dell'EIC e le azioni messe in atto nel precedente programma quadro (Horizon 2020) consiste nella identificazione di un percorso che parte dalla tecnologia ad un bassissimo livello di maturazione (TRL), attraversa una fase di maturazione avanzata con la validazione della tecnologia e si conclude con la predisposizione per il mercato e lo scale-up. Le azioni dell'EIC attraverso cui tale fasi vengono supportate sono denominate rispettivamente EIC Pathfinder, EIC Transition e EIC Accelerator. La presentazione rivolgerà particolare attenzione all'azione EIC Pathfinder, la prima dell'intero processo. Verranno delineate le caratteristiche attese per le proposte di progetto prestando attenzione ad aspetti che potrebbero essere critici nella predisposizione della proposta.

***SESSIONE
POSTER
GIOVANI RICERCATORI***

DUAL-FUNCTIONAL POLYMER ON PLASMONIC BIOSENSOR WITH ANTIFOULING PROPERTY FOR DETECTION OF CIRCULATING TUMOR DNA IN HUMAN PLASMA

Noemi Bellassai¹, Roberta D'Agata^{1,2}, Almudena Marti³, Andrea Rozzi⁴, Stefano Volpi⁴, Matteo Allegretti⁵, Roberto Corradini^{2,4}, Patrizio Giacomini⁵, Jurriaan Huskens³, Giuseppe Spoto^{1,2}

¹*Department of Chemical Sciences, University of Catania, Viale Andrea Doria 6, 95122, Catania, Italy.*

²*INBB, Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Viale delle Medaglie d'Oro, 305, 00136 Roma, Italy.*

³*Department of Molecules & Materials, MESA+ Institute for Nanotechnology, Faculty of Science & Technology, University of Twente, P.O. Box 217, 7500 AE Enschede, The Netherlands.*

⁴*Department of Chemistry, Life Sciences and Environmental Sustainability, University of Parma, Parco Area Delle Scienze, 17/A, 43124, Parma, Italy.*

⁵*Oncogenomics and Epigenetics, IRCCS Regina Elena National Cancer Institute, Via Elio Chianesi, 53, 00144 Rome, Italy.*

Circulating tumor DNA (ctDNA) represents an emerging blood-based biomarker in liquid biopsy for early cancer diagnosis, monitoring, and determining prognosis [1]. Nowadays, standard protocols for ctDNA analysis include complex sample handling and time-consuming pre-analytical procedures (e.g. sequence isolation and amplification), risks for sample contamination, and assay costs which represent critical issues in pre-analytical steps [2]. Lately, a nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance imaging-based assay to simplify the direct detection of tumor DNA in the patient's plasma has been developed [3]. To further streamline the workflow analysis, we herein propose a new dual-functional low-fouling poly-L-lysine (PLL)-based polymer with nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensing for the detection of circulating tumor DNA point mutations related to colorectal cancer in human plasma [4]. The PLL-based polymer contains densely immobilized anionic oligopeptide side-chains to

create a charge-balanced system repelling the non-specific adsorption of undesired biomolecules onto the sensor surface. The layer also includes sparsely attached peptide nucleic acid probes, complementary to DNA target sequences, capturing the analyte directly in human plasma. First, we thoroughly explored the role of each component of the dual-functional polymer to the antifouling capability. Then, the low-fouling activity of the new surface layer assured us to detect KRAS p.G12D mutated DNA in human plasma at the attomolar level (~ 2.5 aM), and KRAS p.G13D mutated DNA in a liquid biopsy from a colorectal cancer patient. The work here described offers a rapid, simple, and label-free ultrasensitive detection of tumor-derived materials circulating in biological fluids with minimal pre-analytical sample treatments and without blocking additives after the plasma adsorption, making a significant improvement for early clinical diagnosis and personalized medicine in liquid biopsy.

- [1] D.W. Cescon, S. Bratman, S.M. Chan, L. L. Siu, *Nat. Cancer*. **2020**, *1*, 276–290.
- [2] T. Gerber, S. Taschner-Mandl, L. Saloberger-Sindhöringer N. Popitsch, E. Heitzer, V. Witt, R. Geyeregger, C. Hutter, R. Schwentner, I. M. Ambros, P. F. Ambros, *J. Mol. Diagn.* **2020**, *22*, 8, 1070–1086.
- [3] R. D’Agata, N. Bellassai, M. Allegretti, A. Rozzi, S. Korom, A. Manicardi, E. Melucci, E. Pescarmona, R. Corradini, P. Giacomini, G. Spoto, *Biosens. Bioelectron.* **2020**, *170*, 112648.
- [4] N. Bellassai, R. D’Agata, A. Marti, A. Rozzi, S. Volpi, M. Allegretti, R. Corradini, P. Giacomini, J. Huskens, G. Spoto, *ACS Sens.* **2021**, *6*, 6, 2307–2319.

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI FATTORI DI CRESCITA PER STIMOLARE LA PROLIFERAZIONE DEI CARDIOMIOCITI

Chiara Bongiovanni^{1,2,3}, H. Bueno-Levy⁴, D. Posadas Pena⁵, S. Redaelli⁵, M. Bergen⁶, S. Da Pra^{1,2,3}, I. Del Bono^{1,2,3}, C. Miano^{1,2,3}, F. Sacchi^{1,2,3}, F. Pontis⁷, M. Mazzeschi^{1,2}, I. Petrarroia⁷, R. Tassinari⁸, M. Lauriola^{1,2}, C. Ventura^{1,3}, S. Heermann⁶, G. Weidinger⁵, E. Tzahor⁴ and G. D'Uva^{1,2,3}

¹Dipartimento di Medicina Specialistica, Diagnostica e Sperimentale, Università di Bologna; ²Centro di Ricerca Biomedica Applicata (CRBA), Università di Bologna; ³Laboratorio Nazionale di Biologia Molecolare e Ingegneria delle Cellule Staminali, Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), Bologna; ⁴Dipartimento di Biologia Cellulare Molecolare, Weizmann Institute of Science; ⁵Istituto di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ulm; ⁶Istituto di Anatomia e Biologia Cellulare, Università di Friburgo; ⁷Polo Scientifico e Tecnologico, IRCCS MultiMedica, Milano; ⁸Eldor Lab c/o CNR, Bologna

Lesioni severe del miocardio comportano una consistente perdita di cellule muscolari cardiache, i cardiomiociti, sostituiti da tessuto fibrotico cicatriziale. Tale condizione, principalmente riconducibile all'incapacità dei mammiferi adulti di innescare dei processi di rigenerazione cardiaca, compromette la funzionalità del cuore, degenerando nei casi più severi in insufficienza cardiaca. È dunque di rilevante impatto clinico lo sviluppo di strategie volte a rigenerare il tessuto cardiaco leso. Studi all'avanguardia hanno evidenziato che le cellule muscolari cardiache di alcuni pesci e perfino dei mammiferi in fase neonatale possiedono un'abilità proliferativa intrinseca, che tuttavia nei mammiferi viene persa poco dopo la nascita. Questo progetto ipotizza che la diminuzione di espressione di fattori di crescita contribuisca alla perdita della capacità rigenerativa cardiaca che nei mammiferi si osserva durante lo sviluppo postnatale, e al contempo si propone di identificare nuovi fattori di crescita in grado

di riattivare il ciclo cellulare dei cardiomiociti, promuovendone la proliferazione e la rigenerazione. Nello specifico, mediante analisi bioinformatiche condotte sul modello murino, abbiamo identificato specifici fattori di crescita la cui espressione si riduce nel primo periodo postnatale, corrispondente al termine del potenziale rigenerativo dei cardiomiociti. Abbiamo dunque analizzato l'abilità di questi fattori nel promuovere la sintesi del DNA, il rientro nel ciclo cellulare e la divisione di cardiomiociti neonatali *in vitro*. Tale approccio ha mostrato che l'espressione di alcuni fattori già noti in letteratura per la loro abilità pro-rigenerativa, si riduce consistentemente nell'immediato periodo postnatale, supportando l'ipotesi iniziale del progetto. Inoltre, il nostro studio ha portato all'identificazione di nuovi potenziali fattori pro-rigenerativi. Nello specifico, un fattore appartenente alla famiglia delle proteine morfogenetiche dell'osso (BMP) ha mostrato una notevole capacità nel promuovere la divisione dei cardiomiociti. Dal punto di vista meccanicistico, tramite ulteriori analisi abbiamo identificato i recettori di tipo I e di tipo II e le vie di trasduzione a valle, canoniche e non canoniche, attraverso cui il fattore BMP esercita il suo ruolo pro-proliferativo. Inoltre, analisi sul modello di zebrafish hanno evidenziato un coinvolgimento del fattore BMP nel processo spontaneo di rigenerazione cardiaca del pesce zebra. Infine, la somministrazione di BMP nel modello murino si è rivelata capace di incrementare la proliferazione di cardiomiociti post-mitotici *in vitro* e di riattivare il ciclo cellulare di cardiomiociti adulti *in vivo* a seguito di infarto del miocardio. Pertanto, il nostro studio suggerisce che la somministrazione di questo fattore di crescita possa rappresentare una nuova strategia per stimolare la rigenerazione del cuore a seguito di danni.

PROGRAMMABLE CELL-FREE TRANSCRIPTIONAL SWITCHES FOR ANTIBODIES DETECTION

S. Bracaglia,¹ A. Patino Diaz,¹ S. Ranallo,¹ T. Patino,¹ A. Porchetta,¹ F. Ricci¹

¹Department of Chemistry, University of Rome, Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133 Rome, Italy

Antibody detection is important in several clinical settings because it informs on current and past infection and can provide information on clinical outcomes. Synthetic biology devices would bring new capabilities to diagnostics methods by creating sensors with new functions, expanding the range of targets, and improving sensitivity and specificity. In recent years, cell-free biosensors for the detection of small molecules, nucleic acid, and proteins¹⁻² have been developed with excellent sensitivities and specificities. Despite the above advances, the examples reported so far have been limited for the detection of only few targets. We demonstrate here a cell-free diagnostic platform for the detection of specific antibodies directly in blood serum.³ The approach is based on the use of programmable antigen-conjugated DNA-based conformational switches that, upon binding to a target antibody, can trigger the cell-free transcription of a light-up fluorescence-activating RNA aptamer (Fig. 1). The system we proposed couples the advantageous features of responsive DNA-based conformational switching probes (i.e. programmability and specificity) with those of cell-free diagnostic methods (i.e. sensitivity). Moreover, our approach is versatile and can be adapted to low-cost, portable instrumentation for point-of-care detection of multiple biomarkers.

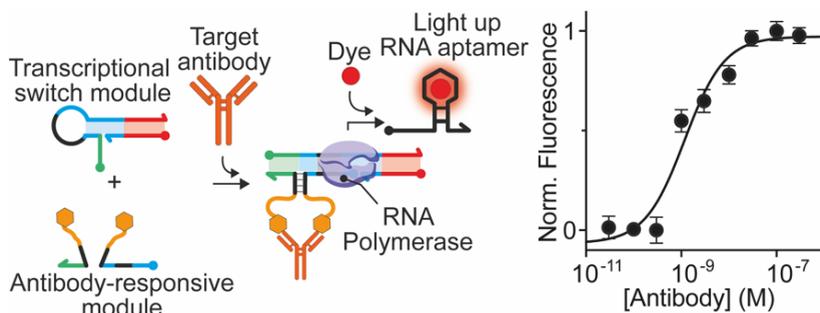


Figure 1. Programmable antibody-responsive cell-free transcriptional switch.

- [1] K. Pardee, A.A. Green, T. Ferrante, D.E. Cameron, A.D. Keyser, P. Yin, J.J. Collins, **Cell**. (2014) 159, 940–954.
- [2] K. Pardee, A.A. Green, M.K. Takahashi, D. Braff, G. Lambert, J.W. Lee, T. Ferrante, D. Ma, N. Donghia, M. Fan, N.M. Daringer, I. Bosch, D.M. Dudley, D.H. O'Connor, L. Gehrke, J.J. Collins, **Cell**. (2016) 165,1255–1266.
- [3] S. Bracaglia, A. Patino Diaz, S. Ranallo, T. Patino, A. Porchetta, F. Ricci, **J. Am. Chem. Soc.** (2022) 144, 13, 5820–5826.

OTTIMIZZAZIONE DI UN APPROCCIO INNOVATIVO BASATO SULLA DIGITAL DROPLET PCR (DDPCR) PER LO STUDIO DI COSEGREGAZIONE DI MUTAZIONI PATOGENETICHE COI GENI *SMN1* E *SMN2*

Michela Bulfoni*

** Dipartimento di Area Medica (DAME), Università degli Studi di Udine. Udine, Italia*

Razionale: quasi il 4% dei pazienti affetti da atrofia muscolare spinale (SMA) è portatore di una delezione in una copia del gene Survival Motor Neuron 1 (*SMN1*) e di una mutazione puntiforme deleteria sull'altra copia del gene. La corretta assegnazione delle mutazioni puntiformi al gene causativo della malattia non è una procedura rapida, a causa dell'esistenza del gene gemello Survival Motor Neuron 2 (*SMN2*), non coinvolto nell'insorgenza della patologia. Per molti anni, il sequenziamento, il clonaggio genico e lo screening delle colonie batteriche di espressione separata di *SMN1/2*, sono state le procedure standard per stabilire la localizzazione inequivocabile di una mutazione puntiforme su *SMN1* o *SMN2*, consentendo una diagnosi corretta dei soggetti sintomatici e la definizione dei portatori di mutazione a rischio riproduttivo per SMA. La ddPCR è una nuova tecnologia in grado di quantificare in modo assoluto il numero di acidi nucleici target utilizzando la statistica binomiale di Poisson. Per la sua elevata sensibilità, la ddPCR viene spesso impiegata nella caratterizzazione di molteplici condizioni patologiche, fornendo risultati accurati in tempi molto brevi.

Obiettivo: Lo scopo di questo lavoro è ottimizzare e validare una nuova strategia, basata sulla tecnologia ddPCR, per lo studio di cosegregazione di una mutazione puntiforme deleteria dell'esone 3 coi geni *SMN1/2*, ritenuta responsabile dell'insorgenza e della gravità del fenotipo patologico.

Pazienti e Metodi: In questo studio, sono stati arruolati un paziente affetto da SMA di tipo 3A e un portatore sano di mutazione puntiforme nell'esone 3 del gene *SMN1* e un soggetto di controllo sano. L'RNA è stato estratto dai linfociti dei pazienti e poi retrotrascritto in cDNA. Sono stati allestiti due saggi ddPCR indipendenti: uno per l'esone 7 dei geni *SMN*, capace di discriminare tra *SMN1* e *SMN2* e un secondo saggio per la caratterizzazione dell'esone 3, in cui si trova la mutazione deleteria. L'analisi dei dati ddPCR è stata condotta con il software QuantaSoft.

Risultati: Abbiamo ottimizzato un nuovo metodo basato sulla ddPCR capace di semplificare le procedure sperimentali e ridurre i tempi di risposta per la diagnosi di SMA e/o di portatore sano di mutazione puntiforme. Lo studio di cosegregazione ha mostrato che sia nel portatore sano che nel paziente SMA la mutazione deleteria dell'esone 3 è presente in *SMN1*. La ddPCR ha consentito, inoltre, di quantificare in maniera assoluta i trascritti *SMN*. Come previsto, il soggetto sano e il portatore hanno mostrato una maggiore quantità di mRNA di *SMN1* (90% e 77%, rispettivamente), rispetto a *SMN2*. Al contrario, il paziente SMA presenta bassi livelli di trascritto di *SMN1* (6,3% del totale) e tutto mutato. Questi risultati dimostrano come la mutazione puntiforme dell'esone3 possa avere un effetto deleterio sull'efficienza della trascrizione di *SMN1* e/o sulla stabilità dell'RNA messaggero. Non si può escludere che questo effetto sulla trascrizione possa estendersi anche ad altre mutazioni puntiformi di *SMN* o di qualsiasi altro gene, suggerendo la necessità di verificare sempre eventuali effetti sui livelli di mRNA prodotti da qualsiasi variante genica.

Conclusioni: Il metodo ddPCR che abbiamo sviluppato ha il potenziale per diventare uno strumento diagnostico per rilevare la segregazione mono o bi-allelica di mutazioni puntiformi deleterie nelle malattie ereditarie recessive, senza la necessità di analizzare i genitori o altri parenti del paziente spesso non presenti o non disponibili al test.

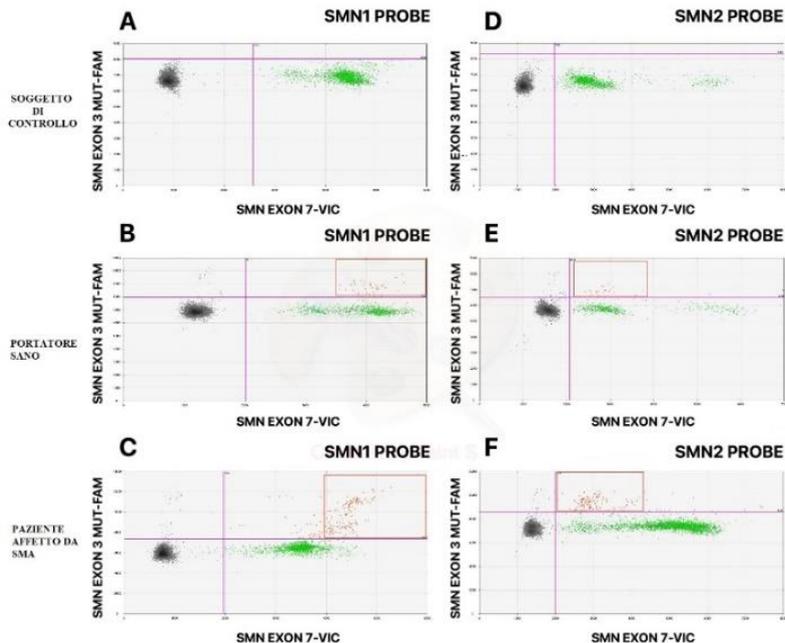


Figura: grafici 2-D ottenuti dall'analisi ddPCR rappresentativi del pattern di cosegregazione. Pannelli A e D: soggetto sano, nessuna cosegregazione; pannelli B ed E: portatore sano, piccola quota di cosegregazione della mutazione dell'esone 3 con *SMN1*; pannelli C e F: paziente SMA, cosegregazione quasi totale della mutazione dell'esone 3 con *SMN1*. I grafici di sinistra sono ottenuti con la sonda specifica per *SMN1*, quelli di destra con la sonda specifica per *SMN2*.

SOGGETTO	NUMERO DI COPIE <i>SMN1/2</i>	Copie totali di <i>SMN1</i> mRNA	Copie totali di <i>SMN</i> mRNA	$\frac{\% \text{ SMN1 total mRNA}}{\text{SMN total mRNA}}$
SOGGETTO DI CONTROLLO	2:1	919	1022	90%

PORTATORE SANO	2:1	1175	1529	77%
PAZIENTE AFFETTO	1:3	190	4382	6,3%

Tabella: Conta assoluta dei trascritti mutati sull'esone 3 di *SMNI* (colonna 2), del numero totale di trascritti di *SMN* esone 7 (colonna 3) e della percentuale di trascritti di *SMNI* mutati sul totale dei trascritti *SMN* (colonna 4) identificati per ciascun soggetto incluso nello studio.

BIOPOLYMER NANOPARTICLES FOR THE DEVELOPMENT OF A DRUG-DELIVERY SYSTEM IN THE TREATMENT OF LYSOSOMAL STORAGE DISEASE

Eleonora Calzoni^{1, *}, Alessio Cesaretti^{1,2}, Nicolò Montegiove¹, Alessandro Di Michele³, Roberto Maria Pellegrino¹, Carla Emiliani^{1,2}

¹ *Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, University of Perugia, Via del Giochetto, 06123 Perugia, Italy*

² *Centro di Eccellenza sui Materiali Innovativi Nanostrutturati (CEMIN) University of Perugia, via Elce di Sotto 8, 06123, Perugia, Italy*

³ *Department of Physics and Geology, University of Perugia, Via Pascoli, 06123 Perugia, Italy*

* *eleonora.calzoni@unipg.it*

Lysosomal storage disorders (LSDs) are a set of metabolic diseases caused by mutations in genes that are in charge of the production of lysosomal enzymes, resulting in the buildup of non-degraded substrates and the consequent systemic damage that mainly involves the Central Nervous System (CNS). One of the most widely used and studied treatments is Enzyme Replacement Therapy, which is based on the administration of the recombinant deficient enzyme. This strategy has often proved fallacious due to the enzyme instability in body fluids and its inability to reach adequate levels in the CNS. In this work, we developed a system based on nanotechnology that allows a stable enzyme to be obtained by its covalent immobilization on biopolymer nanoparticles (NPs) of polylactic acid, subsequently administered to a cellular model of LSDs, i.e., Sandhoff disease, caused by the absence or deficiency of the β -D-N-acetylhexosaminidase A (HexA) enzyme. The HexA enzymes, loaded onto the polymeric NPs through an immobilization procedure that has already been investigated and validated, were found to be stable over time, maintain optimal kinetic parameters, be able to permeate the plasma membrane, hydrolyze HexA's natural substrate, and restore enzyme activity close to the levels of healthy cells. These results thus

lay the foundation for testing the HexA-NPs in animal models of the disease and thus obtaining an efficient drug-delivery system.

MICROPLASTIC TOXICITY IN CUTTLEFISH AND SEA TURTLE EMBRYOS: NEW CANDIDATE SENTINEL SPECIES TO ASSESS ENVIRONMENTAL IMPACTS

Chemello Giulia¹, Trotta Erica¹, Faraoni Viola¹, Notarstefano Valentina¹, Ludovica Di Renzo², Marco Matiddi³, Cecilia Silvestri³, Papetti Luana⁴, Carnevali Oliana¹, Gioacchini Giorgia¹

¹Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo, Italy; ³ Italian National Institute for Environmental Protection and Research (ISPRA), Roma, Italy; ⁴CRTM, "TartaMare", Marina di Grosseto, Italy.

Biomonitoring studies reveal that microplastics (MPs) are accidentally ingested by several species of crustaceans, mollusks, amphipods, fish, marine mammals and reptiles and sea birds. However, only MPs show peculiar properties and dimensions that may facilitate their transfer through the hematic circulation to different target organs. Unfortunately, MPs adverse effects have been investigated mainly in model organisms while their fate and effects at the physiological level, once ingested, have been only hypothesized on wild "no-model" species. The current study assessed, for the first time, the presence of MPs in the embryonic stage of two key species inhabiting the Mediterranean Sea, whose ingestion of plastics debris has been already documented in adult specimens: the common cuttlefish *Sepia officinalis* from the central part of the Adriatic Sea and the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* from the Tyrrhenian Sea.

Based on the hypothesis of MPs' vertical transmission from adult females to the offspring through the yolk transfer during oocyte maturation, the MPs investigation was performed on liver samples and yolk collected from *Caretta caretta* unhatched embryos and in yolk and whole embryo pools of *Sepia officinalis*. MPs analysis was associated with the evaluation of embryos' developmental and health status through biometric, histological and macromolecular analyses. All the MPs detected were between 1-5 μm in diameter, and the

majority were MPs fragments (86% and 74 % in *Caretta caretta* and *Sepia officinalis* respectively) of polystyrene (32%), polyvinyl chloride (21%) and acrylonitrile butadiene styrene (16%) in *Caretta caretta* samples and polyvinyl chloride (52%), cellulose acetate (15%) and polypropylene (15%) in *Sepia officinalis*. MPs were detected in all turtle embryos investigated and the same MPs polymer was present in both the yolk and liver of the same embryo in 20% of samples. Worthy of note, the presence of MPs in liver samples was positively correlated with the embryo's weight and the number of melanomacrophages observed in all embryos analyzed. In addition, the presence of MPs in the yolk negatively correlated with the yolk weight. Concerning cuttlefish embryos and yolk pools, the highest number of MPs was observed in all yolk pools as well. Although the histological analysis did not highlight evident abnormal structural or morphological features among embryos the highest number of MPs was detected in embryos and yolk of the batch characterized by the lowest mantle length and embryo weight values. The results observed showed the possible relationship between MPs and both the health and growth of *Caretta caretta* and *Sepia officinalis* embryos respectively while supporting the hypothesis of MPs vertical transmission and highlighting the need to deepen this aspect. These species were chosen for their ecological relevance in the Mediterranean ecosystems and the particular lifecycle that could be easily affected by MPs pollution. In light of these results, the embryonic stage of these two species could be proposed as suitable sentinels for marine pollution.

GLYPHOSATE: EFFECTS ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF *PODARCIS SICULUS*

Chianese, T.*, Rosati, L., Verderame M., Motta, C.M., Raggio, A., Scudiero R.

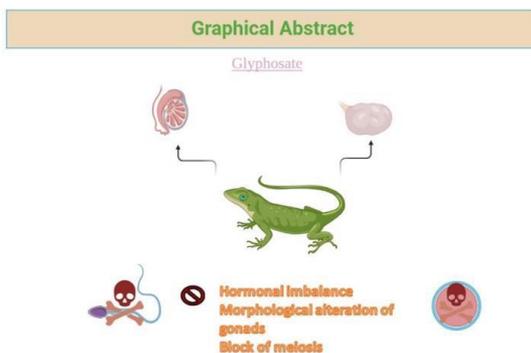
**Lead presenter;*

*Department of Biology, University Federico II, Napoli, Italy;
teresa.chianese2@unina.it*

Keywords: ovogenesis; spermatogenesis; reproductive toxicity; reptiles; ovary; testis.

Glyphosate (GLY) is a widely used non-selective herbicide in agricultural practice, generally applied in formulations containing adjuvants/surfactants that is absorbed by the stem and leaves. Studies have shown the ability of GLY to accumulate in plant tissues and traces have been revealed in human urine of people who use agricultural products extensively. In this study, the field lizard *Podarcis siculus* was treated with pure GLY at two different doses (0.05 and 0.5 ng/g body weight every other day for 3 weeks) by oral administration to assess GLY toxicity on the reproductive functions of this animal, which lives in cultivated areas and is therefore potentially exposed. We used pure GLY to attribute our results to the active ingredient. Morphological and molecular analysis demonstrated a dose dependent GLY toxicity. In fact, histological analysis showed considerable damage to the seminiferous tubules: large empty spaces and cells aggregated in the form of rosettes in the tubule's wall, few spermatozoa in the lumen. Parallely, molecular analyses demonstrated that GLY affects the gap junctions of Sertoli cells and modifies the expression and localisation of oestrogen receptors. The ovary also showed significant GLY-induced damage. The theca had thickened connective tissue and a reduction of the cellular component; the follicular epithelium was irregular in thickness and many apoptotic cells were present. The zona pellucida was irregular, with an altered content of glycan residues. Changes in the content and distribution of

glycans were also found in cells surrounding oocytes. Finally, oocytes' cytoplasm was denser and rich in filamentous aggregates. In conclusion, we can state that the effects of GLY must be considered biologically relevant and could endanger the reproductive capacity of lizards and possibly other vertebrates, including human. This study needs more time to uncover the molecular pathways underlying the effects of GLY and to assess synergistic effects with other pollutants found in the environment.



APTAMER-DRIVEN TOXIN GENE DELIVERY IN U87 MODEL GLIOBLASTOMA CELLS

Martina Colasante

Università degli Studi dell'Aquila, Dipartimento Mesva

Glioblastoma multiforme is an incurable disease, whose treatment is currently limited to surgery and chemotherapy. The intrinsic heterogeneity of glioblastoma cells defines an urgent need to find new targets available for an efficient drug-targeting approach. A novel suicide gene therapy approach was tested in U87 MG glioblastoma multiforme cells. We describe the non-viral delivery of the saporin gene to glioblastoma cells which is mediated by an aptamer, targeting glycosylated nucleolin. Nucleolin can be considered as a good candidate for treatment of gliomas: it is normally found in the cell nucleolus as a histone chaperone, but it is exposed at the cell surface in gliomas. Nucleolin expression at the cell surface increases with the GBM malignancy grade. In recent years, aptamers against nucleolin have been developed to potentially drive drug delivery to cancer cells. Aptamers are small nucleic acid molecules that can specifically bind to a molecular target. AS1411 is a 26-mer G-rich DNA aptamer developed against overexpressed membrane glycosylated nucleolin, and used as a targeting agent to deliver small molecules into cancer cells. The aptamer AS1411 DNA sequence was embedded in a plasmid to deliver the gene of the plant toxin saporin into glioblastoma cells. Saporin is a plant ribosome-inactivating protein (RIP) used for the construction of immunotoxins; it is a potent protein synthesis inhibitor.

AS1411 was integrated into a vector at the 5' of a mammalian codon-optimized saporin gene, under CMV promoter. In particular, we constructed an expression cassette embedded in a standard vector, pBlueScript II KS (+), including AS1411 at the 5' and wild type (SAP) sequence or catalytically inactive mutant (SAPKQ) saporin gene at the

3', generating respectively APTSAP and APTSAPKQ (image 1). The cytotoxic effects of DNA constructs were tested on glioblastoma U87 cell lines; cells that do not expose nucleolin at the cell surface such as 3T3 cells were used as a control. After nucleolin-binding, the saporin gene can be delivered inside the cell, for transient expression and saporin exerts its RIP biological activity. The results indicate a toxic action of APTSAP in a low concentration range: APTSAP shows an IC_{50} of $1.30 \times 10^{-8}M$, about two orders of magnitude lower than that of ssAPT alone (IC_{50} $4.30 \times 10^{-6} M$). 3T3 cells negative for nucleolin at the cell surface remain unaffected. Suicide gene-induced cell killing was not observed when the inactive saporin mutant SAPKQ DNA was used, indicating that saporin catalytic activity mediates the cytotoxic effect. The transcription of the saporin gene confirmed the intracellular delivery of APTSAP, as shown by the presence of specific saporin fragments obtained after RT-PCR experiment carried out on U87 cells after exposure to 20 nM APTSAP for 96 h. Cells were observed to undergo cell death by autophagic or methuosis-like mechanisms rather than apoptosis. Overall, our data suggest that plasmids like APTSAP incorporating a double stranded aptamer DNA could be a promising delivery system to vehiculate toxic genes into target cancer cells, even much more efficiently when complexed to polycationic carriers, such as PEI. These main findings support the proof-of-concept of using PEI-polyplexed APTSAP for local delivery in rat glioblastoma models.

Image 1



UHPLC-QqQ-MS/MS FOR METABOLOMICS ANALYSIS OF FAECAL BILE ACIDS AND THEIR MAIN METABOLITES IN COLON DISEASE PATIENTS

R. Comito ¹, E. Porru², N. Interino ¹, A. Punzo ¹, P. Simoni ^{2,3}, J. Fiori ¹ and A. Roda ^{1,4}

*1*Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Alma Mater StudiorumUniversità di Bologna, Via Selmi, 2- 40126 Bologna

*2*Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche (DIMEC), Alma Mater Studiorum- Università di Bologna, Via Massarenti, 9-40138 Bologna

*3*IRCCS, Azienda Ospedaliero Universitaria di Bologna, Via Massarenti, 9- 40138 Bologna

*4*INBB, Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Viale delle Medaglie d’Oro, 305-00136 Roma

Bile acids (BAs) are involved in several biological processes in the gut-liver axis including hepatotoxicity, intestinal inflammatory processes and cholesterol homeostasis mostly via modulation of farnesoid X receptor (FXR) signalling. Faecal Oxo-BA, stable intermediates of oxidation/epimerization reactions of the BA hydroxyls, could be relevant to investigate the crosstalk in liver-gut axis and the relationship between diseases and alterations in microbiota composition. With this aim, we developed and validated a new generation comprehensive and fast reversed phase ultra-performance liquid chromatography – triple quadrupole tandem mass spectrometry (RP-UHPLCQqQ-MS/MS) method for the identification and analysis of up to 28 compounds including 21 Oxo-BAs and their metabolic precursors in human faeces. The method was validated by evaluating selectivity, linearity range, limit of quantification and detection, accuracy, precision, matrix effect and recovery. We compared the analytical performance of the new method with a previously developed method by UHPLC-QTOF-MS/MS [1], obtaining limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) 5-fold lower. RPUHPLC-QqQ-MS/MS method was then applied to the

analysis of BA and their metabolites in faecal samples of control subjects and subjects presenting different colon diseases. Chemometrics tools, such as Principal component analysis (PCA), were used to data investigation, identifying variables able to discriminate between the different classes (i.e Oxo-LCA). We performed a linear discriminant analysis (LDA) to create a model able to discriminate the classes examined.

[1] E. Porru, D. Scichitano, N. Interino, T. Tavella, M. Candela, A. Roda, J. Fiori, *Scientific Reports*, (2022) 12:2866

This work was supported by the PRIN 2017 (Prot. 2017Y2PAB8).

A WINDOW TO THE BRAIN: THE RETINA TO MONITOR THE PROGRESSION AND EFFICACY OF SAFFRON REPRON® TREATMENT IN AN ALZHEIMER'S-LIKE MODEL OF NEURODEGENERATION

Francesca Corsi¹, I. Piano¹, C. Cerri¹, M. Di Paolo², S. Bisti^{2,3}, C. Gargini^{1,2,4}

¹ *Department of Pharmacy, University of Pisa, Via Bonanno 6, 56126 Pisa, Italy*

² *Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), via Medaglie d'Oro 305, 00136 Roma, Italy*

³ *Center for Synaptic Neuroscience and Technology, Istituto Italiano di Tecnologia (IIT), 16132 Genova, Italy*

⁴ *Interdepartmental Research Center "Nutraceuticals and Food for Health", University of Pisa, Italy*

A mechanism shared by most neurodegenerative diseases, such as Alzheimer disease (AD), is chronic neuroinflammation. One of the most accessible and sensitive parts of the central nervous system is the retina; it has been shown a link between cognitive impairment and retinal function under neuroinflammatory conditions, confirming the essential role of the retina as a window to the brain. Here we demonstrate in a mouse model of LPS-induced neurodegenerative disease, the impairment of cognitive function AD-like, results in simultaneous and chronic deterioration of visual function. Then, we show, by evaluating retinal function, the protective efficacy of chronic saffron Repron® treatment. The results obtained by the Novel Object Recognition (NOR) behavioral test, showed a tendency of the Repron saffron-treated animals, compared with the control group, to improve the parameters analyzed (Recognition Index and Discrimination Index). Also, the functional data obtained by electroretinogram (ERG) recordings showed a recovery of visual function, confirmed by gene related inflammation expression; where saffron Repron® treatment is almost completely opposite to that obtained for animals treated with LPS alone. The same result was also obtained in the case of the

evaluation of protein levels that follow the course of gene regulation. These results were valid for retinal tissue and partially at the cortical level but were not reproducible at the level of the hippocampus, where it seems that the onset of damage was delayed. This trend allows us to conclude that the retina represents the portion of the central nervous system most sensitive to LPS-induced neuroinflammatory damage and could be used as an early "sensor" in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's.

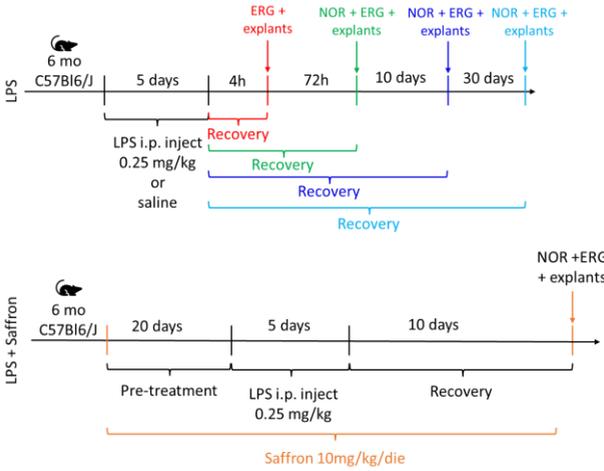


Figure 1. C57B16/J treatment protocol with LPS or with LPS+saffron Repron®

Funded by BIO AURUM SRL; Patent n. US 10,561,697 B2 - Hortus Novus SRL, L'Aquila (AQ) IT

CHEMICAL AND PHYSICAL STIMULI TO COUNTERACT HEMATOPOIETIC STEM CELL SENESCENCE

Sara Cruciani

Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Viale San Pietro 43/B, 07100, Sassari, Italy

Istituto Nazionale Biostrutture Biosistemi, INBB

Human hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) are pluripotent cells able to undergo differentiation into several elements of the hematopoietic system. During senescence, cells gradually lose their self-renewal and regenerative potential, as occurs in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia¹. Maintaining the hematopoietic function of these cells could thus ensure the homeostasis of the hematopoietic system. Several chemical and physical stimuli can modulate stem cell regenerative potential, counteracting senescence². Within this context, bioactive molecules as melatonin, can be used for their immunomodulatory and oncostatic properties³. In addition, also radio-electric waves as those emitted by the Radio Electric Asymmetric Conveyer (REAC) technology can be applied to reorganize the endogenous cell bioelectric activity⁴. Aim of the present studies was to evaluate the anti-senescent effect of melatonin or REAC Tissue optimization - regenerative (TO-RGN) treatment in HSPCs, in the attempt to improve their hemopoietic regenerative potential. HSPCs were isolated from blood samples obtained from patients with onco-ematological disorders. Samples were immediately processed using Ficoll-Paque PLUS density gradient media. To perform the experiments, HSPCs used as untreated control were cultured for 7 days in the growing medium alone. Cells were exposed to H₂O₂ to induce senescence, and then divided in two groups, the first was additionally cultured for 7 days in the growing medium, while another group was cultured for 7 days in the growing medium supplemented with melatonin. Another group was exposed

for 7 days only to melatonin and the last group was cultured in the presence of melatonin for 7 days and then exposed to H₂O₂ to induce senescence. In another set of experiments, HSPCs were isolated from bone marrow of low-risk myelodysplastic syndrome patients, during test carried out for clinical reasons. Samples were immediately processed using Ficoll-Paque PLUS density gradient media. The collected cells were put in culture for 24, 48 and 72 hours in the absence or presence of REAC-RGN. At the end of all the time points, we evaluated cell viability and analyzed the expression of genes regulating cell cycle and cell senescence, as p19ARF, P21, P53, and hTERT. Moreover, we assessed cell senescence by β -galactosidase and telomerase activity. We also evaluated the antioxidant properties of melatonin by catalase assay and measure of nitric oxide production. Our results showed the ability of the chemical stimulus melatonin, and the physical stimulus REAC TO-RG, to counteract cell senescence, reactivating a compromised hematopoiesis. Taken together, our findings suggest the possibility to apply these treatments as novel therapeutic tools to manage the age-related onco-hematological disorders.

1. Dong Y et al. *Stem Cell Res Ther* 12, 444 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02455-x>
2. McLaughlin KA et al. *Dev Biol.* 2018 Jan 15;433(2):177-189. doi: 10.1016/j.ydbio.2017.08.032.
3. Cruciani S et al. *Eur J Cell Biol.* 2022 Jun-Aug;101(3):151251. doi: 10.1016/j.ejcb.2022.151251.
4. Maioli M et al. *Physiol Res.* 2022 Aug 31;71(4):539-549. Epub 2022 Jul 28. PMID: 35899943

DETERMINAZIONE DI 17 INTERFERENTI ENDOCRINI IN MATRICI VARIE MEDIANTE UHPLC-MS/MS: MONITORAGGIO DELLA FILIERA DI PRODUZIONE DEL LATTE BUFALINO

Di Marco Pisciotano I., Guadagnuolo G., Gallo P.

Dipartimento di Chimica, IZS del Mezzogiorno, Portici (NA)

Nell'ambito di un progetto di ricerca corrente ministeriale, è stato sviluppato e validato un metodo analitico basato sulla separazione mediante cromatografia liquida e sulla rivelazione in spettrometria di massa tandem (UHPLC-MS/MS) per la determinazione di 17 Interferenti Endocrini (IE) nell'acqua di abbeveraggio, nel mangime, negli additivi per mangimi, nel latte e nel siero di sangue bufalino. I risultati di validazione hanno dato evidenza dell'affidabilità e della robustezza del metodo e i parametri di prestazione analitica sono risultati soddisfacenti in termini di esattezza, precisione, limiti di quantificazione (fino a 0.010 ng/g nel siero di sangue) e linearità della risposta strumentale¹. Al fine di monitorare la contaminazione da parte dei 17 IE nella filiera di produzione del latte bufalino, una delle più rilevanti attività economiche del Sud Italia, un totale di 508 campioni (201 mangimi, 9 additivi per mangimi, 62 acque di abbeveraggio, 46 latti e 190 sieri di sangue) sono stati prelevati da 10 allevamenti della regione Campania e analizzati. I risultati del monitoraggio hanno mostrato la contaminazione da parte di almeno un IE in tutte le matrici analizzate, fatta eccezione per l'acqua di abbeveraggio; diverse concentrazioni e profili di distribuzione dei contaminanti sono state osservate per le differenti matrici². Come ci si aspettava, il bisfenolo A (BPA) è risultato il contaminante più abbondante, determinato in circa il 30% dei campioni analizzati, seguito dal bisfenolo F (BPF), determinato nel 3.5% dei casi. Oltre al BPA e al BPF, altri bisfenoli sono stati determinati solo sporadicamente, e sono il bisfenolo A diglicidil etere (BADGE), il bisfenolo F diglicidil etere (BFDGE), il

bisfenolo S (BPS), il bisfenolo AF (BPAF) e il bisfenolo E (BPE). Il BPA è stato quantificato nel 54.2% dei mangimi analizzati, a concentrazioni comprese tra 1.2 e 174.7 ng/g, mentre il BPF è stato determinato nel 4.5% di mangimi nell'intervallo di concentrazione 10.9–142.2 ng/g. Per quanto riguarda i campioni di latte, invece, il BPA è stato ritrovato nel 58.7% dei campioni analizzati a concentrazioni comprese tra 0.5 e 5.6 ng/mL, mentre il BPF è stato determinato nel 17.4% dei campioni (0.5–8.7 ng/mL). I dati di monitoraggio suggeriscono che i mangimi siano la principale fonte di contaminazione della filiera, probabilmente a causa dei vari materiali plastici utilizzati per l'imballaggio. Inoltre, la determinazione degli stessi bisfenoli nelle diverse matrici suggerisce che ci sia effettivamente un trasferimento dei contaminanti dal mangime al latte attraverso l'alimentazione dell'animale. A conclusione dello studio effettuato, è stata calcolata la quantità di BPA che teoricamente il consumatore può assumere attraverso il consumo di latte bufalino sulla base della Dose Giornaliera Tollerabile (DGT) temporanea di 4 µg/kg bw/day stabilita per il BPA dall'EFSA³ e sulla base del consumo medio di latte bovino individuato dall'OMS. La valutazione dell'esposizione del consumatore al BPA ha mostrato che non esiste un significativo rischio per la salute del consumatore derivante dal solo consumo di latte bufalino; l'intake massimo, calcolato considerando la concentrazione più alta di BPA determinata nel latte, equivale, infatti, solo allo 0.7% della DGT stabilita da EFSA.

¹ DOI : <https://doi.org/10.1080/19440049.2022.2104933>

² DOI : <https://doi.org/10.3390/ani12040410>

³ EFSA Journal, 2015, 13(1):3978

ROLE OF miR-486-5p IN COLORECTAL CANCER

Federica Etzi¹, Andrea Pisano¹, Grazia Fenu¹, Angela Sabalic¹, Cristiano Farace¹, Roberto Madeddu^{1,2}.

¹*Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, Sassari, Italy;*

²*National Institute of Biostructures and Biosystems, Rome, Italy*

According to the International Agency for Research on Cancer (IARC), in 2020 Colorectal Cancer (CRC) was the second most deadly and the third most commonly diagnosed cancer type in the world. CRC could asymptotically advance to high cancer staging and metastasis in most of adult patients, when surgery and radio- and chemotherapy are no more effective. Cancer Stem Cells (CSCs) have an important role in cancer recurrence, drug-resistance and metastatic epithelial-to-mesenchymal transition and are also known as tumor-initiating cells (TICs). Also epigenetic mechanisms, including miRNA, play a role in initiation and progression of cancer indeed they act as both tumor suppressors and oncogenes [1]. The growing interest of studying miRNAs is also due to the possibility of their use as biomarkers. We investigated the expression of several miRNAs potentially implicated in colorectal cancer in cancer tissue (CT), healthy tissue (HT) and serum (S) of adult patients. Results indicated that miR-21, miR-210, miR-34a upregulation and miR-16 downregulation are associated with the CSCs phenotype. miR-31b is overexpressed in monolayers cell lines and CSCs, and in CT and S of high grade and Metastatic patients, suggesting a role as marker of CRC progression and metastasis. miR-18a is upregulated in all cancer models and is associated with CSC phenotype, metastasis and age in patients. miR-10b is downregulated in CT and S of LOW/HIGH grade and no-Metastatic patients. Our previous studies in addition highlighted the importance of miR-486-5p and its expression in patients with CRC [2]. In order to expand the knowledge about the role of this miRNA, we will perform a functional

study of invasion and migration in monolayer cell lines and CSCs transfected with miR-486-5p mimic and inhibitor.

References:

1. Khan AQ, Ahmed EI, Elareer NR, Junejo K, Steinhoff M, Uddin S. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells*. 2019 Aug 5;8(8):840. doi: 10.3390/cells8080840. PMID: 31530793; PMCID: PMC6721829.
2. Farace C, Pisano A, Griñan-Lison C, Solinas G, Jiménez G, Serra M, Carrillo E, Scognamillo F, Attene F, Montella A, Marchal JA, Madeddu R. Deregulation of cancer-stem-cell-associated miRNAs in tissues and sera of colorectal cancer patients. *Oncotarget*. 2020 Jan 14;11(2):116-130. doi: 10.18632/oncotarget.27411. PMID: 32010426; PMCID: PMC6968784.

SPONTANEOUS REORGANIZATION OF DNA-BASED POLYMERS IN HIGHER ORDERED STRUCTURES FUELED BY RNA

S. Gentile,¹ E. Del Grosso,¹ P. Pungchai,² E. Franco,³ L.J. Prins,⁴ F. Ricci¹

¹Department of Chemistry, University of Rome, Tor Vergata.

²Department of Bioengineering, University of California at Los Angeles.

³Department of Mechanical and Aerospace Engineering and of Bioengineering, University of California at Los Angeles.

⁴Department of Chemical Sciences, University of Padua

A strong current interest in the field of supramolecular chemistry is aimed at creating sophisticated mechanisms to develop synthetic biomaterials that, like their naturally-occurring counterparts, have the ability to reorganize and adapt in response to different molecular cues and can thus find applications in drug-delivery, sensing and diagnostics.¹ A common fundamental element of mimicking the living systems is that their operation is governed by kinetics, rather than thermodynamics.² Whereas it has been shown that external conditions (i.e. pH, temperature) can be used to control supramolecular pathways which permits identical building blocks to self-assemble in different kinetically stable products, such systems are eventually destined to eventually progress towards the thermodynamically most stable state.³ These limitations can be overcome by using reactions requiring chemical fuels to kinetically control the activation or deactivation of self-assembling building blocks. Motivated by these arguments, we demonstrate here the design of DNA-based addressable building blocks (tiles) that self-assemble into polymer-like structures that can be autonomously reorganized exploiting RNA as chemical fuel in the presence of RNA-degrading enzyme (RNase H).⁴ To do so, we have engineered a DNA polymeric system consisting of multiple assembling units (tiles) that can be deactivated by distinct RNA fuels. By simply modulating the kinetic of enzymatic degradations at which the individual components are reactivated, it is possible to control the supramolecular organization of the units into the final polymer. Such

mechanism to use RNA-fuels and enzymes that degrade them allows the autonomous transition of the self-assembled system in a controlled fashion between kinetic states of reorganization just by adding the appropriate RNA fuel and importantly permits an energetically uphill conversion of a disordered polymer into a new higher order structure, which is disfavored from an entropic point of view (Figure 1). This strategy could be useful for the development of multifunctional systems in which the relative organization of different clinically relevant biomolecules attached on a cargo-delivery DNA structure could lead to a different targeting ability of the structure itself.

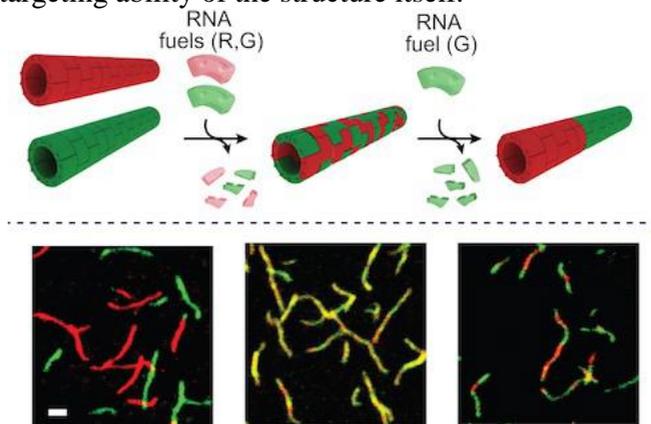


Figure 1. Spontaneous reorganization of DNA-based polymers triggered by RNA fuels.

- [1] B. Adelizzi et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 6110–6121.
- [2] G. Ragazzon et al. *Nat Nanotechnol.* **2018**, *10*, 882-889.
- [3] A. Sarkar et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 7606-7617.
- [4] S. Gentile et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 20296-20301.

PROBIOTICS MITIGATE BPA-INDUCED BRAIN-GUT-MICROBIOME AXIS TOXICITY IN *DANIO RERIO* ADULTS

Christian Giommi¹, Danilo Basili¹, Sara Mangiaterra², Giacomo Rossi², Hamid R. Habibi³, Francesca Maradonna^{1,4} and Oliana Carnevali^{1,4}

¹ *Dipartimento Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Via Brecce Bianche, 60131, Ancona, Italy;* ² *School of Biosciences and Veterinary Medicine, University of Camerino, Matelica (MC), Italy;* ³ *Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, Alberta, T2N 1N4, Canada;* ⁴ *INBB - Consorzio Interuniversitario di Biosistemi e Biostrutture, 00136, Roma, Italy.*

Email: c.giommi@pm.univpm.it;

The detrimental effects of Bisphenol A (BPA) on brain health are well documented both in mammalian and teleost species, and the derived increase of oxidative stress and apoptosis can lead to neurodegenerative outcomes. Evidence regarding its intestinal toxicity and dysbiosis have also been described. Considering the existence of a direct link between brain and gut, the toxicity induced by xenobiotics at intestinal level could induce damage also at central one or vice versa. For this reason, the administration of dietary supplements could be of help in reducing these adverse effects. In this scenario, probiotics could represent a tool to decrease the alterations induced by the disrupting endocrine activity of BPA since their beneficial effects have already been demonstrated in numerous vertebrate species. SLAB51, the probiotic formulation selected for this study, already showed the ability to ameliorate gastro-intestinal pathologies and to possess neuroprotective activity in diverse veterinary trials. Bearing that in mind, the aim of this study was to investigate the potential of SLAB51 in counteracting BPA toxicity at brain-gut-microbiome axis level in zebrafish adults. Thus, in a 28-day trial, SLAB51 was administered to adult zebrafish exposed to 10 µg/L BPA (BPA+P), aiming at counteracting BPA toxicity. Results were compared with those obtained in control (C) fish as well as in those treated with either BPA

or SLAB51 (P) alone. At brain level, male fish seemed more prone to BPA toxicity due to the increase of neuronal degeneration, microvessel alteration and perivascular edema, while female reported only an increase of microvessel alteration. Regarding apoptosis, TUNEL assay indicates an increase of cell death in both male and female fish exposed to BPA. In these same fish, markers of neurodegeneration, TAU protein and GFAP, were also upregulated. In BPA+P fish, the counteracting effects of probiotics on BPA toxicity was clearly demonstrate, and the above-described biomarkers presented levels closer to C ones. Concerning gut, histological analysis revealed that BPA induced severe morphological alteration with a reduction of intestinal fold length and an increase of the lamina propria thickness which was not dependent on the sex. A reduction of intestinal muscle thickness was only observed in female fish. At molecular level, BPA induced a reduction of *litaf* in both sexes and of *il-1 β* and *il-10* only in female, suggesting that the contaminant is able to impair the immune system. In BPA+P fish, probiotic reverted BPA effects. Gut microbiota analysis evidenced in both BPA exposed groups, the presence of *Pseudomonadales*, which use BPA as substrate of growth, while in SLAB51 exposed fish, both alone or in combination with BPA, the presence of *Cetobacterium*, a vitamin B12 producing bacteria, useful for organism health status, was favored. In conclusion, these results show for the first time the ability of probiotics to counteract BPA toxicity in zebrafish gut and brain, suggesting the possible use of SLAB51 in the treatment of toxicity induced by a chronic exposure to environmental BPA levels and possibly other endocrine disruptors.

IN VIVO TREATMENT WITH A STANDARDIZED GREEN TEA EXTRACT RESTORES CARDIOMYOCYTE CONTRACTILITY IN DIABETIC RATS BY IMPROVING MITOCHONDRIAL FUNCTION THROUGH SIRT1 ACTIVATION

Simona Izzo, Valeria Naponelli, Rocchina Vilella, Donatella Stilli e Saverio Bettuzzi

Green tea catechins are known to promote mitochondrial function and to modulate gene expression and signalling pathways that are all altered in the diabetic heart. We thus evaluated the effectiveness of the long-term in-vivo administration of a standardized green tea extract (GTE) in restoring cardiac performance, in a rat model of early Streptozotocin-induced diabetes, with focus on the underlying mechanisms.

The study was performed on three groups of male adults Wistar rats: control (n=9), untreated diabetic animals (n =7) and diabetic rats subjected to daily GTE administration for 28 days (n=9). Isolated ventricular cardiomyocytes were used for ex vivo biochemical and molecular analyses.

GTE treatment induced an almost complete recovery of cardiomyocyte contractility that was markedly impaired in the diabetic cells, by preserving mitochondrial function and energy availability, and modulating the expression of the sarcoplasmic reticulum calcium ATPase and phospholamban. The increased Sirtuin 1 (SIRT1) expression and activity substantially contributes to the observed cardioprotective effects.

Data support the hypothesis that green tea dietary polyphenols, by targeting SIRT1, can constitute an adjuvant strategy for counteracting the initial damage of the diabetic heart before the occurrence of diabetic cardiomyopathy.

BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ROOT EXTRACT OF THE PURPLE CARROT (*DAUCUS CAROTA* L.) CV. 'PURPLE SUN'

Viviana Maresca^{a,#}, Lucia Capasso^{a,#}, Luigi De Masi^{b,*}, Daniela Rigano^c, Adriana Basile^d, Lucia Altucci^a, Angela Nebbioso^a, Paola Bontempo^a

^a *Department of Precision Medicine, University of Campania 'Luigi Vanvitelli', Via L. De Crecchio 7, 80138 Naples, Italy*

^b *National Research Council (CNR), Institute of Biosciences and Bioresources (IBBR), Via Università 133, 80055 Portici, Italy*

^c *Department of Pharmacy, University of Naples 'Federico II', Via Montesano 49, 80131 Naples, Italy*

^d *Department of Biology, University of Naples 'Federico II', Via Cinthia 26, 80126 Naples, Italy;*

[#] *These two authors contributed equally to this work.*

^{*} *Corresponding author: luigi.demasi@ibbr.cnr.it (L.D.M.)*

As part of the IDENTIQUA project, the biological activities of the total extract from the roots of the purple carrot (*Daucus carota* L.) cv. 'Purple Sun' were investigated from cellular and molecular points of view. Purple carrots contain high levels of anthocyanins, natural dyes known for their health properties.

The aim of the present study has been to verify the effects of this extract to improve our knowledge on the potential beneficial effects of this carrot arising from its functional components such as anthocyanins. To reach these goals the cellular and molecular mechanisms of purple carrot extract-induced antiproliferative effect were determined in colon and hematological cancer cells. In addition, antioxidant activity in terms of reactive oxygen species (ROS) levels and antioxidant enzyme activities in polymorphonuclear leukocytes (PMNs) of healthy patients was evaluated. Finally, the antibacterial

activity on nine bacterial strains, both Gram(-) and Gram(+) species, were investigated.

The results showed that the purple carrot extract induces proliferative arrest and modulates the expression of important cellular regulators. An increase in the activity for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST) enzymes and a decrease of the ROS levels in opsonized zymosan (OZ)-stressed PMNs were also observed. Finally, the total extract showed significant antibacterial activities.

Therefore, all of this considered, carrot ‘Purple Sun’ could be a promising functional food and an optimal candidate for pharmaceutical and/or nutraceutical preparations.

Keywords: purple carrot; root extract; anthocyanins; antiproliferative effect; antioxidant activity; antibacterial activity.

Funding: These studies were funded by GAL A.I.S.L. Irpinia-Sannio CILSI (Campania Region, Italy) through a grant to the project “IDENTIQUA” CUP: H32C19000270009 (PSR Campania 2014–2020, M16.1.1, Az. 2).

Acknowledgments: The authors are very grateful to Orsola Cossia of CNR-IBBR Portici (Italy) for her expert technical assistance and precious administrative support.

ANALISI DEL RUOLO DEI RECETTORI ERBBS NEL CARCINOMA MAMMARIO DI TIPO BASALE

Carmen Miano^{1,2,3}, A. Morselli^{2,3}, F. Sacchi^{1,2,3}, S. Da Pra^{1,2,3}, C. Bongiovanni^{1,2,3}, I. Del Bono^{1,2,3}, L. Salis^{2,3}, R. Tassinari⁴, D. Romaniello^{2,3}, M. Sgarzi^{2,3}, C. Ventura^{1,3}, M. Lauriola³, G. D'Uva^{1,2,3}

1) *National Institute of Biostructures and Biosystems (INBB), Bologna*; 2) *Centre for Applied Biomedical Research (CRBA), University of Bologna*; 3) *Department of Experimental Diagnostic and Specialty Medicine (DIMES) University of Bologna*; 4) *Eldor Lab c/o CNR, Bologna*.

Il carcinoma mammario può essere stratificato in differenti sottotipi con diversa prognosi clinica e strategie terapeutiche. Il sottotipo basale e il triplo-negativo mostrano un alto grado di sovrapposizione, e sono caratterizzati da una prognosi sfavorevole con limitate strategie terapeutiche. I recettori ERBBs (EGFR, ERBB2, ERBB3 ed ERBB4) hanno un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione di diversi tumori solidi, come anche nel carcinoma mammario; vengono attivati da vari ligandi, che ne inducono l'omo- e/o etero-dimerizzazione con altri membri della famiglia, contribuendo all'attivazione di segnalazione a valle. Analisi bioinformatiche condotte nel nostro laboratorio su una coorte di pazienti con carcinoma mammario hanno evidenziato che elevati livelli di ERBB3 correlano con una ridotta sopravvivenza esente da recidive in pazienti con sottotipo basale. Per comprendere il meccanismo alla base di questa correlazione sono stati condotti studi *in vitro* su una linea cellulare quasi-normale (MCF10A) con profilo di espressione genica di tipo basale, in cui abbiamo attivato il recettore ERBB3 mediante stimolazione con il ligando Neuregulina 1 (NRG1 β). L'attivazione del recettore non ha evidenziato differenze significative nella proliferazione, motilità e differenziamento delle cellule coltivate in aderenza (coltura 2D). Dal momento che la capacità di sopravvivere e crescere in sospensione è considerata un prerequisito per la disseminazione tumorale e la successiva formazione di metastasi, abbiamo testato gli effetti dell'attivazione di questa via in

assenza di adesione (coltura 3D). Colture 3D di MCF10A hanno mostrato un forte incremento dei livelli proteici sia di ERBB2 che di ERBB3, rispetto a colture 2D. Inoltre, la stimolazione con NRG1 β ha aumentato significativamente il numero e le dimensioni degli sferoidi derivanti dalle cellule coltivate in sospensione. La capacità di NRG1 β nell'indurre la proliferazione degli sferoidi di cellule basali è risultata dipendente da ERBB2, poichè bloccata da anticorpi anti-HER2. Risultati concordi sono stati ottenuti anche su MDA-MB-468 e MDA-MB-231, due modelli cellulari di carcinoma mammario di tipo basale/triplo-negativo. I nostri dati suggeriscono che l'asse NRG1 β /ERBB3/ERBB2 favorisce la crescita in assenza di substrato di cellule del sottotipo basale/triple-negativo, suggerendo un ruolo nel processo di metastatizzazione di questo specifico sottotipo e che la somministrazione di anticorpi monoclonali anti-HER2 possa rappresentare una nuova potenziale strategia terapeutica per questa sottocategoria di pazienti. Nell'ambito dello stesso progetto, stiamo analizzando il ruolo di EGFR, i cui elevati livelli di espressione correlano con una più lunga sopravvivenza nel sottotipo basale. A tal riguardo, trial clinici volti ad inibire EGFR in pazienti affetti dal sottotipo basale/triplo-negativo non hanno mostrato gli esiti previsti, ed il meccanismo alla base di questi risultati resta ancora da chiarire. I nostri dati preliminari *in vitro* hanno evidenziato che l'esposizione ad EGF riduce i livelli di ERBB2 e che basse dosi di EGF inducono un incremento di proliferazione superiore rispetto alle alte dosi. Una più approfondita analisi del cross-talk tra i recettori EGFR ed ERBB2 sarà essenziale per sviluppare nuove potenziali strategie terapeutiche per il sottotipo basale.

L'INESPLORATO RUOLO DEL RECETTORE BETA3-ADRENERGICO (BAR3) NEL CONTROLLO DELLA FUNZIONE RENALE DA PARTE DEL SISTEMA NERVOSO SIMPATICO

Serena Milano

Dip. di Bioscienze, Biotecnologie e Ambiente, Università degli Studi di Bari

Il sistema beta-adrenergico regola numerose funzioni renali. Esistono tre sottotipi di recettori beta-adrenergici (BAR): BAR1, BAR2, BAR3. L'espressione e il ruolo dei BAR1 e BAR2 nella fisiologia renale sono stati ampiamente documentati mentre non indagata risultava la presenza del BAR3. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente riportato numerose evidenze sperimentali riguardanti l'espressione e il ruolo del recettore BAR3 nel rene. Interessantemente tale recettore è presente, nel rene di topo, nella maggior parte dei segmenti del nefrone esprimenti il recettore di tipo 2 dell'ormone antidiuretico vasopressina (V2R), tra cui il tratto spesso ascendente dell'ansa di Henle (TAL), il tubulo convoluto distale (DCT) e il dotto collettore corticale e midollare (CD). Dal punto di vista funzionale abbiamo dimostrato che la stimolazione del BAR3 riduce l'escrezione urinaria di acqua e soluti agendo su attori chiave nel processo di concentrazione delle urine: il canale per l'acqua AQP2 del CD, il co-trasportatore sodio-potassio-cloruro NKCC2 del TAL e il co-trasportatore sodiocloruro NCC del DCT. L'agonismo selettivo del BAR3, indagato ex vivo su fettine di tessuto renale, promuove l'espressione di AQP2 sulla membrana plasmatica apicale delle cellule principali (PC) nel CD e l'attivazione di NKCC2 nel TAL e di NCC nel DCT, meccanismi responsabili del riassorbimento idrosalino renale. Il ruolo del recettore BAR3 nella fisiologia renale è stato ulteriormente studiato analizzando, sia a livello molecolare che a livello di funzionalità d'organo, in topi BAR3 knock out (BAR3 ko), l'effetto della sua inattivazione genica. A livello molecolare i topi BAR3 ko, rispetto agli animali wild type (wt), mostrano ridotta AQP2

sulla membrana luminale delle cellule PC nel CD e ridotti livelli di NKCC2 ed NCC attive. Questi risultati sono coerenti con l'aumento dell'escrezione urinaria di acqua e soluti osservato nei topi BAR3 ko. Interessante è stato verificare che, in vivo, la stimolazione del BAR3 ha promosso il riassorbimento di acqua e soluti in animali privi di recettore V2 della vasopressina. Questo suggerisce che l'agonismo del BAR3 guida un processo di antidiuresi, indipendente dalla vasopressina, che potenzialmente potrebbe rappresentare un nuovo approccio terapeutico per correggere il difetto di concentrazione delle urine causato da mutazioni inattivanti del recettore V2 della vasopressina. Importante, per il possibile impiego terapeutico della stimolazione farmacologica cronica del BAR3, è stato l'aver dimostrato, in cellule renali in coltura, che il BAR3 è resistente alla densitizzazione indotta da agonista. Per verificare se anche nell'uomo la stimolazione del BAR3 ha un effetto su AQP2 ed NKCC2, abbiamo analizzato l'escrezione urinaria di queste, indice della loro espressione in membrana, in una coorte di pazienti che assume l'agonista del BAR3 per il trattamento della vescica iperattiva, riscontrandone un aumento. La stimolazione del BAR3 renale esercita un ruolo regolatorio non solo del bilancio idro-salino ma anche di quello acido-base. Topi BAR3 ko, infatti, presentano ridotti livelli di espressione della pompa protonica nel TAL, DCT e CD e minore abilità, rispetto a topi wt, nell'estrudere protoni nelle urine quando sottoposti a carico acido con NH₄Cl. Nel loro insieme queste evidenze fanno luce su un inesplorato ruolo del sistema nervoso simpatico nel regolare la funzionalità renale attraverso il recettore BAR3 con importanti implicazioni terapeutiche per correggere difetti di concentrazione delle urine e/o le conseguenze di alcuni squilibri metabolici.

ADVERSE EFFECTS OF NANOPLASTICS ON THE EUROPEAN SEA BASS *DICENTRARCHUS LABRAX* DLEC CELL LINE

Miccoli Andrea¹⁺, Saraceni Paolo Roberto¹⁺, Perrotta Francesca¹, Anna Rita Taddei², Scapigliati Giuseppe¹, Picchiatti Simona¹

¹ Department for Innovation in Biological, Agro-food and Forest Systems, University of Tuscia

² Center of Large Equipments, Section of Electron Microscopy, University of Tuscia

+ These authors contributed equally

Very little knowledge is available on nanoplastics (NPs, 1000 to 20 nm size range). Quantifying them in the natural environment is currently unachievable due to technical and economic limitations, and their effects on marine organisms have not been detailed so far, but preliminary results suggest that greater attention should be paid to such emerging environmental pollutants.

The present research investigated the physiological effects of commercial polystyrene NPs of 20 and 80 nm in size on the *Dicentrarchus labrax* Embryonic Cell line (DLEC). By employing a step-wise methodological approach at increasing complexity and leveraging upon *in vitro* techniques, we i) evaluated the time-dependent individual and additive cytotoxic potential of 0.1 to 200 µg/ml NPs, ii) monitored the process of cellular internalization and iii) shed light on NPs as apoptosis-inducing factors.

NPs of both sizes were first characterized via transmission electron microscopy (TEM). The cytotoxic impact of 20 nm NPs, evaluated by the ATPlite assay, was more severe than that of 80 nm. The highest dose of 200 µg/ml of the former provoked a significant decrease in cell viability already following a 3-h exposure. Of interest, a hormetic biphasic dose-response was noted within 30 minutes from exposure. At 24 h, the viability resulting from the exposure to 20 or 80 nm NPs was 30.9% or 75.5%, respectively. Following the combined exposure

to 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of each NP size, 24 h cell viability accounted to 73.4%. Cell internalization of both NP sizes was visualized via confocal microscopy as soon as 30 minutes post-exposure (Fig. 2, left). Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated that only the smallest NP particles induced marked changes in cell morphology in a time-dependent manner, as membrane blebbing, commonly associated with cell injury and apoptosis, was visible from the 6 hour exposure time point onwards (Fig. 2, right). The triggering of the apoptotic pathway was confirmed by flow cytometry with the annexin V - propidium iodide assay. 23.3% and 12.2% of cells exposed to 20 nm NPs displayed the typical signatures of late and early apoptosis, respectively. No evidence of reactive oxygen species production was found in any of the experimental groups treated with both NP sizes.

This work provided evidence of NPs toxicity on a cell line of a teleost species that has been increasingly recognized as a reference experimental model in physiological research. The approaches herein employed are also at the forefront in ecotoxicology terms, as per the most recent European guidelines supporting the 3Rs principle in animal experimentation. Future efforts will be dedicated to characterizing the broader physiological response by omics approaches, with a particular focus on the developmental and immune processes.

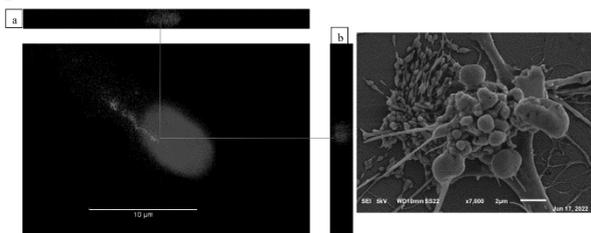


Fig. 1 Cell internalization of 20 and 80 nm NPs after 30 mins (left). Detail of apoptotic cell blebbing after 24-h exposure (right, 7000x magnification)

POTENTIAL SYNERGIC AND ANTAGONISTIC EFFECTS OF EDC MIXTURES ON HUMAN PROSTATE CELLS

Aldo Mileo*¹, Marzia Licata¹, Lorenzo Riccio¹, Teresa Chianese¹,
Vincenza Laforgia¹, Pietro Formisano², Maria De Falco¹

¹Department of Biology, Naples, Italy, ²Department of Medical and Translational Sciences, Naples, Italy

Endocrine Disruptor Chemicals (EDCs) are a heterogeneous class of chemicals that have raised many concerns due to their chemical and physical features, such as high hydrophobicity and low water solubility. These environmental pollutants remain in different environmental matrices for a long time. So, they can bioaccumulate in adipose tissue and biomagnificate in food chain¹. Two EDCs usually used in the manufacture of domestic, industrial, and agricultural products are Dibutylphthalate (DBP) and Nonylphenol (NP). We find them in personal-care products, children's toys, and food products, so human population appears to be predominantly exposed to them, through ingestion or skin contact. It has already been demonstrated that both can be harmful to male reproductive system²⁻⁴. Due to the important role of prostate gland in male reproduction and fertility, the aim of this study is to evaluate the effects of DBP and NP, used alone or in different mixtures with or without 17- β -estradiol and testosterone on human prostate cell line PNT1A. Firstly, we showed that all tested EDCs, alone or in mixtures, affected cell proliferation: we observed a hyperproliferative estrogen-like behaviour of NP that in mixtures seemed to hide the antiandrogenic effect of DBP. We also showed that DBP and NP triggered estrogen receptor pathways, mainly interacting with ER α . Moreover, we investigated EDC ability to induce inflammation that is a first step to prostate gland hyperplasia. We showed that cytokines and chemokines levels, such as IL-9, PDGF, TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β , IL-1 β were altered after all the treatments, suggesting NP and DBP involvement in the onset of inflammation processes. In conclusion, we have pointed attention on dangerousness

of the mixtures able to induce a strong imbalance of prostate cell physiology.

References

1. De Falco M and Laforgia V. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 18(18): 9772. doi: 10.3390/ijerph18189772
2. Di Lorenzo M, et al. *Ecotoxicol Environment Saf* 2018; 147:565-73. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.09.030>
3. Forte M, et al. *Toxicology* 2016; 357-358, 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.024>
4. Forte M, et al. *Ecotoxicol Environment Saf* 2019; 180:412-9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.035>

ENZYME IMMOBILIZATION ON 3D BIOPOLYMER SUPPORTS FOR THE RECOVERY OF THE PROTEIN COMPONENT FROM AGRICULTURAL BIOMASSES

Nicolò Montegiove^{1,*}, Eleonora Calzoni¹, Alessio Cesaretti¹, Silvia Tacchi², Silvia Caponi², Roberto Maria Pellegrino¹, Francesca Luzi³, Francesco Cottone⁴, Daniele Fioretto^{4,5}, Alessandro Di Michele⁴, Carla Emiliani^{1,5}

¹*Department of Chemistry, Biology and Biotechnology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy*

²*Department of Physics and Geology, Istituto Officina dei Materiali of the CNR (CNR-IOM)—Unit of Perugia, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy*

³*Civil and Environmental Engineering Department, University of Perugia, UdR INSTM, 05100 Terni, Italy*

⁴*Department of Physics and Geology, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy*

⁵*Centro di Eccellenza sui Materiali Innovativi Nanostrutturati-CEMIN, University of Perugia, 06123 Perugia, Italy*

**Presenting author: nicolo.montegiove@studenti.unipg.it*

Nowadays the employment of enzymes in the industrial field, especially in their immobilized form, has grown enormously. In fact, by virtue of their specificity and ability to work under mild conditions of temperature and pH, enzymes can be used to regulate several kinds of processes. In particular, immobilized enzymes are emerging as useful tools in many industrial applications such as the treatment of agricultural waste biomasses. The protein component recovery from these biomasses proves indeed extremely alluring as it can provide protein hydrolysates, which represent high-added-value products that can find application in several industrial sectors. Furthermore, enzymatic catalysis would guarantee both to lower the process's environmental impact compared to conventional thermal hydrolysis and raise the product quality, due to the reproducible formation of low molecular weight peptides with interesting and often unexplored

biological activities. In this light, the aim of this work is the immobilization of proteases from *Aspergillus oryzae* on a multifunctional and versatile biopolymer, *i.e.* polylactic acid (PLA). Enzymes were covalently immobilized on 3D-printed PLA columns in order to develop a small laboratory-scale continuous-flow bioreactor where the stability of the enzymatic activity over time and the ability to hydrolyze agricultural waste biomasses were evaluated. At the same time, a biochemical and physical characterization of the system, aimed at evaluating the stability to temperature and pH variations, was performed. The developed bioreactor displayed the ability to recover high-added-value products consisting of small peptides and free amino acids with various possibilities of application in different industrial sectors depending on the composition and properties of the resulting product.

PURIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI PEPTIDI BIOATTIVI A CATENA CORTA OTTENUTI DA SEMI DI CANAPA CON PROPRIETÀ MULTIFUNZIONALI PER LA PREVENZIONE E IL TRATTAMENTO DELLA SINDROME METABOLICA

Carmela Maria Montone

Dipartimento di Chimica, Università degli studi di Roma La Sapienza, Piazzale Aldo Moro 5, 00185 Roma

La sindrome metabolica (MetS) comprende un gruppo di anomalie metaboliche, tra cui accumulo di lipidi, insulino-resistenza e infiammazione cronica, che portano a tre principali condizioni mediche a lungo termine, ovvero diabete di tipo II, malattie cardiovascolari (CVD) e ictus ischemico.

L'attuale gestione della MetS include l'adozione di uno stile di vita sano e un regime terapeutico a lungo termine, che spesso prevede la somministrazione di diversi farmaci costosi. L'approccio “*polypill-based*” rappresenta una possibile soluzione per mitigare questi problemi, in quanto mira allo sviluppo di farmaci contenenti più di un agente farmaceutico, e consente di ridurre i costi, quando si utilizzano agenti bioattivi generici; la ricerca in questo ambito è ancora in corso specialmente per superare il problema di incorrere in effetti indesiderati.

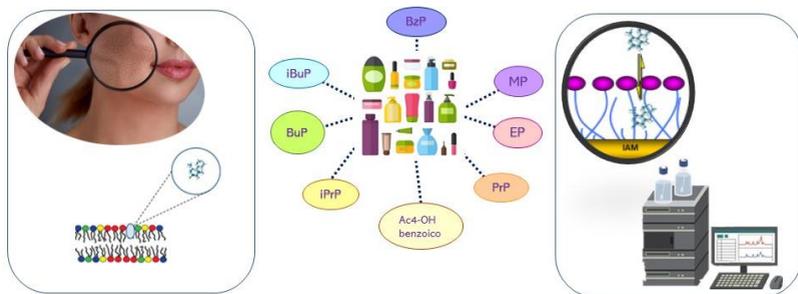
Ad oggi, per alcune delle patologie metaboliche, e in particolare per tenere sotto controllo i livelli di colesterolo nel sangue, viene utilizzato il riso rosso fermentato; quest'ultimo non è riconosciuto come vero e proprio farmaco e può dare origine ad effetti collaterali per la presenza di monacolina K. L'utilizzo e la messa in commercio di un nutraceutico alternativo a base di una miscela di peptidi potrebbe aprire sul mercato una promettente alternativa, non solo per il controllo della pressione sanguigna ma per tutte le patologie metaboliche ad essa correlate. Nel presente studio si intende

valorizzare un prodotto commerciale costituito da semi decorticati o farina di canapa, la quale possiede un contenuto proteico tra il 20 e il 40%, per ottenere miscele di peptidi con proprietà biologiche multifunzionali. In generale, i peptidi a catena corta (inferiori a 5 aa) sono spesso maggiormente bioattivi di quelli costituiti da un numero maggiore di aminoacidi (da 5 a 20 aa), dal momento che non subiscono degradazione che potrebbe avvenire nel tratto gastrointestinale e quindi possono essere maggiormente assorbiti ed entrare nel circolo sanguigno espletando le loro funzionalità biologiche. Inoltre, hanno maggiore capacità di interagire con uno specifico target, come per esempio il sito attivo di un enzima, rispetto ai peptidi più lunghi. L'isolamento e l'identificazione di peptidi a catena corta è una sfida analitica ancora oggi aperta, in questo lavoro tale sfida è superata mediante lo sviluppo di una piattaforma analitica avanzata per la specifica purificazione e identificazione di peptidi a catena corta, inoltre sono stati eseguiti saggi biologici per testare l'attività ipoglicemizzante, ipotensiva, ipocolesterolemizzante e antiossidante, in vitro e sul modello cellulare Caco-2. La valutazione preclinica ha dimostrato l'efficacia dell'idrolizzato dimostrando che tale miscela può essere sfruttata come prezioso ingrediente per lo sviluppo di alimenti funzionali innovativi e/o integratori alimentari utili per la prevenzione delle patologie associate alla MetS.

PARABENS PERMEATION THROUGH BIOLOGICAL MEMBRANES: A COMPARATIVE STUDY USING FRANZ CELL DIFFUSION SYSTEM AND BIOMIMETIC LIQUID CHROMATOGRAPHY

Ilaria Neri¹, Giacomo Russo^{1,*} and Lucia Grumetto^{1,*}

1. Department of Pharmacy, School of Medicine and Surgery, University of Naples Federico II, Via D. Montesano, 49, I-80131 Naples, Italy



Parabens (PBs) are a group of molecules, deriving from esterification of hydroxybenzoic acid (pHBA), that are commonly used, since the 1920s, as preservatives in foodstuffs, pharmaceuticals, and personal care products (PCPs) to increase their shelf life [1]. Nowadays many scientific studies raised concerns about PBs effects on human health, mainly due to the suspicious that they act as endocrine disruptors (EDCs) [2]. EDCs have been suspected to be associated with altered reproductive function in males and females, increased incidence of breast cancer, abnormal growth patterns as well as changes in immune function. PBs can leak into the environment because they are released mainly through wastewater treatment discharges and can be easily absorbed by the human body, through their primary route, *i.e.* the skin [3]. European Union (EU) limited short-chained parabens in cosmetics, such as Methyl 4-hydroxybenzoate (MP), Ethyl 4-hydroxybenzoate (EP) to 0.4 % w/w of a total product, lowering

concentration limits of Propyl 4-hydroxybenzoate (PrP) and Butyl 4-hydroxybenzoate (BuP) to 0.14 % and prohibiting the use of the latter in children's products. Instead, isopropyl, isobutyl, phenyl, benzyl, and pentyl parabens in PCPs were banned [4]. In this scenario the assessment of the capability of PBs to cross the biological membranes, exerting their toxicity, is needed. Generally, for *ex vivo* permeation, excised human or animal skin is recommended, but, because of the limited availability of the human skin and the ethical issue regarding its use, the permeation studies are hardly performed. These issues motivated the development of a wide variety of alternatives in the last three decades. Our study investigated the membrane barrier potential crossing of seven PBs, allowed and banned by EU through biomimetic liquid chromatography (BLC) compared with Franz cell diffusion (FDC) method. We explored the possible relationship between BLC and transdermic passage results to verify if the phospholipophilicity, *i.e* the affinity of PBs for membrane phospholipids, can predict their permeation. A liquid chromatographic technique using immobilized artificial membrane stationary phases was employed; the latter consist of phosphatidylcholine (PC) analogues, aiming to mimic biological cells membranes closely. The results showed that BLC can be a useful tool to understand PBs permeation, providing a scale of affinity for phospholipids that supports the results performed with FDC, emphasizing the need for a multitechnical experimental approach.

[1] Oliveira, M.M.; et al. *Antioxidants* 2020, 9, 1302. [2] Wei, F.; et al. *Sci. Total Environ.* 2021, 778, 146150. [3] Nowak, K.; et al. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2018, 474, 238–251. [4] EU. Regulation (EC) No 1004/2014 of the European Parliament and of the Council on cosmetic products. 2014, No 1004/2014.

IMPIEGO DI MATRICI POLIMERICHE NELLA FABBRICAZIONE *IN VITRO* DI TESSUTO MUSCOLARE SCHELETRICO

Pacilio Serafina^{abc}, Costa Roberta^{ab}, Gotti Carlo^c, Papa Valentina^a,
Rodia Maria Teresa^{ab}, Focarete Maria Letizia^c and Cenacchi
Giovanna^{ab}

^aDipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie DIBINEM, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Italia

^b Centro Unificato di Ricerca Biomedica Applicata-CRBA, IRCCS Policlinico Sant'Orsola, Alma Mater Studiorum Università di Bologna, Italia

^cDipartimento di Chimica "Giacomo Ciamician" Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Italia

L'ingegneria tissutale combina biomateriali, cellule e fattori bioattivi, riproducendo un temporaneo biomimetico ambiente extracellulare in grado di supportare l'adesione e la proliferazione cellulare. In tale contesto, obbiettivo dello studio è stato studiare il ruolo di uno dispositivo (scaffold) elettrofilato utilizzando polimeri biodegradabili e biocompatibili durante la miogenesi del muscolo scheletrico come approccio alternativo alla rigenerazione dei tessuti, al riposizionamento farmacologico e all'ingegneria genetica. La nanostruttura ingegnerizzata dello scaffold è stata prodotta tramite elettrofilatura di poli(acido L-lattico)-poli(ϵ -caprolattone) (PLCL) sotto forma di matrice nanofibrosa e porosa conseguentemente rivestita di collagene di tipo I. I mioblasti murini C2C12 sono stati seminati sullo scaffold polimerico e sono state valutate la morfologia cellulare e il percorso di differenziazione (Figura 1). L'analisi al microscopio a scansione (SEM) ha mostrato come lo scaffold di PLCL abbia sostenuto la proliferazione e la differenziazione delle cellule guidando la morfogenesi e promuovendo lo sviluppo di interazioni e di aderenze cellulari. Inoltre, l'espressione di marcatori regolatori miogenici e proteine muscolo-specifiche hanno evidenziato come la

presenza del dispositivo abbia contribuito a una differenziazione miogenica precoce. Nel complesso, il dispositivo progettato imita le funzionalità fisiche e l'organizzazione strutturale del microambiente tissutale alterando positivamente il comportamento e il destino delle C2C12 con una maggiore differenziazione in senso miogenica in una ridotta scala temporale (Figura 2). Questi primi risultati suggeriscono come l'ingegneria tissutale favorisca una precoce maturazione tissutale *in vitro* fungendo da potenziatore per la differenziazione delle cellule e la formazione del tessuto superando le limitazioni della convenzionale coltura cellulare su piastre in 2D. In aggiunta, primi studi sono stati condotti su un costrutto 3D di collagene da noi progettato tramite stampa 3D per ricostruire e studiare il tessuto muscolare utilizzando cellule prelevate da paziente. La versatilità e la riproducibilità del nostro sistema sarà ulteriormente sfruttata per fabbricare modelli di tessuto *in vitro* ed *in vivo* in condizione fisiologiche e patologiche per poter indagare nel dettaglio i meccanismi patogenetici e testare nuovi approcci farmacologici.

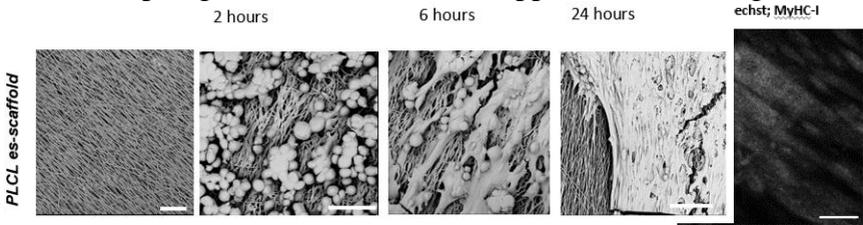


Figura 1 Analisi della proliferazione delle C2C12 su scaffold tramite SEM

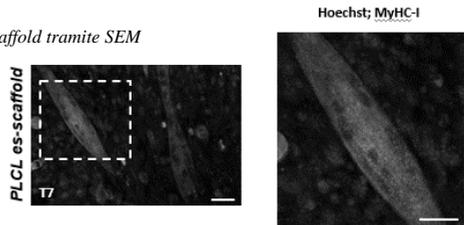


Figura 2 Immunofluorescenza delle C2C12 su scaffold durante il differenziamento miogenico

DESIGN OF CLASS-G MONOCLONAL ANTIBODIES FOR THE TREATMENT OF CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA (DOGMA)

Passannanti R.^a, De Lauro A.^a, Antonini G.^{a,b}, Gallo V.^a, Croce N.^b, Salvatore G.^b, Pitaro M.^b, Narducci M.G.^c, Polticelli F.^{a,b}

a. *Dipartimento di Scienze, Università degli Studi Roma Tre, Italia.*

b. *Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi (INBB), Roma, Italia.*

c. *Laboratory of Molecular Oncology, IDI-IRCCS, Roma, Italia.*

Cutaneous T cell lymphomas (CTCLs) are lymphoproliferative disorders of T cells. One of the most common CTCLs is Sézary syndrome, characterized by a median overall survival time of only 2.4 years¹⁻². Although there are several therapies under evaluation that target T cells, none have led to a cure.³ Since lymphomas originate from the neoplastic transformation of a single lymphocyte⁴, the T-cell receptor (TCR) on the surface of neoplastic cells uniquely distinguishes tumor cells from healthy ones. Thus, the design of antibodies able to bind the variable region of neoplastic TCRs represents a possible therapeutic solution. The aim of the DOGMA project is the computational design of therapeutic antibodies directed against the TCRs of patients with Sézary syndrome. To this aim the following computational pipeline has been developed and currently under validation:

Modelling of the 3D structure of neoplastic TCRs.

To validate the modelling protocol we generated a dataset of 17 non-redundant TCRs (sequence identity < 90% on the 6 CDR and resolution < 3 Å). These structures were modelled with 6 different computational procedures. The best performing protocol is Alphafold2.2 with a success rate of 82.3% (RMSD < 2Å)⁵ and with a quality of the models produced in a range of RMSD for backbone atoms from 1.0 to 1.5 Å.

Modelling of an antibody-antigen (TCR) complex as a starting point for *in-silico* affinity maturation.

To validate the antibody-antigen complex generation step, we selected a dataset of 24 non-redundant complexes (antibodies with sequence identity <99%, antigens <90%). SnugDock from the Rosetta suite was used for the docking procedure; the protocols used were: ensemble docking and standard protein-protein docking. To analyse the results obtained, we calculated the iRMSD between the native complex and the complex obtained by docking simulations.⁶ For both protocols, the success rate is 66.6%, but the standard procedure yields better quality complexes with an iRMSD ranging from 3.5 to 10.0 Å.

In-silico affinity maturation.

Regarding this step of the protocol, the validation is still in progress. However, an affinity maturation test was performed, using RosettaAntibodyDesign (RABD), on an antibody-antigen complex from the above described dataset. The $\Delta G_{\text{binding}}$ of the experimental and computational complexes has been calculated using the MM/GBSA and MM/PBSA methods following 100 ns MD simulations. The results indicate that the binding energy of the computational complex is lower than that of the experimental one. A similar result was observed with the Rosetta score highlighting a decrease in the total energy of the computational complex with respect to the experimental one.

In conclusion, the protocol developed and validated yields promising results in terms of the ability to design a high affinity antibody for a given macromolecular antigen.

References

- 1) 10.1200/JCO.2009.27.7665
- 2) 10.1111/bjd.12909
- 3) 10.1038/ng.3444
- 4) 10.1098/rsob.160232
- 5) 10.1093/nar/gky432
- 6) 10.1093/bioinformatics/btu190

DEVELOPMENT OF AN LC-MRM/MS METHOD TO MONITOR SARS-COV -2 PROTEINS FROM NASOPHARYNGEAL SWABS AND SERUM PROTEINS IN VIRUS-AFFECTED SUBJECTS

Gabriella Pinto^{1,2}, Anna Illiano^{1,2,3}, Veronica Ferrucci^{3,4}, Fabrizio Quarantelli³, Carolina Fontanarosa^{1,2}, Roberto Siciliano³, Carmela Di Domenico³, Barbara Izzo^{3,4}, Piero Pucci^{1,3}, Gennaro Marino¹, Massimo Zollo^{3,4}, Paola Salvatore⁴, Angela Amoresano^{1,2}

¹Department of Chemical Sciences, University of Naples Federico II, Via Cinthia 26, 80126 Naples, Italy; ²Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi-Consortio Interuniversitario, Viale delle Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy; ³CEINGE Advanced Biotechnology, Via Gaetano Salvatore 486, 80145 Naples, Italy; ⁴Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, 80145 Naples, Italy
Corresponding author: gabriella.pinto@unina.it

Keywords: Proteomics, SARS-COV-2, nasopharyngeal swabs, serum, LC-MRM/MS method

Numerous reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) or ELISA assays have emerged over the past year as the gold standard for detecting millions of cases of SARS-CoV-2 reported daily worldwide or for studying the response of the human body to the virus infection. For example, several authors have developed methods based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to confirm the potential of the technique to detect two major proteins, the spike (S) and the nucleoprotein (N) of COVID-19 [1-2]. In the present work, an S-Trap mini spin column digestion protocol was recently developed for sample preparation prodromal to LC-MS/MS analysis in multiple reactions monitoring (MRM) ion mode to obtain a comprehensive method capable of detecting different viral proteins [3] or a panel of proteins involved in the virus response (paper in progress) (Figure 1A and AB).

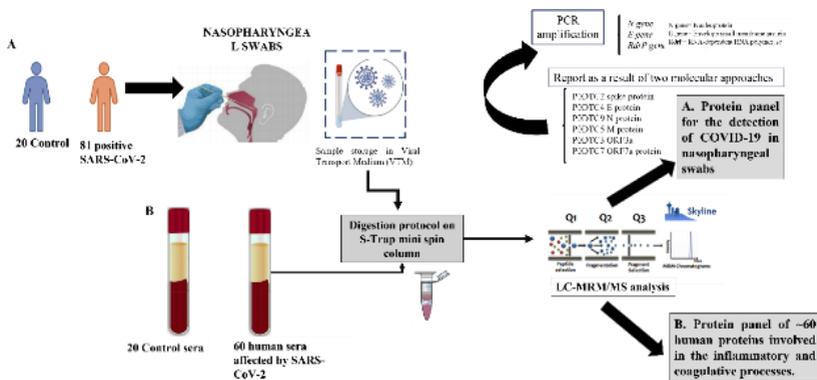


Figure 1: workflow for the detection of viral proteins in nasopharyngeal swabs (panel A) and human proteins in sera of patients affected by SARS-CoV-2 pathology (panel B).

The developed method was applied to n. 81 oro/nasopharyngeal swabs submitted in parallel to quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) assays to detect RdRP, the S and N gene specific for COVID-19, and the E gene for all Sarbecoviruses, including SARS-CoV-2 (with cycle negativity threshold set to 40) (Figure 1A). A total of 23 peptides representative of the six specific viral proteins were detected by monitoring 128 MRM transitions. Moreover, a panel of roughly 60 proteins involved in the inflammatory proteins and coagulation factors was monitored in 60 human sera affected by SARS-CoV-2 and compared with control sera (Figure 1B). Among the monitored proteins, 65% were significantly dysregulated whereas 40% were involved in the inflammatory response, 20% in the coagulation cascade, and 40% in positive chemotaxis.

The targeted MRM approach offers the possibility to monitor by molecular sequencing a wide panel of viral proteins, including derived variants, or of any human serum protein involved in the response to pathogens, with good sensitivity and specificity.

References

[1] Van Puyvelde B., Van Uytvanghe K., et al. Cov-MS: A Community-Based Template Assay for Mass-Spectrometry-Based Protein Detection in SARS-CoV-2 Patients. *ACS Au.* 2021, 1, 750–765.

[2] Bezstarosti K., Lamers M., Haagmans B., Demmers J.. Targeted Proteomics for the Detection of SARS-CoV-2 Proteins. *bioRxiv* 2020, 16, e0259165.

[3] Pinto G., Illiano A., Ferrucci V., Quarantelli F., Fontanarosa C., Siciliano R., Di Domenico C., Izzo B., Pucci P., Marino G., Zollo M., Amoresano A. *ACS Omega.* 2021, 6, 34945-34953.

EVOLOCUMAB TREATMENT, AN INHIBITOR OF PCSK9, IMPROVES VASCULAR OXIDATIVE STRESS AND ARTERIAL STIFFNESS OF HYPERCHOLESTEROLEMIC HIGH CARDIOVASCULAR-RISK SUBJECTS

Angela Punzo a*, Alessia Silla b*, Patrizia Simoni c, Aldo Roda a,d, Federica Fogacci c, Arrigo Cicero c and Cristiana Caliceti d,e.

a Department of Chemistry "G. Ciamician", University of Bologna, Bologna.

b Department for Life Quality Sciences, Rimini, University of Bologna.

c Department of Medical and Surgical Sciences, University of Bologna, Bologna.

d INBB, National Institute of Biostructures and Biosystems, Rome.

e Department of Biomedical and Neuromotor Sciences, University of Bologna, Bologna.

** These authors contributed equally to this work.*

Cardiovascular diseases (CVD) are the main cause of death worldwide with several conditions being affected by oxidative stress. High levels of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and the overproduction of reactive oxygen species (ROS) underlie the vascular inflammation and the development of CVDs. Therefore, to reduce LDL-C level, the novel drug Evolocumab which inhibit proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) has been recently introduced into the clinical practice. However, direct effects of this drug on vascular oxidative stress related to endothelial dysfunction have not been extensively described yet. This study aims to investigate possible vascular pleiotropic effects of Evolocumab that could act in concert with the LDL-C lowering. In this study, we evaluated twenty-one subjects (males 86%) with high or very high CV risk who experienced 2-month treatment with Evolocumab (140 mg every 2 weeks). The arterial stiffness was evaluated with carotid-femoral pulse wave velocity (PWV) and augmentation index (AIx). The expression of inflammatory and antioxidant genes in PBMCs was determined by qReal TimePCR. Oxidative stress was monitored through a rapid and simple effect-based chemiluminescent bioassay

for the detection of intracellular H₂O₂, based on the use of an adamantylidene - 1,2 - dioxetane probe containing an aryl boronate moiety [1]. In particular, the H₂O₂ production and the live intracellular CL emission induced by PMA, a pro-oxidant agent, was analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from the hypercholesterolemic subjects enrolled before and after treatment with Evolocumab. After 2 months of treatment, we observed an improvement in blood pressure (BP)-adjusted cfPWV (P-value= 0.044), which was associated with a decrease of H₂O₂ production from PBMCS (P-value < 0.001). Moreover, we observed a tendency to increase in the antioxidant heme-oxygenase 1 gene expression. Our data support the view of systemic oxidative stress involvement in hypercholesterolemic subjects and give further rationale for using Evolocumab to reduce cardiovascular disease risk independently of its serum LDL level lowering activity.

[1] Calabria, D., Guardigli, M., Mirasoli, M., Punzo, A., Porru, E., Zangheri, M., ... & Roda, A. *Anal Biochem.* 2020; 600, 113760.

This work was supported by PRIN 2017 (Prot. 2017Y2PAB8).

ANTIBODY-RESPONSIVE DNA-BASED DEVICES FOR DIAGNOSTIC AND DRUG-DELIVERY APPLICATIONS

Simona Ranallo,^{1,2} Daniela Sorrentino,¹ Sara Bracaglia,¹ Kevin W. Plaxco², Francesco Ricci¹

¹ *Department of Chemistry, University of Rome, Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133, Rome, Italy*

² *Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Santa Barbara, Santa Barbara, CA93106, United States*

Antibodies are considered among the most important clinically-relevant class of proteins and their detection and monitoring play a pivotal role not only in the diagnosis of a wide range of pathologies but also provides information on past infection and informs on clinical outcomes.¹ Current methods for the detection of antibodies are based on either multistep, wash-, or reagent intensive processes (i.e., ELISA) or on qualitative or semi-quantitative methods such as lateral flow immunoassays.² In addition to the importance of antibodies as disease markers, monoclonal antibodies are also gaining relevance as drugs in therapeutic settings for the treatment of a range of tumor types. Motivated by these considerations, the current and ongoing request for diagnostic tools that are rapid, inexpensive and quantitative to ensure appropriate care for patients is urgently needed. In this scenario, in the last years, by taking advantages from nucleic acid nanotechnology that employs synthetic nucleic strands (DNA and RNA) as engineering material, we and others reported a number of functional DNA-based devices and structures for diagnostic and drug-delivery applications. Due to their unique features of high programmability, low-cost, ease of synthesis, biocompatibility and chemical versatility, synthetic nucleic acids have been employed to develop programmable sensing nanodevices that may represent a powerful tool in nanomedicine. Specifically, the possibility to conjugate recognition elements of different nature on the backbone of DNA strands allows to expand the range of targets detected by nucleic acid-based devices. This appears

extremely relevant for the detection and recognition of different antibodies that can include as antigens small molecules, proteins and proteins' epitopes. For example, we first developed a nanometer-scale DNA machine that enable the one-step detection of mono and bivalent targets, including antibodies and provides an optical signal.³ Then, we engineered two different classes of nanomachines made of DNA and 20,000 times smaller than a human hair that can reversibly load and release a molecular cargo (i.e. anti-cancer drug) upon the binding of a target antibody.^{4,5} More recently, we have exploited the programmability of nucleic acid strands to design antibody-controlled DNA-based circuits that can be used to sense the presence of clinically-relevant antibodies⁶ and control the assembly/disassembly of DNA nanostructures in a controllable way.⁷ This strategy demonstrates the possibility to design nanostructures that can be built and destroyed in the presence of a specific biomarker and may have potential applications in the field of diagnostics and therapeutics. Finally, we are coupling the world of DNA nanotechnology with that of synthetic biology to develop a new class of cell-free biosensors that are emerging as innovative analytical devices with excellent sensitivities and specificities for the detection of macromolecular targets.⁸

[1] Robbins, A. *et al.*, *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 444.; [2] Gao, W. *et al.*, *Nature* **2016**, 529, 509–514. [3] Ranallo *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13214. [4] Ranallo *et al.*, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15150. [5] Rossetti *et al.*, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 914. [6] Ranallo *et al.*, *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 5509. [7] Bracaglia *et al.*, *ACS Sensors* **2021**, *6*, 2442. [8] Patino *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2022**, *144*, 5820.

A CASE-CONTROL STUDY: ANALYSIS OF TRACE ELEMENTS IN SPUTUM AS BIOMARKERS OF IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS AND FUTURE ANALYSIS

Angela Sabalic¹, Andrea Pisano¹, Cristiano Farace¹, Federica Etzi¹, Grazia Fenu¹, Roberto Madeddu¹.

Department of Biomedical Science - Histology, University of Sassari, Sassari, Italy

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic and progressive lung disease, characterized by inflammation and the aberrant accumulation of fibrotic tissue in the lung's parenchyma. IPF generally occurs after 60 years of age, predominantly in men than women. The survival rate is of 3-5 years after diagnosis. Nowadays the underlying causes of the disease are unknown, several epidemiological studies have demonstrated that environmental exposures, such as cigarette smoking and metals, are involved in IPF pathogenesis. [1] [2]

In this scenario, we set up a case-control study, by analyzing the trace elements levels (Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn) by the inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), in sputum of a 31 IPF patients' cohort, 31 non- IPF patients and 30 healthy controls that live in Sardinia (Italy).

Results showed IPF patients had a significant concentration increase of Cd, Cr, Cu, and Pb in sputum than healthy controls. Cu/Zn ratio, Fe/Mn ratio, and Cu/Mn ratio resulted significantly increased in IPF patients, like in non-IPF patients than control subjects. Moreover, lead levels were found higher in IPF cases than in non-IPF patients (as COPD, pulmonary cancer, asthma, emphysema, tuberculosis and bronchiectasis) while Zn levels were positively correlated with the severity of IPF. The analysis suggesting also a possible gender role in the disease, some trace elements are detected only in males than females. [3]

To study the trace element's involvement at the sub-cellular level, we will analyze the same samples cohorts with the transmission electron microscope (TEM). The main aim is to detect the cell's malformations that could contribute to fibrosis development. Moreover, this analysis could make it possible to distinguish cellular malformations typical of IPF patients from patients with other pulmonary disease-non IPF. The preview data obtained by ICP-MS showed a clear increase in the trace element concentration in IPF patients and non-IPF patients than the healthy controls. TEM analysis could further strengthen this data. In addition, the search for trace elements in sputum is a non-invasive test representing an advantage for the patient and the clinician.

References

- [1] Glass DS, Grossfeld D, Renna HA, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment. *Clin Respir J.* 2022;16(2):84-96. doi:10.1111/crj.13466
- [2] Sgalla G, Biffi A, Richeldi L. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis, epidemiology and natural history. *Respirology.* 2016;21(3):427-437. doi:10.1111/resp.12683
- [3] Forte G, Bocca B, Pisano A, et al. The levels of trace elements in sputum as biomarkers for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chemosphere.*2021;271:129514.doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129514

QUANTITATIVE DETERMINATION OF BPA AND ITS CONGENERS IN FOOD MATRICES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS SPECTROMETRY

Marica Erminia Schiano,¹ Federica Sodano,¹ Chiara Cassiano,¹ Ferdinando Fiorino,¹ Serenella Seccia,¹ Maria Grazia Rimoli ¹ and Stefania Albrizio ^{1,2}

1 Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy

2 Interuniversity Consortium INBB, Rome, Italy

maricaerminia.schiano@unina.it

Bisphenol A (BPA) is a phenolic plasticizer used in the manufacture of many plastic items [1]. The adverse effects caused by BPA on ecosystem stability and human health have been widely demonstrated; BPA is involved in diseases affecting the male and female reproductive systems, metabolic disorders, cancer, immune system alterations, developmental and mental disorders, and microbiota alterations [2]. Environmental contamination of BPA occurs during the processing stages of polymers used in the production of food contact materials and items. To comply with the BPA ban, the industry is currently identifying chemical analogs as possible alternatives to replace BPA in various applications. These include Bisphenol F (BPF), Bisphenol B (BPB) and Bisphenol S (BPS). However, recent literature has highlighted the risks associated with exposure to BPA substitutes, which share structural similarities and exhibit comparable physicochemical and toxicological profiles [3]. Two surveys were conducted to monitor the intake of BPA, BPB, BPF and BPS in the Italian population through the consumption of canned legumes and vegetable beverages. Twenty-three samples of canned legumes and thirty-four samples of vegetable beverages from popular brands marketed in Italy were analyzed. Different analytical procedures were developed for each food matrix. Canned legumes were homogenized, freeze-dried and finally subjected to solid-liquid extraction of the analytes. Vegetable beverage samples were first treated with methanol and then centrifuged.

The supernatant was loaded onto a Strata-X PRO cartridge to extract the analytes of interest. After samples preparation, quantitative analysis by ultra-high-pressure-liquid-chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry with an ESI source was performed. Regarding canned legumes, BPA was found in 91 % of the samples in the range of 1.51 - 21.22 ng mL⁻¹, while BPB, BPS and BPF were not detected in any samples. Concerning vegetable beverages, BPA was found in 30 % of the samples in the range of 1 - 18.70 ng mL⁻¹, while BPB was found in 3 % of the samples at the concentration of 5.17 ng mL⁻¹. The risk assessment for both food matrices was carried out using the Rapid Assessment of Contaminant Exposure (RACE) tool promoted by the European Food Safety Authority (EFSA). The results of this assessment showed that there was no risk for all population groups, considered in RACE, when the current TDI of 4 ng kg⁻¹ body weight per day⁻¹ was used as the toxicological reference point. In contrast, using the new TDI of 0.04 ng kg⁻¹ body weight per day⁻¹, recommended by EFSA in December 2021, the existing risk was found to be real for all population groups.



[1] S. Vogel. *Am. J. Public Health*. 2009, 99, 559-566. [2] J.B. Hansen, *et al.*. *J. Environ. Health*. 2021, 20, 1–12. [3] A. Usman, *et al.* *Toxicol Lett.*, 2019, 312, 222-227.

ANANDAMIDE DRIVES TUMOR GROWTH AND METASTASIS IN A ZEBRAFISH HCT116 XENOGRAFT MODEL

Fiorenza Sella¹, Camilla M. Fontana¹⁻⁴, Christian Giommi¹, Nicola Facchinello², Chiara Rampazzo², Micol Caichiolo², Seyed Hossein Hoseinifar³, Luisa Dalla Valle², Hien Van Doan⁴, Francesca Maradonna¹, Oliana Carnevali¹

1. Department of Life and Environmental Sciences, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy

2. Department of Biology, University of Padova, Padova, Italy;

3. Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran;

4. Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand

5 INBB - Consorzio Interuniversitario di Biosistemi e Biostrutture, 00136, Roma, Italy.

Email: fiorenza.sella@gmail.com

Colon cancer is one of the most frequent causes of death in the world population. A correct cancer diagnosis is essential for appropriate and effective treatments. In this contest, in recent years, attention moved to the endocannabinoid system (ECS), being one of the players either in the control of tumorigenesis and in the immune response modulation. As result, cannabinoids, including anandamide (AEA) have been studied for their potential anticancer effects. Thus, in this study, AEA ability to block cell growth and induce cancer cell death was investigated. Previous *in vitro* studies revealed that AEA can either affect tumor microenvironment and metastatic processes. Concerning this, the aim of the present study was to investigate the effects of AEA on the control of the proliferation of HCT116 cancer cells transplanted in zebrafish larvae. Xenografts were exposed to 10 nM AEA, 10 nM AM251, one of cannabinoid 1 receptor (CB1) antagonist / inverse agonist and AEA+AM251, to verify the specific effect of AEA treatment. The efficacy of AEA exposure was evaluated

by confocal microscopy which evidenced that xenografts presented a smaller tumor size, reduced tumor angiogenesis, and lacked micrometastasis formation. To gain deeper knowledge on the effect of AEA action, microscopic observations were completed by molecular analyses (RNA seq, qPCR and Western blot allowing the study of the biomarkers involved in the regulation of tumor proliferation. The results obtained by analyzing the levels of *vegfc*, VEGF-C and *vegfd* supported the hypothesis of the antitumoral effect of AEA, while those of LC3A/B and CASP3 suggested a marginal role of AEA on autophagy and apoptosis during tumor proliferation. RNAseq performed on zebrafish transcriptome reported the downregulation of a set of genes involved in cell proliferation, angiogenesis, and immune system functions. At the same time, HTC116 cell transcriptome resulted not affected by AEA treatment and no differences were seen among experimental group transcripts. The results confirmed that AEA exposure did not directly affect tumor cell proliferation and viability, but the reduced tumor size mainly depends on a direct effect on the host as supported by *socs3* and *pcnp* mRNA, involved in cell proliferation and tumor angiogenesis as well as the transcription of the genes belonging to immune system such as *il-11a*, *mhc1uba* and *csf3b*, involved in anti-inflammatory processes. In conclusion, this study demonstrates the positive role of AEA in cancer therapy, affecting tumor growth and metastasis *in vivo*, using zebrafish as animal model.

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE DI INQUINANTI DI ORIGINE FARMACEUTICA IN ACQUE REFLUE TRATTATE TRAMITE FITODEPURAZIONE

Federica Sipala

Dip. Scienze del Farmaco - Univ. Catania

Negli ultimi tempi la disponibilità e la qualità dell'acqua sono soggette a una duplice sfida: quella posta dal cambiamento climatico, soprattutto nelle aree a ridotta piovosità, e quella derivante dall'inarrestabile tendenza all'urbanizzazione [1]. I tradizionali impianti di depurazione delle acque reflue, efficienti per le tipologie tradizionali di contaminanti o per le esigenze specifiche di industrie, attività agricole o zootecniche, ospedali, fognature urbane, sono sempre più inadeguati per i cosiddetti microinquinanti emergenti, sostanze chimiche rinvenute nelle matrici ambientali e non ancora sottoposte a regolamentazione presenti nell'ordine dei nanogrammi o dei microgrammi [2]. Il problema è ancora più accentuato se, in un'ottica di economia circolare, si cerca di perseguire politiche di riutilizzo dell'acqua depurata per usi potabili, agricoli, energetici, ecc. e lo stesso vale per l'eventuale utilizzo dei fanghi al fine di ridurre il crescente uso di fertilizzanti chimici [3,4]. I sistemi integrati di fitodepurazione per le loro adeguate capacità dimensionali possono costituire una possibile soluzione per consentire il riutilizzo a fini diversi delle acque depurate in specifiche aree a destinazione integrata (agricole, ecc.) [5]. In particolare, nelle zone a ridotta piovosità, questi sistemi possono rappresentare una valida alternativa per la depurazione delle acque reflue urbane al fine della loro riutilizzazione ad uso irriguo [6]. Tuttavia, gli studi volti a valutare la capacità di queste piante di rimuovere microinquinanti emergenti, inquinanti di tipo farmaceutico, sostanze d'abuso e interferenti endocrini sono limitati e non sufficienti per una valutazione complessiva della bontà di depurazione di questi nuovi sistemi. In particolare, la presenza di

questi nuovi microinquinanti è difficile da valutare, data la bassa concentrazione e la difficoltà dei metodi di analisi applicabili. L'obiettivo del progetto è quello di valutare l'efficienza della fitodepurazione nei confronti di alcuni inquinanti di origine farmaceutica nei reflui, al fine di limitare la loro presenza nelle acque superficiali e sotterranee e tutelare di conseguenza la qualità ambientale, ma anche per valutare il possibile utilizzo agricolo di queste acque. In particolare, sono stati valutati interferenti endocrini, metaboliti di sostanze d'abuso e metaboliti farmaceutici generici. Tramite l'utilizzo di una strumentazione UHPLC-MS/MS, sono stati analizzati diversi campioni di acque reflue, prelevati nei pressi di un noto centro commerciale della provincia di Catania. Ciascuno dei campioni è stato prelevato con diverso grado di depurazione al fine di quantificare l'efficacia di tale tecnica depurativa

1. Tundisi, J. G., et al., *Water availability, water quality water governance: the future ahead Proc. IAHS*, 366, 75–79, <https://doi.org/10.5194/piahs-366-75-2015>, 2015. 2. Tartari G. et al., *Inquinanti Emergenti. Lombardy Energy Cleantech Cluster*, 2020, 249 pp. 3. De Santiago-Martin A., et al., *Pharmaceuticals and trace metals in the surface water used for crop irrigation: Risk to health or natural attenuation? Science of The Total Environment*, 2020, 705 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135825> 4. Yang Y., et al., *Which Micropollutants in Water Environments Deserve More Attention Globally? Environmental Science & Technology* 2022 56 (1), 13-29 doi: 10.1021/acs.est.1c04250 5. Riva V., et al., *Microbial assisted phytodepuration for water reclamation: Environmental benefits and threats, Chemosphere*, 2020, Volume 241, 124843, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124843>. 6. Petroselli A., et al., *Integrated system of phytodepuration and water reclamation: A comparative evaluation of four municipal wastewater treatment plants, 2017 International Journal of Phytoremediation*, 19:6, 563 571, DOI: 10.1080/15226514.2016.1267702

MICROWAVE- AND ULTRASOUND-ASSISTED SYNTHESIS OF DM1 AND DM2: APPLICATION AND OPTIMIZATION, IN SILICO STUDIES, AND EVALUATION OF THEIR ANTI-ABSENCE ACTIVITY IN VITRO AND IN VIVO

Federica Sodano

Department of Pharmacy, University of Naples Federico II, Naples, Italy

Microwave- and ultrasound-assisted molecule synthesis has become an imperative for medicinal chemists [1], especially when it is necessary to prepare molecules with high therapeutic potential and multiple pharmacological activities, such as imidazo[1,2-b]pyridazine derivatives. In our previous work, 7-methyl-2-phenylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-carboxylic acid (DM1) and 6-methoxy-2-phenylimidazo[1,2-b]pyridazin-3-carboxylic acid (DM2) have been shown to be potent anti-absence drugs capable of suppressing seizures in WAG/Rij rat as a model of absence epileptogenesis, by blocking one of the three T-type voltage-dependent calcium channel isoforms, specifically Cav_{3.1} [2]. To corroborate abovementioned pharmacological data and to further investigate the promising biological activity of DM1 and DM2, both compounds were re-prepared by 'greening' our conventional procedures reported in the literature [3].

The main objective of the present work was the application and optimization of MW and US for the synthesis of DM1 and DM2. Specifically, a comparative study was carried out between the two green synthetic methodologies and conventional thermal irradiation to improve reaction yields and save time as well. One-pot synthesis of DM1 and DM2 was also attempted to minimize costs and reduce emissions and waste associated with the synthesis process.

Following, DM1 and DM2 were evaluated in DBA/2 mice with seizures induced by audiogenic stimuli. Since seizure activity involves the generation of reactive oxygen species (ROS), which contribute to seizure-induced neuronal damage and cell death, the neuroprotective

effect of DM1 and DM2 on oxidative stress was investigated in C6 rat brain glioma cells. Furthermore, the putative binding mode of DM1 and DM2 to human Cav_{3.1} channels were explored by using an integrated computational approach based on the combination of empirical and density functional theory calculations with bioinformatics analysis and docking studies.

To sum-up, irradiation by US versus MW favored the synthesis of DM1 and DM2 in terms of yield and reaction time. In the case of the one-pot synthesis, the yields were not satisfactory, even by varying the reaction solvent, so it is necessary to proceed following the two reaction steps. Biologically, DM1 and DM2 significantly reduced ROS production *in vitro*, indicating their possible efficacy in maintaining cellular redox homeostasis during seizure activity. Significant dose-dependent protection against the tonic phase of the audiogenic convulsive response was also observed *in vivo*, 30 min after intraperitoneal administration of different doses (5-30 mg/kg) of DM1 and DM2. Finally, computational studies allowed to identify the putative binding site of DM1 and DM2 in the central cavity of the pore domain of the Cav_{3.1} channel and to model the ligand/protein interaction complex, disclosing the ability of our compounds to reproduce the binding mode of the Cav₃-selective blocker Z944 [4].

[1] A. Pawełczyk, A. *et al.* *Molecules*. 2018, 23, 2360. [2] M. G. Rimoli, *et al.* *Neuropharmacology*. 2009, 56, 637-646. [3] E. Abignente, *et.* *Farmaco*. 1990b, 45, 1075–1087. [4] Y. Zhao, *et al.* *Nature*. 2019, 576, 492-497.

IL METODO ALTERNATIVO *MICRO BIOLOGICAL SURVEY* PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEI TRATTAMENTI DI LAVAGGIO ED ASCIUGATURA DI CAMPIONI DI *LATTUGA SATIVA*

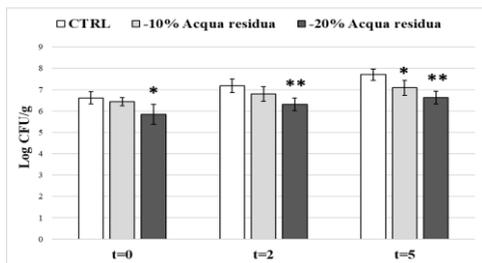
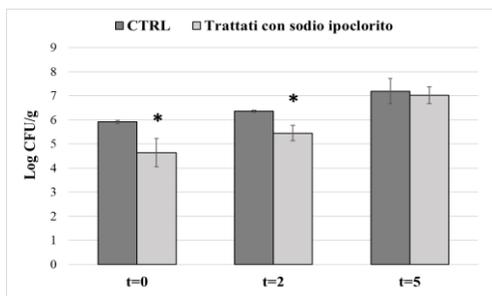
Federica Tomassetti, Alyexandra Arienzo, Valentina Gallo e Giovanni Antonini

Dipartimento di Scienze, Università Roma Tre e Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi

Lo sviluppo di metodiche alternative microbiologiche rapide, sensibili, specifiche ed economiche, in grado di fornire risultati affidabili, possibilmente in assenza di laboratorio, è un ambito di forte interesse per il settore agroalimentare. Il metodo *Micro Biological Survey* (MBS) è un sistema colorimetrico rapido per la rilevazione e la conta selettiva dei microrganismi in campioni alimentari [1]. Nel nostro lavoro il metodo MBS è stato applicato per la valutazione dell'efficacia dei trattamenti post-raccolta di insalate di I gamma e della qualità microbiologica degli stessi campioni durante il periodo di conservazione, simulando un imballaggio industriale [2]. Obiettivo di questo lavoro è stata la valutazione dell'effetto di diversi trattamenti di lavaggio ed asciugatura sulla qualità microbiologica di campioni di *L. sativa* e del loro impatto sulla conservazione dei suddetti campioni. I dati ottenuti mostrano come il trattamento con ipoclorito di sodio è in grado di ridurre significativamente i livelli di contaminazione microbica solo immediatamente dopo il trattamento ma non per tutta la durata di conservazione; la quantità di acqua residua ha mostrato avere invece un impatto significativo sui livelli medi di contaminazione per tutta la durata del periodo di conservazione, nonché sulla qualità organolettica dei prodotti (consistenza, colore). In entrambi gli studi il metodo MBS è risultato un metodo accurato per valutare i parametri testati ed è stato quindi proposto come una soluzione efficace per le industrie agroalimentari per monitorare

l'efficienza dei trattamenti direttamente *in situ* e garantire prodotti sicuri e di qualità superiore.

Contaminazione media (TAMC) dei campioni di *L. sativa* non trattati e trattati con ipoclorito di sodio a diversi tempi di conservazione, valutati con il metodo MBS.



Contaminazione media (TAMC) dei campioni di *L. sativa* sottoposti a diversi trattamenti di asciugatura a diversi tempi di conservazione, valutati con il metodo MBS.

Referenze:

[1] Bottini G, Losito F, De Ascenti A, Priolisi FR, Mari A and Antonini G. 2011. Validation of the Micro Biological Survey Method for Total Viable Count and *E. coli* in Food Samples. *American Journal of Food Technology*, 6: 951-962.

[2] Arienzo A, Gallo V, Tomassetti F, and Antonini G. Effect of different washing and drying treatments on microbiological quality and shelf-life of fresh-cut *Lactuca sativa*. Manuscript in preparation

