

REPORT FINALE PER LA BORSA DI STUDIO

“PROF. GIOVANNI ORLANDINI”

SIAI - SOCIETÀ ITALIANA DI ANATOMIA E ISTOLOGIA

PRESENTATO DA: IRENE NERI

Titolo del progetto: “Effetti della carenza di timidina fosforilasi (TP) sull'anatomia e sulla funzione del sistema vascolare e nervoso enterico”

Periodo di svolgimento: 8 Gennaio 2024 – 3 Agosto 2024

Luogo: Zweibrücken, Germania

Università: Hochschule Kaiserslautern, Campus Zweibrücken

Gruppo di lavoro: ENS Workgroup guidato dal Prof. Karl-Herbert Schäfer

OBIETTIVO DEL PROGETTO

Il progetto si è concentrato sullo studio degli effetti della carenza di timidina fosforilasi (TP) sui neuroni enterici, con particolare attenzione all'analisi dello sviluppo morfologico dei rami neuronali e alla successiva indagine sui cambiamenti nella comunicazione cellulare. TP è un enzima coinvolto nel metabolismo dei nucleotidi e ha un ruolo significativo nell'angiogenesi, potenzialmente influenzando il sistema nervoso enterico (ENS). Questa ipotesi è stata formulata in seguito ai dati ottenuti sull'Encefalomiopatia NeuroGastroIntestinale Mitocondriale (MNGIE), ma soprattutto sulla Pseudo-Ostruzione Intestinale Cronica (CIPO), condizioni in cui la carenza di TP è stata associata a danni vascolari e neuronali intestinali, con rilevanti cambiamenti micro-anatomici e perdita neuronale.

ATTIVITÀ SVOLTE E METODOLOGIE UTILIZZATE

Durante il progetto sono state svolte le seguenti attività:

1. **Silenziamento di TP tramite siRNA** in cellule endoteliali murine (bEND3) e valutazione dell'efficacia di silenziamento tramite qPCR e western blot




2. **Isolamento di colture primarie di cellule nervose enteriche (ENC)** dal plesso mienterico di topi post-natali e trattamento per 72 ore con il secretoma delle cellule endoteliali silenziate.
3. **Analisi morfologica e funzionale delle ENC** tramite live imaging, immunofluorescenza e misurazioni dell'attività neuronale acuta e cronica.
4. **Creazione di organoidi epiteliali intestinali (enteroidi)** per studiare l'impatto del secretoma delle cellule endoteliali silenziate sulla proliferazione cellulare, analizzando l'espressione di Ki-67.

RISULTATI

1. **Disgregazione della rete neuronale nelle colture ENC:** L'esposizione delle colture ENC al microambiente carente di TP ha portato alla disgregazione della rete neuronale e all'aumento del numero di cellule non neuronali, evidenziato dalla presenza di nuclei al di fuori della rete neurale.
2. **Proliferazione di cellule gliali e fibroblasti:** Nelle ENC esposte al microambiente carente di TP per 72 ore, è stato osservato un aumento del numero di cellule gliali (+735%) e fibroblasti (+96%), mentre il numero di neuroni non è stato significativamente influenzato. Ciò suggerisce che la carenza di TP promuove la proliferazione di componenti non neuronali nelle colture ENC.
3. **Gonfiore neuronale e aumento della produzione di nNOS nelle ENC:** Le ENC esposte al microambiente carente di TP hanno mostrato un gonfiore neuronale (+89% nelle dimensioni medie dei corpi cellulari) e un aumento significativo dei livelli di nNOS (+565%), marcatori associati a stress neuronale. I livelli di GFAP, invece, non sono risultati significativamente influenzati.
4. **Effetto progressivo nel tempo:** L'analisi dei marcatori a 24 e 48 ore dopo l'esposizione ha rivelato una modulazione progressiva degli effetti. Ad esempio, l'aumento delle dimensioni dei corpi neuronali è progredito da +29% a 24 ore, +49% a 48 ore fino a +89% a 72 ore. Ciò suggerisce che l'esposizione a lungo termine a un microambiente carente di TP potrebbe portare a cambiamenti significativi nella morfologia neuronale.
5. **Attività neuronale aberrante nelle ENC:** Le registrazioni dell'attività neuronale tramite MEA hanno mostrato che il trattamento acuto delle ENC con il secretoma delle cellule endoteliali silenziate ha portato a un aumento significativo dell'attività neuronale (+200%), mentre l'esposizione cronica per 24 ore ha causato una perdita completa dell'attività (burnout). Questo suggerisce che una prolungata esposizione a TP-silenziamento può portare a una disfunzione irreversibile dell'attività neuronale.



Handwritten signature or mark in the bottom right corner.

6. **Profilo infiammatorio nel supernatante delle ENC trattate:** È stata rilevata una modulazione significativa di 11 fattori infiammatori nel supernatante delle ENC esposte al microambiente carente di TP, con un aumento di citochine pro-infiammatorie come IFN γ , IL6, IL7, e una riduzione di TIMP-1, una molecola anti-infiammatoria. Questo indica che la carenza di TP potrebbe indurre uno stato infiammatorio nelle colture ENC.
7. **Riduzione della proliferazione negli enteroidi:** Gli enteroidi esposti per 5 giorni al microambiente carente di TP hanno mostrato una riduzione del 47% nella proliferazione, evidenziata dalla diminuzione dell'espressione di Ki-67. Ciò suggerisce che la carenza di segnali derivati dalle cellule endoteliali con TP-silenziamento può compromettere la rigenerazione e la funzionalità dell'epitelio intestinale.

CONCLUSIONI

Il progetto ha dimostrato che la carenza di TP nelle cellule endoteliali influenza profondamente la morfologia e la funzione del sistema nervoso enterico. In particolare, i risultati ottenuti suggeriscono per la prima volta un possibile meccanismo di azione per spiegare la perdita neuronale osservata in MNGIE e CIPO, attraverso l'induzione di stress neuronale, infiammazione e alterazioni nella comunicazione cellulare. Questi risultati forniscono una base per ulteriori studi sul ruolo della TP nelle interazioni neuro-vascolari e sui meccanismi di stress e infiammazione associati alla carenza di TP. I risultati ottenuti hanno inoltre consentito la futura stesura di un articolo scientifico, la cui sottomissione è prevista entro l'anno solare.

CONSUNTIVO DELLE SPESE SOSTENUTE

- **Spese di viaggio:** €500
- **Spese di affitto:** €4.900
- **Spese di costo della vita:** €2.800

