

# REPORT ATTIVITÀ 2024

## INDICE

L'istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS	pag 03
Struttura e organigramma	pag 05
Organizzazione delle attività di ricerca	pag 06
Relazione sulle principali attività di ricerca dell'Istituto Mario Negri	pag 25
Selezione pubblicazioni scientifiche 2024	pag 129
Attività formative 2024	pag 153

---

**Sede Legale**  
Mario Negri Milano  
Via Mario Negri, 2 - 20156 Milano  
Tel. +39 02 390141  
mnegri@marionegri

**Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie  
Rare "Aldo e Cele Daccò"**  
Villa Camozzi  
Via G.B. Camozzi, 3 -24020 Ranica (BG)  
Tel. +39 035 45351  
villacamozzi@marionegri.it

**Centro Anna Maria Astori**  
Parco Scientifico Tecnologico  
Kilometro Rosso  
Via Stezzano, 87 - 24126 Bergamo  
Tel. +39 035 42131  
bergamo@marionegri.it

[marionegri.it](http://marionegri.it)

## L'ISTITUTO DI RICERCHE FARMACOLOGICHE MARIO NEGRI IRCCS

L'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri è un'organizzazione scientifica che opera nel campo della ricerca biomedica.

È stato costituito giuridicamente nel 1961 e ha iniziato le attività nella sede di Milano il 1° febbraio 1963.

### **Scopo fondamentale delle attività dell'Istituto è contribuire alla difesa della salute e della vita umana.**

Per realizzare tale obiettivo, occorre anzitutto approfondire la comprensione dei meccanismi di funzionamento degli organismi viventi, individuare le ragioni per cui insorgono le malattie, conoscere i processi che si sviluppano negli organismi stessi in seguito all'introduzione di sostanze estranee: è in questo senso che si sviluppano le ricerche dell'Istituto, dal livello molecolare fino all'individuo e alle popolazioni.

I risultati che ne emergono servono sia per la messa a punto di nuovi farmaci che per accrescere l'efficacia di quelli già in uso.

### **Le aree di ricerca**

I principali settori in cui l'Istituto è impegnato sono:

- la lotta contro il cancro
- le malattie nervose e mentali
- le malattie del cuore e dei vasi sanguigni
- le malattie renali
- i trapianti
- le malattie rare
- la salute pubblica
- gli effetti tossici delle sostanze che inquinano l'ambiente
- la lotta contro il dolore
- lo studio delle droghe
- la salute materno-infantile
- la valutazione dell'appropriatezza dell'uso dei farmaci
- la nutrizione come determinante di salute e fattore di sostenibilità ambientale
- tutela e sostegno al Servizio Sanitario Nazionale

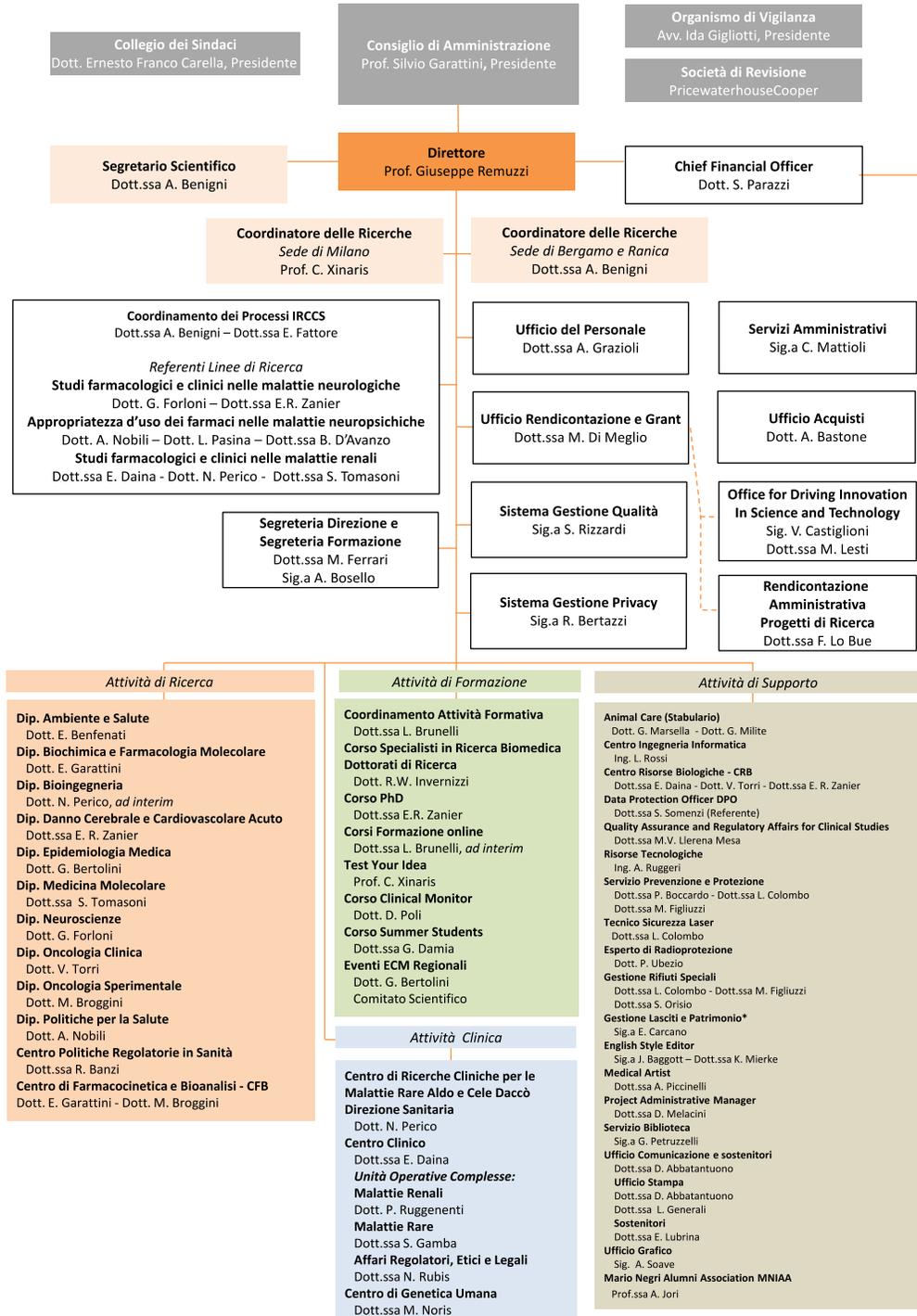
## **La formazione e la diffusione della cultura scientifica**

Oltre alla ricerca scientifica, l'Istituto svolge anche l'attività di insegnamento per la formazione professionale di tecnici di laboratorio e di ricercatori laureati, conferendo degli attestati di qualificazione professionale e dei diplomi di dottorato di ricerca in collaborazione con il MIUR, di PhD in collaborazione con la Open University (UK).

L'istituto contribuisce con molteplici iniziative alla diffusione della cultura scientifica in campo biomedico, sia allo scopo di migliorare la pratica sanitaria sia per l'uso più appropriato dei farmaci.

# STRUTTURA E ORGANIGRAMMA

## ORGANIGRAMMA



## ORGANIZZAZIONE ATTIVITA' DI RICERCA

L'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS è organizzato in:

10 Dipartimenti:

- 8 presso la sede di Milano
- 2 presso la sede di Bergamo

1 Centro di Ricerche Cliniche presso la sede di Ranica

4 Centri studi

Segue l'elenco dei dipartimenti:

1. Dipartimento di Ambiente e Salute
2. Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare
3. Dipartimento di Bioingegneria
4. Dipartimento di Danno Cerebrale e Cardiovascolare Acuto
5. Dipartimento di Medicina Molecolare
6. Dipartimento di Neuroscienze
7. Dipartimento di Oncologia Clinica
8. Dipartimento di Oncologia Sperimentale
9. Dipartimento di Epidemiologia Medica
10. Dipartimento di Politiche per la Salute

Il Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare è organizzato

- a. Centro di Ricerche Cliniche
- b. Centro di Genetica Umana

I Centri studio sono:

1. Centro Politiche Regolatorie in Sanità
2. Centro di Spettrometria di Massa per la Salute e l'Ambiente afferente al Dipartimento di Ambiente e Salute
3. Centro di Studi di Politica e Programmazione socio-sanitaria
4. Centro SLA afferente al Dipartimento di Neuroscienze

## **DIPARTIMENTO DI AMBIENTE E SALUTE**

### **Capo Dipartimento: Emilio Benfenati**

Il Dipartimento si occupa di identificare e prevenire l'effetto negativo dei fattori ambientali sulla salute.

In particolare, si dedica a identificare l'esposizione della popolazione alle sostanze chimiche e a valutarne il rischio utilizzando studi di tossicità, su uomo e specie ambientali, utilizzando tecniche in silico e in vitro, di spettrometria di massa e di epidemiologia. Inoltre, si sviluppano strategie per ridurre gli impatti, anche attraverso la sostituzione delle sostanze che possono risultare maggiormente a rischio. Sono studiati anche gli effetti dei farmaci nell'ambiente, in particolare legati all'antibiotico resistenza e i consumi di droghe di abuso ed altre sostanze, attraverso la loro identificazione e misura nelle acque reflue urbane.

### **Obiettivi**

- Misurare le emissioni di inquinanti di origine antropogenica (inquinamento atmosferico, rifiuti, sostanze in alimenti, etc.) e valutarne l'effetto sulla salute individuando strategie per minimizzarne l'impatto
- Identificare, misurare e valutare l'impatto sulla salute dei consumi di inquinanti da processo presenti negli alimenti
- Identificare, quantificare e prevenire l'impatto di fattori ambientali sulla salute, in particolare l'esposizione a fumo di tabacco riscaldato, vapore delle sigarette elettroniche, sostanze chimiche, alcol e stili di vita, inclusi l'alimentazione e i nutrienti come fattori di rischio per lo sviluppo di malattie croniche
- Studiare i meccanismi molecolari alla base di malattie umane e dell'invecchiamento attraverso l'identificazione di alterazioni del proteoma e del metaboloma indotte da stati patologici considerando anche molecole di derivazione alimentare ed ambientale
- Sviluppare modelli in silico e in vitro a supporto della valutazione del rischio tossicologico ed ecotossicologico causato da sostanze chimiche, farmaci, cosmetici e sostanze negli alimenti per promuovere l'individuazione di alternative più sostenibili indagando aspetti tossicologici quali cardiotoxicità, nefrotossicità ed epatotossicità, ecotossicologici o le proprietà cinetiche tramite l'uso di algoritmi avanzati quali machine learning e intelligenza artificiale
- Applicare l'approccio "epidemiologia delle acque reflue" (wastewater-based epidemiology), per identificare abitudini potenzialmente pericolose per la salute umana quali il consumo di droghe d'abuso, nicotina, alcool, e farmaci nella popolazione misurando specifici marcatori metabolici nelle acque di scarico urbane
- Sviluppare nuove applicazioni dell'"epidemiologia delle acque reflue" per studiare indici dello stato di salute della popolazione quali la diffusione del virus SARS-CoV-2 e di

resistenza agli antibiotici e valutare l'esposizione della popolazione a contaminati del cibo ed ambientali

- Studiare il destino ambientale di inquinanti emergenti (farmaci, prodotti per la cura personale, disinfettanti, plasticizzanti, perfluorati, prodotti industriali) in matrici acquose come acque reflue, di superficie e di falda, e matrici solide come fanghi di depurazione, letame, suoli e biota al fine di identificare potenziali rischi per la salute umana e supportare gli interventi legislativi;
- Sviluppare tecniche avanzate di spettrometria di massa (imaging) per studiare la penetrazione di farmaci antitumorali negli xenotrapianti di tumori, lo studio del farmacometabolismo e del metabolismo in generale in microambienti tissutali.

### **Laboratori**

1. Laboratorio Indicatori Epidemiologici Ambientali
2. Laboratorio Chimica e Tossicologia dell'Ambiente
3. Laboratorio di Metaboliti e Proteine nella ricerca

### **Unità di dipartimento**

Unità Valutazione di Rischio Ambientale e Nutrizionale

### **Centro di Ricerca “Spettrometria di Massa per la salute e l’Ambiente”**

Il Centro promuove e facilita, con le tecnologie di spettrometria di massa, una ricerca interdisciplinare per la salute e l’ambiente

## DIPARTIMENTO DI BIOCHIMICA E FARMACOLOGIA MOLECOLARE

### Capo Dipartimento: Enrico Garattini

La ricerca del Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare è mirata allo studio strutturale e funzionale di prodotti genici specifici e farmacologicamente rilevanti.

Uno degli obiettivi è l'identificazione di nuove proteine che potrebbero rappresentare dei bersagli per la terapia farmacologica.

Le potenziali interazioni tra farmaci e proteine sono studiate anche a livello molecolare, utilizzando un'ampia varietà di approcci che vanno dagli studi condotti sugli animali a simulazioni computazionali.

### Obiettivi

- Sviluppo di strategie farmacologiche efficaci mediante studi farmacologici e funzionali (farmacocinetica/farmacodinamica), riposizionamento dei farmaci, terapia con peptidi, approcci multiomici e machine learning nel processo di stratificazione dei pazienti, come elemento critico per l'implementazione della medicina personalizzata, nanoparticelle in nanomedicina e nanodiagnostica
- Sviluppo di nuovi agenti farmacologici in grado di modulare l'attività delle 15 proteine appartenenti alla famiglia dei recettori nucleari orfani al fine di sviluppare nuove strategie terapeutiche nell'ambito del trattamento personalizzato del cancro al seno e allo stomaco
- Identificazione di nuovi bersagli molecolari nell'ambito delle patologie mediate da proteine specifiche e identificate (malattie con base genetica e malattie causate da proteine con struttura aberrante)
- Identificazione di marcatori proteici in fluidi biologici, cellule, tessuti e vescicole extracellulari in pazienti e modelli animali
- Studi mirati al disegno di strategie terapeutiche mirate al trattamento della Sindrome di Cornelia de Lange, una rara e grave patologia che colpisce la popolazione pediatrica
- Studi mirati al disegno di strategie terapeutiche per miopatie correlate a SEPN1
- Studi preclinici sul coinvolgimento di ERO1A nei tumori al seno
- Studi preclinici su modelli di fibrosi polmonari ed epatica mirati al tropismo selettivo di steroidi nell'organo bersaglio o al rilascio controllato di acidi nucleici. Entrambi gli studi si avvarranno dell'apporto della nanomedicina per raggiungere gli obiettivi perseguiti.
- Impiego di una piattaforma integrata combinante nanomedicina e fototerapia per la penetrazione attraverso la barriera ematoencefalica e il rilascio di potenziali molecole terapeutiche nel SNC di topi sani e patologici.
- Valutazione dell'effetto di nanomateriali innovativi ad uso industriale e di nano- e micro-plastiche da sorgente ambientali associati a potenziali rischi per l'apparato respiratorio e digerente.

- Studio degli eventi molecolari che modulano il processo di amiloidogenesi in vivo, mediante l'uso del nematode invertebrato *C. elegans*
- Studio dei meccanismi responsabili dello sviluppo di amiloidosi sistemiche rare, come l'amiloidosi da catene leggere delle immunoglobuline e l'amiloidosi da gelsolina, per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche
- Impiego di una piattaforma tecnologica per l'identificazione di nuovi farmaci antivirali, tramite studi farmacologici in vitro e in vivo, e studi biochimici, biofisici e computazionali
- Studi sul ruolo dell'alimentazione sui processi di malattia e invecchiamento
- Studio delle alterazioni mitocondriali in condizioni patologiche e del trapianto mitocondriale come strategia innovativa per il recupero della funzionalità mitocondriale
- Studio dei meccanismi di internalizzazione e della localizzazione intracellulare di nanoparticelle per uso terapeutico
- Sviluppo di nuovi approcci analitici per la misurazione delle concentrazioni di anticorpi terapeutici e, soprattutto, dei corrispondenti anticorpi anti-farmaco nel sangue e applicazione a studi preclinici e clinici
- Implementazione di una piattaforma, basata su tecniche innovative di intelligenza artificiale e biotecnologiche, per la progettazione, produzione e validazione di miniproteine di interesse terapeutico/diagnostico
- Sviluppo e applicazione di saggi analitici per lo studio di farmaci, biomarcatori e biomolecole in generale. Tali studi riguardano sia aspetti farmacodinamici, con particolare attenzione alle interazioni molecolari, che aspetti farmacocinetici in vivo, sia a livello preclinico che clinico
- Sviluppo di una piattaforma completa, accessibile e standardizzata che fornisca le competenze, gli strumenti e le risorse necessarie in tutte le fasi del percorso di repurposing dei farmaci
- Gestione dei dati nelle scienze della vita per una ricerca preclinica robusta e riproducibile e per l'implementazione dei principi FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable)

## **Laboratori**

1. Laboratorio Biologia Molecolare
2. Laboratorio Patologia Umana in Organismi Modello
3. Laboratorio Trasduzione del Segnale
4. Laboratorio Farmacodinamica e Farmacocinetica
5. Laboratorio di Nanobiologia

## **DIPARTIMENTO DI BIOINGEGNERIA**

### **Capo Dipartimento: Norberto Perico**

Il Dipartimento di Bioingegneria svolge studi a livello sperimentale e clinico. All'interno del Dipartimento si studiano processi fisiopatologici mediante l'impiego di tecniche ingegneristiche e di elaborazione di immagini radio-diagnostiche, che rendono possibili analisi quantitative di strutture e processi biologici in vivo.

### **Obiettivi**

- Studiare i meccanismi coinvolti nella progressione delle nefropatie croniche
- Studiare la meccanobiologia delle cellule vascolari
- Studiare le alterazioni morfologiche ed emodinamiche in diversi distretti vascolari e il ruolo dell'emodinamica nello sviluppo del danno vascolare
- Studiare i meccanismi molecolari che determinano l'insorgere di stenosi negli accessi vascolari
- Studiare la citotossicità di micro e nanoparticolato derivante da sistemi frenanti
- Sviluppare tecniche di segmentazione e quantificazione di strutture anatomiche e lesioni patologiche su immagini diagnostiche in risposta a specifiche esigenze cliniche
- Identificare e validare nuovi biomarcatori di imaging
- Condurre la validazione clinica di nuove tecniche di imaging non invasive per lo studio della fisiologia e patofisiologia degli organi di interesse
- Studiare la relazione tra alterazione del suono e sviluppo di danno vascolare, le vibrazioni della parete vascolare e lo sviluppo del danno vascolare
- Sviluppare e convalidare sistemi informativi per studi clinici controllati e la pratica clinica

### **Laboratori**

1. Laboratorio di Medical Imaging
2. Laboratorio Ingegneria dei Tessuti per la Medicina Rigenerativa
3. Laboratorio Tecnologie Biomediche

## DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

### Capo Dipartimento: Susanna Tomasoni

La ricerca del Dipartimento di Medicina Molecolare è strettamente collegata a quella della Unità Operativa Complessa Malattie Renali e ha come scopo la comprensione dei meccanismi di danno che portano alla perdita della funzione del rene nelle malattie renali croniche, e la messa a punto di strategie che evitino ai pazienti di dover ricorrere alla dialisi o al trapianto.

### Obiettivi

- Identificazione di mediatori e meccanismi d'azione responsabili della perdita di funzionalità renale nelle malattie renali
- Sviluppo di strategie terapeutiche farmacologiche, cellulari e molecolari per rallentare la progressione della malattia renale verso l'insufficienza renale terminale e indurre regressione del danno cronico al rene
- Studio dei meccanismi di rigenerazione del rene e del cuore indotta da terapie renoprotettive o identificazione di cellule progenitrici
- Generazione di unità funzionanti di rene a partire da cellule embrionali isolate
- Generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da pazienti con malattie rare e sviluppo di protocolli differenziativi di iPSC verso un fenotipo renale
- Correzione di mutazioni geniche in iPSC di pazienti con malattie rare mediante tecnica CRISPR/Cas9
- Gene editing di iPSC mediante il sistema CRISPR/Cas9 per generare modelli di malattia
- Analisi dei meccanismi e dei fattori responsabili della perdita di tromboresistenza dell'endotelio nelle microangiopatie trombotiche
- Sviluppo di nuove strategie, tra cui la terapia cellulare e le nanoterapie, per modulare la risposta immunitaria post-trapianto e prevenire il rigetto acuto e cronico del trapianto d'organo; studio di possibili vie immunologiche che portino alla tolleranza dell'organo trapiantato
- Sviluppo di terapie cellulari e farmacologiche per rallentare la progressione della malattia renale diabetica in pazienti con diabete di tipo 2
- Studio delle alterazioni immunologiche in pazienti con malattie renali immuno-mediate tra le quali la nefropatia membranosa e la sindrome nefrosica idiopatica
- Sviluppo di organ-on-chip per riprodurre *in vitro* le funzioni di strutture umane complesse

### Laboratori

1. Laboratorio Biologia Cellulare e Medicina Rigenerativa
2. Lab. Fisiopatologia delle Malattie Renali ed Interazione con altri Sistemi
3. Laboratorio Riprogrammazione Cellulare e Terapia Genica
4. Laboratorio Immunologia del Trapianto

## 5. Laboratorio Organ Regeneration

## **DIPARTIMENTO DI NEUROSCIENZE**

### **Capo Dipartimento: Gianluigi Forloni**

Il Dipartimento di Neuroscienze studia le malattie neurologiche e psichiatriche dal punto di vista delle basi biologiche, di alcuni aspetti clinici e della valutazione dei servizi sanitari.

Mira a comprendere le cause, descrivere i sintomi e identificare strategie terapeutiche in grado di attenuare o arrestare il decorso clinico.

### **Obiettivi**

- Studiare le Malattie Neurodegenerative più comuni come Alzheimer e Parkinson o più rare come le malattie da prioni o la sclerosi laterale amiotrofica (SLA) gli studi si sviluppano dalla ricerca di base sui meccanismi patogenetici, utilizzando modelli in vivo e in vitro, fino alla ricerca clinica ed epidemiologica
- Elaborare approcci terapeutici, che dai modelli sperimentali arrivino a livello clinico
- Studiare l'invecchiamento per identificare possibili fattori di rischio e benefici nello sviluppo di demenze con un'attenzione specifica agli aspetti genetici e ai modelli sperimentali.
- Individuare i biomarcatori nelle diverse malattie neurologiche e neuromuscolari capaci di monitorare il progresso della malattia, di migliorare l'accuratezza diagnostica e di valutare l'impatto terapeutico
- Identificare e caratterizzare biomarcatori classici e innovativi nel plasma, e in altri fluidi biologici che combinati con indagini genetiche permettano lo sviluppo di profili di rischio utili a selezionare i pazienti neurologici
- Utilizzo di biomateriali per favorire il rilascio di farmaci e la loro selettività per diversi tipi cellulari

### **Laboratori**

1. Laboratorio Neurobiologia dei Prioni
2. Laboratorio Malattie Neurologiche
3. Laboratorio Neurochimica e Comportamento
4. Laboratorio di Fisiopatologia Muscolare
5. Laboratorio Biologia delle Malattie Neurodegenerative
6. Laboratorio Meccanismi Molecolari Malattie da Poliglutamine
7. Laboratorio Biomarcatori Traslazionali
8. Laboratorio di Neurobiologia e Terapia Preclinica

## **DIPARTIMENTO DI DANNO CEREBRALE E CARDIOVASCOLARE ACUTO**

**Capo Dipartimento: Elisa Zanier**

Il Dipartimento di Danno Cerebrale e Cardiovascolare Acuto studia condizioni cliniche quali l'epilessia, il trauma cranico, l'ictus, l'arresto cardiaco e l'infarto miocardico con l'obiettivo di migliorarne il decorso clinico e la prognosi.

Il danno cerebrale acuto associato a queste condizioni porta a grave disabilità cronica cognitiva e/o motoria in un'alta percentuale di pazienti.

Sviluppare terapie per questi pazienti è, dunque, una priorità.

### **Obiettivi**

Obiettivo del Dipartimento è quello di sviluppare modelli preclinici di danno cerebrale e cardiaco ed intensificare l'interazione tra attività di laboratorio e cliniche, al fine di:

- comprendere i meccanismi patogenici delle malattie cardiovascolari e cerebrali acute e i determinanti della loro evoluzione cronica
- identificare potenziali bersagli farmacologici e sviluppare terapie per il danno cardiovascolare e cerebrale acuto e le loro conseguenze croniche;
- identificare indicatori che migliorino la diagnosi, la cura e la prognosi dei soggetti suscettibili di terapia attraverso approcci ad alta trasferibilità clinica incluso biomarcatori circolanti e di neuroimaging
- realizzare una biobanca preclinica con l'obiettivo di identificare biomarcatori ed esplorare nuovi meccanismi, riducendo l'uso di animali per la ricerca;
- contribuire alla formazione scientifica di nuovi ricercatori di base e di clinici.

### **Laboratori**

1. Laboratorio di Trauma Cranico e Neuroprotezione
2. Laboratorio di Epilessia e Strategie Terapeutiche
3. Laboratorio di Ictus e Disfunzioni Vascolari
4. Laboratorio di Ricerca Clinica sul Danno Cerebrale e Cardiovascolare
5. Laboratorio di Ricerca Preclinica Cardiovascolare

## **DIPARTIMENTO DI ONCOLOGIA CLINICA**

### **Capo Dipartimento: Valter Torri**

L'obiettivo del Dipartimento di Oncologia Clinica è di ottimizzare le strategie terapeutiche attualmente in uso nella pratica clinica e rendere più efficaci le terapie per la cura dei tumori attraverso studi che approfondiscano gli aspetti molecolari, biologici e farmacologici non tralasciando i limiti dei trattamenti stessi (ad esempio attraverso lo studio e il monitoraggio degli effetti collaterali). Lo scopo finale è arrivare ad applicazioni cliniche in grado di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita di pazienti oncologici. L'obiettivo viene perseguito tramite lo studio della metodologia e la sua applicazione negli studi clinici e la produzione di raccomandazioni per la pratica clinica.

I progetti seguiti dal Dipartimento riguardano diversi tipi di neoplasie, però la maggioranza degli studi si focalizza sui tumori ginecologici, sui sarcomi, sui tumori toracici (polmone, mesoteliomi e timomi) e sui tumori del tratto gastro-intestinale (colon-retto, pancreas).

### **Obiettivi**

- Affrontare i problemi metodologici sulla scelta del disegno più appropriato ed efficiente per la valutazione dell'attività clinica dei nuovi farmaci con meccanismi d'azione differenti dai chemioterapici tradizionali.
- Fornire supporto metodologico per il disegno, la progettazione, l'approvazione regolatoria, la conduzione, le analisi statistiche e il reporting degli studi clinici
- Studiare nuove combinazioni di farmaci e di regimi di trattamenti multimodali
- Ottimizzare l'utilizzo di farmaci, anche off-label, e strategie terapeutiche mirato al miglioramento della normale pratica clinica
- Partecipare in maniera attiva ai corsi di formazione per quanto riguarda la metodologia della ricerca clinica e la statistica

### **Laboratori**

- Laboratorio Metodologia delle Revisioni Sistematiche e Produzione di Linee Guida
- Laboratorio Metodologia per la Ricerca Clinica

## **DIPARTIMENTO DI ONCOLOGIA SPERIMENTALE**

### **Capo Dipartimento: Massimo Brogginì**

Nell'ambito delle malattie oncologiche, l'obiettivo principale della ricerca è di rendere più efficaci le terapie per la cura dei tumori attraverso studi che approfondiscano gli aspetti molecolari, biologici e farmacologici, per arrivare ad applicazioni cliniche in grado di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita dei pazienti oncologici.

### **Obiettivi**

I progetti riguardano diversi tipi di neoplasie. Tuttavia la maggioranza degli studi preclinici e clinici si focalizzano sui tumori ginecologici, sui sarcomi, sui tumori toracici (polmone, mesoteliomi e timomi), sui tumori pancreatici e sui tumori cerebrali con i seguenti obiettivi comuni:

- identificare nuovi bersagli molecolari per cui possano essere sviluppati nuovi farmaci
- identificare nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi della risposta a specifiche terapie antitumorali per migliorare la diagnosi e la selezione delle terapie più adatte al paziente
- studiare la biologia dei tumori, per comprendere i pathways responsabili della loro crescita e metastatizzazione, e i meccanismi di interazione con il microambiente, come i vasi sanguigni, i fibroblasti, la matrice extracellulare e la risposta immunitaria
- studiare il meccanismo d'azione e le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche di nuovi farmaci antitumorali, con meccanismo d'azione innovativo in grado di agire direttamente sul tumore o sulla sua interazione con l'ospite
- studiare i meccanismi alla base della resistenza ai farmaci antitumorali e possibili strategie per superarla
- studiare nuove formulazioni basate sulle più innovative nanotecnologie e/o combinazioni di farmaci o del loro impiego "off-label", sia in modelli sperimentali che in clinica
- ottimizzare l'utilizzo di farmaci e strategie terapeutiche al fine di migliorare la normale pratica clinica
- affrontare i problemi metodologici sulla scelta del disegno più appropriato ed efficiente per la valutazione dell'attività clinica dei nuovi farmaci con meccanismi d'azione differenti dai chemioterapici tradizionali

### **Laboratori**

1. Laboratorio Farmacologia Antitumorale
2. Laboratorio Farmacologia Molecolare
3. Laboratorio Microambiente Tumorale
4. Laboratorio di Oncologia Ginecologica Preclinica
5. Unità di Oncologia Computazionale

6. Unità di Immunofarmacologia

7. Unità di oncologia molecolare e risposta al danno al DNA

## **DIPARTIMENTO DI EPIDEMIOLOGIA MEDICA**

### **Capo Dipartimento: Guido Bertolini**

La ricerca del Dipartimento di Epidemiologia Medica è mirata a comprendere quali fattori che influenzano la salute dei singoli e delle popolazioni, al fine di definire quali siano gli interventi efficaci per soddisfare i bisogni di ciascun cittadino.

Particolare enfasi è rivolta da un lato alla valutazione della qualità dell'assistenza, per migliorare costantemente la cura dei pazienti, dall'altro alla prevenzione, al fine di ridurre i rischi di contrarre malattie con interventi sempre più precoci.

### **Obiettivi**

- Informazione, formazione e confronto degli operatori sanitari e sociali, della popolazione e delle sue rappresentanze
- Miglioramento dell'assistenza sanitaria in diversi ambiti disciplinari attraverso raccolte dati multicentriche
- Studio e applicazione di tecnologie per la raccolta ed analisi dati nei reparti di Terapia Intensiva
- Valutazione dei percorsi diagnostico-terapeutici dei bambini con patologie croniche (asma, epilessia, disturbi neuropsichiatrici)
- Studio dei principali fattori di rischio evitabili per tumori, malattie cardiovascolari e altre malattie (in particolare COVID-19) o disabilità (come l'acufene)

### **Laboratori e Unità afferenti**

1. Laboratorio di Epidemiologia Clinica
2. Laboratorio Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità
3. Laboratorio di Clinical Data Science
4. Laboratorio di Epidemiologia dell'età evolutiva
5. Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita
6. Unità di Informatica per la condivisione della conoscenza clinica

## **DIPARTIMENTO DI POLITICHE PER LA SALUTE**

### **Capo Dipartimento: Alessandro Nobili**

Il Dipartimento di Politiche per la Salute si occupa di sviluppare attività di ricerca, formazione e informazione per sostenere l'indipendenza, l'accessibilità e l'universalità del SSN.

In particolare, è coinvolto nella organizzazione promozione di politiche sanitarie mirate a tutelare il diritto alla salute delle persone, migliorare gli interventi di prevenzione e accesso alle cure, fornire un supporto agli organismi istituzionali nella programmazione e nella valutazione delle politiche sanitarie, con particolare attenzione all'appropriatezza e alla riduzione degli sprechi. Promuove, inoltre, interventi al personale sanitario mirati a razionalizzare l'uso dei farmaci, incentivando l'uso dei principi attivi con miglior rapporto beneficio/rischio e costo/beneficio.

Coordina inoltre lo sviluppo e l'aggiornamento di INTERCheck, uno strumento di supporto alla prescrizione adatto a valutare le terapie complesse dei soggetti anziani politrattati.

All'interno del Dipartimento è collocato anche il "Centro studi di politica e programmazione socio-sanitaria" che collabora con istituzioni, associazioni e professionisti impegnati nel campo della salute per creare e promuovere spazi di confronto e di ricerca per la riorganizzazione e il rilancio del SSN.

### **Obiettivi**

- Fornire supporto metodologico per l'organizzazione, la programmazione e la valutazione delle politiche sociosanitarie e dei relativi costi all'interno del SSN
- Promuovere la prevenzione e corretti stili di vita come alternativa all'uso dei farmaci e come strategia per un invecchiamento in salute
- Studiare la relazione tra alimentazione e salute planetaria
- Studiare i fattori di rischio biologici, alimentari, ambientali e sociali associati all'invecchiamento della popolazione e all'insorgenza di demenza
- Promuovere l'appropriatezza prescrittiva e l'etica della riduzione degli sprechi nei diversi contesti di cura del SSN
- Razionalizzare l'uso dei farmaci e promuovere il deprescribing negli anziani in politerapia e in altre popolazioni a rischio
- Promuovere la ricerca clinica nella medicina del territorio e l'integrazione delle cure all'interno della rete dei servizi alla persona
- Sviluppare strategie organizzative e sostenere l'implementazione di interventi psicosociali per supportare i servizi di salute mentale di comunità
- Realizzare interventi di formazione e informazione indipendente per promuovere l'appropriatezza prescrittiva tra gli operatori del SSN
- Strutturare interventi e strategie dal punto di vista dei pazienti

- All'interno del Dipartimento è presente il **Centro studi di politica e programmazione socio-sanitaria** che ha come obiettivo di fornire un supporto metodologico per l'organizzazione e la realizzazione di interventi e progetti mirati a: migliorare gli interventi di prevenzione e accesso alle cure, indirizzare le scelte politiche per la salute sulla base di interventi di documentata efficacia, promuovere l'appropriatezza e la riduzione degli sprechi, promuovere la salute delle persone con attenzione all'ambiente, coinvolgere i cittadini e le comunità nelle scelte per la salute e tutelare i fondamenti di universalità, uguaglianza ed equità del SSN pubblico evitando la deriva del SSN verso una sanità e un sistema sanitario privati.

Le attività e le pubblicazioni scientifiche sono accessibili consultando il sito:

<https://www.marionegri.it/centro-studi-di-politica-e-programmazione-socio-sanitaria>

## **Laboratori**

1. Laboratorio Prevenzione Cardiovascolare
2. Laboratorio di Farmacoepidemiologia e Nutrizione Umana
3. Laboratorio di Farmacologia Clinica e Appropriatezza Prescrittiva
4. Laboratorio di Epidemiologia Geriatrica
5. Laboratorio Valutazione della Qualità delle Cure e dei Servizi
6. Centro di Economia Sanitaria "Angelo e Angela Valenti" - CESAV

## **CENTRO DI RICERCHE CLINICHE PER LE MALATTIE RARE "ALDO E CELE DACCÒ**

Il Centro - situato a Ranica, in provincia di Bergamo - è nato nel 1992 con l'intento di promuovere la ricerca clinica indipendente. All'inizio della propria attività offriva soprattutto informazioni per i pazienti affetti da malattie rare che soffrivano della scarsità di notizie e di cultura medica.

Nel corso degli anni, pur continuando a svolgere questa attività di servizio, il Centro Daccò si è sempre più configurato come struttura sanitaria dedicata alla conduzione e al coordinamento di studi clinici nel settore delle malattie rare e delle malattie renali. In questo ambito sono oggetto di studi: la nefropatia diabetica, le malattie renali croniche proteinuriche diabetiche e non diabetiche, le microangiopatie trombotiche, le malattie renali non-proteinuriche con particolare riferimento al rene policistico, le nefropatie rare di origine genetica. Alcuni studi sono poi rivolti ad approfondire tematiche relative alla minimizzazione della terapia immunosoppressiva nel trapianto di rene e alla induzione di tolleranza immunologica all'organo trapiantato mediante terapia con cellule mesenchimali stromali.

Dal Dicembre 2001 è stato riconosciuto come Centro di Coordinamento della Rete Regionale Malattie Rare della Lombardia (DGR N° VII/7328 del 11/12/2001).

Nel marzo 2009 il Centro Daccò è stato accreditato dalla Regione Lombardia e da allora svolge attività di diagnostica nell'ambito del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) per alcune malattie rare.

Il Centro, nella sua attuale configurazione comprende un Poliambulatorio, una sezione di Day hospital che dispone di 10 posti letto e due Laboratori ultraspecialistici, il Laboratorio di Patologia clinica e il Laboratorio di Genetica Medica – Genetica Molecolare. Alcune delle attività si avvalgono di una stretta collaborazione con l'Azienda Socio-Sanitaria Territoriale (ASST) Papa Giovanni XXIII e con l'ASST Bergamo Est.

### **Struttura**

#### **Centro Clinico**

Attrezzato con strutture dedicate che consentono di seguire direttamente gli ammalati nell'ambito del percorso di definizione diagnostica e della sperimentazione clinica. Le attività si articolano grazie all'implementazione di tre Unità Operative Complesse:

- Unità Operativa Complessa Malattie Renali
- Unità Operativa Complessa malattie rare
- Unità Operativa Complessa Affari Regolatori, Etici e Legali

Il Centro realizza trial clinici per testare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici, sia direttamente - coinvolgendo pazienti accolti in sede - sia svolgendo un ruolo di coordinamento per studi multicentrici nazionali e internazionali.

## **Centro di Genetica Umana**

Si occupa di sviluppare progetti multidisciplinari di ricerca per identificare le cause genetiche di diverse malattie e caratterizzarne le conseguenze a livello molecolare e cellulare.

Gli obiettivi sono:

- ampliare la comprensione dei meccanismi patogenetici,
- migliorare la diagnosi
- individuare terapie mirate.

Le attività si articolano attraverso:

- Unità di Genetica e Basi Molecolari delle Malattie Renali
- Unità di Diagnostica Genomica e Molecolare

## RELAZIONE SULLE PRINCIPALI ATTIVITÀ DI RICERCA DELL'ISTITUTO MARIO NEGRI

### I NUMERI DELLA RICERCA 2024

<b>142</b>	<b>374</b>	<b>3444</b>
PROGETTI DI RICERCA ATTIVI	PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE	IMPACT FACTOR TOTALE*

---

### ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELLE NEUROSCIENZE

Nell'ambito degli studi Neurologici, alcuni dei risultati più rilevanti sono riassunti di seguito.

- ***Studio dei meccanismi di malattia e possibili approcci terapeutici nei modelli sperimentali. In questo ambito, gli esempi di eccellenza riguardano***

- i. La definizione accurata delle malattie da prioni e le opportunità terapeutiche attualmente allo studio nei nostri laboratori (Zerr et al Nat Rev Dis Primers 2024, PMID: 38424082)
- ii. Abbiamo verificato in un contesto sperimentale se le alterazioni della retina, potessero indicare quanto avviene a livello cerebrale. In un modello murino di Alzheimer (5XFAD) abbiamo studiato in parallelo i fenomeni degenerativi a livello cerebrale e le alterazioni della retina negli stessi animali e se l'attivazione di JNK fosse una via comune per entrambi i fenomeni. Utilizzando la tomografia a coerenza ottica (OCT), abbiamo analizzato i topi 5xFAD a 2, 4, 6 e 10 mesi per monitorare la progressione della patologia. Nonostante i cambiamenti nel parenchima cerebrale precedentemente descritti ed i deficit comportamentali, i topi 5xFAD con background B6SJLF1 non hanno mostrato alterazioni retiniche associabili alla malattia
- iii. In un modello murino di invecchiamento precoce (SAMP8) con diverse caratteristiche assimilabili allo stato di fragilità nell'uomo, abbiamo rilevato alterazioni metaboliche e di trascrittomica che potrebbero predire l'insorgenza di una condizione fragile a rischio di demenza (Dacomo et al., 2024, PMID: 38961613).
- iv. All'interno di un consorzio europeo ((BNCT, progetto Europeo NECTAR)) stiamo conducendo uno studio di efficacia terapeutica in modelli Alzheimer sfruttando la terapia a cattura neutronica del boro. Con l'Università di Stoccolma, abbiamo dimostrato che diversi protocolli di irraggiamento modulano in maniera diversa l'attività della microglia (Karimi et al.2024; PMID: 39717389).
- v. In uno studio in collaborazione con l'Università del Piemonte abbiamo dimostrato il ruolo cruciale della proteina calcineurina specificamente negli astrociti nel mediare la progressione

della malattia e la tossicità degli oligomeri di proteina responsabili della disfunzione neuronale nella malattia di Alzheimer (Tapella et al., 2024; PMID: 38288580). Questa evidenza è alla base di un progetto finanziato dal Ministero della Salute (PNRR-MCNT2-2023-12377363) attualmente in corso per lo sviluppo di un approccio terapeutico innovativo che utilizzi inibitori della calcineurina veicolati da nanoparticelle selettivamente mirate agli astrociti

- vi. Nell'ambito di progetto internazionale finanziato dalla comunità europea (TClock4AD), la cui tematica generale riguarda lo sviluppo di nuove molecole capaci di modulare in senso positivo il ritmo circadiano nel contesto della malattia di Alzheimer. Nei nostri laboratori abbiamo verificato la presenza di alterazioni di geni coinvolti nel ritmo circadiano in modelli cellulari (H4 e H4-SW) e in cellule derivate da cellule staminali di pazienti con la patologia. Tali modelli saranno oggetto di trattamento farmacologico con modulatori commerciali o sviluppati all'interno del consorzio TClock4AD.
- vii. Sempre a livello sperimentale, si sono svolte ricerche applicate in collaborazione con il Politecnico di Milano sulla tematica dello sviluppo e utilizzo in contesto di neurodegenerazione di sistemi avanzati di coltura in vitro, detti organ-on-a-chip. In particolare, sono stati realizzati studi per modellizzare l'asse microbiota-intestino-cervello nel contesto della malattia di Alzheimer.
- viii. Abbiamo proseguito lo studio di una porfirina a duplice attività anti-prionica, una molecola che è in grado di eliminare i prioni nei modelli in vitro ed ex vivo come abbiamo recentemente dimostrato. Ne stiamo studiando il meccanismo d'azione a livello atomico per poter identificare molecole che abbiano la stessa duplice attività ma migliori proprietà farmacologiche.
- ix. Nel contesto di due progetti europei è in corso un'indagine su possibili biomarcatori per l'insonnia fatale familiare (PROFFILE), una malattia da prioni di origine genetica. Abbiamo individuato alcune proteine che si modificano nei portatori della mutazione e messo a punto metodi molto sensibili per identificare il prione nel sangue, nelle urine e nelle lacrime. Inoltre abbiamo iniziato a studiare i fattori genetici che influenzano la manifestazione clinica e la progressione delle malattie da prioni (PRIONOMICS). Comprendere meglio i meccanismi alla base di queste patologie permetterebbe di sviluppare terapie personalizzate.
- i. Sviluppo di modelli di trauma cranico per comprendere i meccanismi di danno cerebrale e sviluppare strategie neuroprotettive. In una percentuale non irrilevante di casi, un trauma cranico lieve ma ripetuto, tipico di alcuni sport da contatto, può causare deficit neurologici persistenti o addirittura progressivi. Abbiamo sviluppato un modello sperimentale di trauma cranico sportivo che fedelmente mima questi aspetti e dimostrato che la misurazione acuta (a 7 giorni) di una proteina nel sangue, chiamata neurofilamento leggero, può predire il danno neurologico e anatomico cronico osservato un anno dopo il trauma. Questi dati mostrano che con un semplice prelievo di sangue si possono avere informazioni sulla suscettibilità del cervello ad un secondo impatto, guidando scelte di prevenzione secondaria (Moro et al, 2023 – premio giovani ricercatori per il miglior articolo della rivista J of Neurotrauma, 2023). Dopo un trauma cranico grave, una percentuale significativa di pazienti va incontro a progressivo declino cognitivo con evidenza di depositi cerebrali della proteina

- tau simili a quelli presenti nei cervelli dei pazienti affetti da alcune malattie degenerative. Nei modelli di trauma cranico, abbiamo dimostrato che la somministrazione di un peptide, sviluppato nei nostri laboratori, in grado di attenuare l'aggregazione della proteina tau, inibisce la formazione di aggregati tossici di tau e migliora la memoria (Diomedea et al, 2023). Infine abbiamo sviluppato un modello di trauma cranico in vitro, ideale per testare rapidamente farmaci e strategie neuroprotettive (Pischiutta et al., Front Cell Neurosc, 2023).
- ii. lo sviluppo di un modello tridimensionale in vitro di ischemia cerebrale, basato sull'utilizzo di organoidi corticali umani derivati da cellule staminali pluripotenti indotte. Gli organoidi sottoposti a danno ischemico (deprivazione di ossigeno e glucosio) hanno mostrato la morte dei neuroni e un deterioramento della complessità della rete neuronale, aspetti fondamentali del danno cerebrale post-ischemico, rendendo il modello rilevante per lo studio di strategie neuroprotettive (De Paola et al, J Cereb Blood Flow Metab 2023, PMID: 37990971).
  - iii. lo sviluppo di nuovi approcci sperimentali per lo studio dell'ictus ischemico. Abbiamo condotto uno studio preclinico randomizzato controllato (pRCT) multicentrico (studio TRICS), al fine di favorire la riproducibilità e la trasferibilità della ricerca preclinica sull'ictus. Attraverso una fase di formazione e armonizzazione del personale valutatore di 7 centri italiani, abbiamo implementato e standardizzato un sistema di punteggio neurologico per la valutazione della gravità del danno post-ischemico. Il nostro studio è il primo progettato specificamente per aumentare la affidabilità della valutazione neuro-comportamentale come endpoint primario negli studi pRCT (Valente et al. JCBFM 2023).
  - iv. la dimostrazione di un effetto terapeutico indotto da farmaci antiinfiammatori in grado di interferire con la risposta di immunità innata ed infiammatoria in modelli di epilessia, come la sindrome di Rasmussen (Arcan A, J Neurol, 2023) ed in modelli di "new onset refractory status epilepticus" (NORSE) (Cerovic M, Front Neurol 2023). Abbiamo approfondito i meccanismi neuroinfiammatori e la neuropatologia associate alla condizione clinica del NORSE (Hanin A, J Neurol, 2023; Vezzani A, Epilepsy Behav, 2023). Infine, nell'ambito della ricerca dei marcatori prognostici dello sviluppo di epilessia acquisita, abbiamo identificato delle alterazioni elettroencefalografiche precoci che con elevata sensibilità e specificità prevedono lo sviluppo della epilessia dopo un danno cerebrale traumatico (Di Sapia R, Neurobiol Dis, 2023).
  - v. L'accumulo anomalo di aggregati di Tau è un tratto distintivo della malattia di Alzheimer (AD) e di altre Tauopatie, come la demenza frontotemporale (FTD). I depositi di Tau colpiscono principalmente i neuroni, ma ci sono evidenze che anche le cellule gliali possano essere coinvolte e contribuire in modo unico alla progressione della malattia. In modelli di espressione esclusivamente neuronale di Tau recante mutazione P301L, abbiamo riscontrato tossicità non solo per i neuroni, ma anche per le cellule gliali. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'espressione concomitante con SUMO2 contrasta la tossicità di TauP301L sia nei neuroni che nelle cellule gliali. I nostri risultati rivelano un meccanismo neuroprotettivo, in cui la coniugazione di SUMO2 protegge contro gli effetti tossici di Tau nelle cellule gliali. (Orsini et al. 2024 Dec, PMID: 39726633).
  - vi. Le manifestazioni neurologiche sono una conseguenza immediata dell'infezione da SARS-CoV-2, il virus responsabile della COVID-19, che può anche causare effetti

neurologici a lungo termine. Studi in vitro hanno mostrato che il virus altera la fosforilazione e la distribuzione della proteina Tau nei neuroni infetti, ma i meccanismi non sono ancora chiari. Abbiamo dimostrato che la più abbondante proteina espressa da SARS-CoV-2 durante infezione, NCAP, interagisce fisicamente con Tau e induce una iperfosforilazione e aggregazione di Tau, provocando danni cognitivi nei topi infettati. Inoltre, abbiamo dimostrato che la SUMOilazione, una modifica post-traduzionale che riduce aggregazione di NCAP e Tau, modula la performance cognitiva nei topi infetti. I nostri dati suggeriscono che la SUMOilazione potrebbe essere una via terapeutica per contrastare gli effetti neurotossici associati a Tau e infezioni virali. (Orsini et al. 2024, PMID: 39000276)

- vii. Nel proseguimento dello studio sui due modelli murini di SLA portatori del gene mutato SOD1G93A, caratterizzati da una progressione lenta e veloce della malattia, abbiamo ulteriormente approfondito l'analisi dei meccanismi compensatori che contribuiscono a ritardarne l'esordio e a rallentare la progressione dei sintomi. In particolare, abbiamo studiato il ruolo dei piccoli RNA non codificanti derivati dai tRNA (tsRNA), con particolare attenzione all'angiogenina (ANG) e alla sua capacità di modulare la rigenerazione muscolare e la progressione della malattia. Nei modelli murini SOD1G93A e nelle biopsie muscolari di pazienti SLA, abbiamo osservato che ANG è maggiormente espresso nei soggetti a progressione lenta della malattia, in correlazione con una maggiore rigenerazione muscolare e vascolarizzazione (Fabrizio et al., 2024 PMID 39731449). Questo effetto è stato associato all'aumento di specifici frammenti di tRNA derivati da ANG (tiRNA), suggerendo un loro coinvolgimento nella protezione muscolare e nel rallentamento della degenerazione neuromuscolare. Parallelamente, abbiamo esteso la nostra analisi ai modelli di SLA e di altre malattie neurodegenerative, dimostrando che l'aumento selettivo dei 5' tiRNA nei modelli SOD1G93A e TDP43 può essere un marcatore distintivo della malattia (Baindoor et al., 2024 PMID: 39552337).
- viii. Abbiamo inoltre indagato l'interazione tra il microbiota intestinale, il metabolismo lipidico e la risposta immunitaria in questi due modelli (Niccolai et al., 2024). L'analisi metagenomica del microbiota intestinale ha rivelato differenze specifiche tra i due ceppi, con variazioni nella composizione batterica e nei livelli di acidi grassi a catena corta e media. Nei topi C57Ola\_G93A, la mutazione SOD1 ha indotto cambiamenti simili a quelli osservati nei 129Sv, suggerendo un potenziale impatto del microbiota sulla patogenesi della SLA. Inoltre, le differenze nella risposta immunitaria tra i due ceppi evidenziano un ruolo critico dell'interazione tra il sistema immunitario e il microbiota nella modulazione della progressione della malattia. Questi risultati indicano che l'ambiente intestinale potrebbe rappresentare un nuovo target terapeutico per modulare la neuroinfiammazione e il metabolismo energetico nella SLA.
- ix. Poiché nei topi a rapida progressione della malattia abbiamo osservato un'attivazione di STAT3 a livello muscolare, un fattore chiave nella risposta immunitaria e nella regolazione delle citochine pro-infiammatorie, abbiamo testato l'effetto di sunitinib, un inibitore della tirosin-chinasi che blocca la fosforilazione di STAT3, valutandone l'impatto sull'atrofia muscolare e la progressione della SLA (Tortarolo et al., 2024 PMID: 38914173). Sebbene il trattamento abbia ridotto l'attivazione di STAT3 nel muscolo e nel midollo spinale, non ha migliorato la sopravvivenza, la funzione neuromuscolare o

l'atrofia. Al contrario, ha aumentato l'infiammazione muscolare e ridotto la rigenerazione, suggerendo che l'inibizione di STAT3 potrebbe avere effetti contrastanti nei diversi compartimenti del sistema neuromuscolare.

- x. Abbiamo valutato l'efficacia del Niclosamide, un farmaco antelmintico con proprietà anti-infiammatorie e anti-proliferative, nei modelli murini di SLA basati su SOD1G93A e FUS, dimostrando che il trattamento rallenta la progressione della malattia, migliora le capacità motorie e prolunga la sopravvivenza (Milani et al., 2024 PMID: 38493058). Gli effetti protettivi del niclosamide sono stati associati alla riduzione della gliosi, della perdita di motoneuroni e dell'atrofia muscolare, oltre alla modulazione di pathway infiammatori chiave. Questi risultati suggeriscono che un approccio terapeutico mirato alla modulazione dei meccanismi infiammatori e del metabolismo dell'RNA potrebbe offrire nuove strategie per contrastare la neurodegenerazione nella SLA.
- xi. È stato condotto uno studio di multiomica (trascrittomica, proteomica, fosfoproteomica e miRNAomica) per indagare in maniera comprensiva i meccanismi molecolari alla base della SLA (Caldi Gomes et al., 2024 PMID: 38849340; Hausmann et al., 2024 PMID: 39693632). In particolare è stata analizzata la corteccia prefrontale di 51 pazienti con SLA sporadica e 50 soggetti di controllo, insieme a quattro modelli murini transgenici (C9orf72-, SOD1-, TDP-43- e FUS-ALS). Abbiamo osservato che i maschi presentano cambiamenti più pronunciati nelle vie molecolari rispetto alle femmine, sia nei pazienti che nei modelli animali. L'analisi integrata delle omiche ha inoltre identificato distinti sottogruppi di pazienti SLA, caratterizzati da alterazioni nella risposta immunitaria, nella composizione della matrice extracellulare, nella funzione mitocondriale e nella regolazione dell'RNA. Lo studio ha anche evidenziato la via di segnalazione MAPK come un meccanismo precoce della malattia. Inoltre, abbiamo dimostrato che trametinib, un inibitore della via MAPK, ha potenziali benefici terapeutici nel modello murino SOD1 mutato, in particolare nelle femmine, suggerendo una direzione per lo sviluppo di trattamenti mirati per la SLA.
- xii. Gli studi sull'atrofia muscolare si sono estesi da un ambito prettamente oncologico a modelli neurologici, focalizzandoci in particolar modo sul ruolo delle miochine, cioè molecole secrete dal muscolo che possono essere indotte da esercizio fisico aerobico o anaerobico. Sono in corso studi per comprendere il collegamento tra le molecole che abbiamo dimostrato essere importanti nella progressione dell'atrofia muscolare indotta da cancro, come SDF1 (Stromal cell-Derived Factor 1), PAK1 (serine/threonine-protein kinase 1) e la proteina musclin, e il loro andamento anche in altre condizioni associate ad atrofia muscolare, in particolar modo invecchiamento e SLA. Abbiamo anche testato in modelli murini di SLA gli effetti di un farmaco anti-tumorale (Sunitinib) che aveva avuto effetti positivi contro l'atrofia muscolare da tumore (Tortarolo et al, 2024), non trovando però benefici contro l'atrofia indotta da SLA.
- xiii. In collaborazione con l'Università degli Studi di Milano, abbiamo sviluppato la nuova tecnologia MyoRep (Myo sta per muscolo e Rep per reporter), in grado di "biosentire" l'atrofia muscolare a livello precoce e indipendentemente dal ritmo circadiano in modelli animali con la tecnica di in vivo imaging. Abbiamo iniziato ad applicare tale tecnologia per seguire l'atrofia muscolare in modelli animali di SLA, invecchiamento e cachessia

tumorale, anche per confermare la differenza di genere in quest'ultima, e i primi dati ottenuti sono molto promettenti. Tale tecnologia è stata anche utilizzata per confermare l'effetto anti-atrofico di musclin in atrofia muscolare da SLA o tumore. Gli articoli con tali dati sono in preparazione.

- xiv. Lo sviluppo di nuovi biomateriali e di nanoparticelle opportunamente funzionalizzate si è dimostrato un approccio efficace nei modelli sperimentali di malattia di Alzheimer e di trauma spinale. Lo sviluppo di queste tecniche consente la caratterizzazione di terapie innovative, basate su sistemi di rilascio intelligenti (smart delivery systems) (Giorgi et al, 2024 PMID: **38158393**). L'obiettivo è quello di personalizzare il trattamento in base alle specifiche esigenze terapeutiche della 'medicina di precisione', applicandolo a malattie neurodegenerative acute e localizzate, come le lesioni del midollo spinale. In particolare, è stata ottimizzata una terapia mediante nanovettori selettivi per cellule gliali (microglia e astrociti), caricati con un farmaco anti-infiammatorio, dimostrandone l'efficacia in un modello preclinico di lesione midollare (Veneruso et al 2024 PMID: 37990971). L'efficacia è stata valutata sulla componente gliale tramite avanzate tecniche di analisi morfologica basate su artificial intelligence (deep learning) Petillo et al. 2024 PMID: **38975239**. Parallelamente, è stato sviluppato un innovativo biomateriale, conforme ai requisiti GMP, a base di frazione stromale vascolare derivata da tessuto adiposo umano. Questo biomateriale è stato progettato per essere personalizzato in base alle specifiche esigenze di ciascun paziente, adattando le dimensioni dello scaffold alla sede e alla gravità della lesione, nonché al numero di cellule necessarie per un'efficace terapia.
- xv. Abbiamo collaborato a uno studio multicentrico di neuroimaging nel ratto che ha portato alla definizione di un protocollo standardizzato che migliora i modelli di connettività funzionale rispetto a quelli già esistenti e che permetterà di studiare alterazioni funzionali nell'ambito di malattie neurologiche (Grandjean et al, Nat Neurosci. 2023, PMID: 36973511).

• ***Disegno e coordinamento di studi clinici di fase II, III e IV. In quest'ambito l'Istituto Mario Negri:***

- i. Coordina lo studio preventivo con doxiciclina in soggetti geneticamente a rischio per lo sviluppo dell'Insonnia Fatale Familiare, lo studio che prevedeva la valutazione dell'incidenza nell'arco di dieci anni è in fase conclusiva.
- ii. Ha coordinato (CREACTIVE) e partecipato attivamente (CENTER TBI, BIO-AX-TBI, ICON-TBI) a network internazionali nell'ambito di studi clinici che propongono un approccio integrato per migliorare la prevenzione, la gestione clinica e la ricerca nel trauma cranico (Li LM et al, 2023; Zoerle T et al, 2023; Graham N et al, 2023).
- iii. È coordinatore dello studio clinico di fase II "MATRIx" volto a verificare la sicurezza e l'attività biologica del trattamento acuto (entro 48h dal trauma) con cellule mesenchimali stromali in pazienti con trauma cranico grave (Zanier et al., Intensive Care Med Exp 2023).
- iv. Ha coordinato lo studio "Treat\_CMM" volto ad analizzare se il trattamento cronico con il propranololo fosse in grado di ridurre la gravità delle lesioni cerebrovascolari e gli eventi clinici e sintomatologici nei pazienti con Malformazione Cavernosa Cerebrale (Lanfranconi

et al., The Lancet Neurology, 2023; Incerti I, Eur Radiol, 2023; Lazzaroni F, eBiomedicine, 2023).

- ***Epidemiologia delle malattie neurologiche.***

Nell'ambito degli studi clinici nella SLA, stiamo approfondendo lo studio dei fattori di rischio per la malattia, prestando particolare attenzione a quei soggetti che hanno svolto, nel corso della vita, attività sportiva a livello professionale, sia in Italia che in Inghilterra. Nel 2024 abbiamo completato le analisi di uno studio volto a indagare quali siano i bisogni e le aspettative di pazienti e caregiver, al fine di poter meglio indirizzare le attenzioni del personale assistenziale e dei ricercatori. Il manoscritto è in via di completamento. Stiamo inoltre coordinando alcuni studi volti a valutare le caratteristiche cliniche dei soggetti cosiddetti "lungosopravvivenenti", ossia coloro che hanno una forma di malattia poco aggressiva, con evoluzione lenta. Inoltre, stiamo indagando ulteriori fattori ambientali che potrebbero concorrere all'insorgenza della malattia. Poiché gli strumenti a nostra disposizione per poter monitorare l'evoluzione della SLA sono a tutt'oggi molto scarsi e riescono ad intercettare solo grossolanamente il peggioramento fisico, stiamo cercando di identificare nuovi strumenti diagnostici che possano essere utili in primis nella pratica clinica, ma con un possibile futuro utilizzo anche nei clinical trial. Nel 2024 abbiamo avviato le procedure burocratiche e regolatorie per poter avviare un clinical trial di fase 2/3 sull'uso della L-acetil-carnitina nei pazienti SLA italiani ed australiani, che vedrà nel 2025 l'inizio del reclutamento dei pazienti (Lepore et al 2024 PMID: 38713966).

Poiché gli strumenti a nostra disposizione per poter monitorare l'evoluzione della SLA sono a tutt'oggi molto scarsi e riescono ad intercettare solo grossolanamente il peggioramento fisico, stiamo cercando di identificare nuovi strumenti diagnostici che possano essere utili in primis nella pratica clinica, ma con un possibile futuro utilizzo anche nei clinical trial. Nel 2024 abbiamo avviato le procedure burocratiche e regolatorie per poter avviare un clinical trial di fase 2/3 sull'uso della L-acetil-carnitina nei pazienti SLA italiani ed australiani, che vedrà nel 2025 l'inizio del reclutamento dei pazienti. Inoltre, abbiamo concluso le osservazioni sui pazienti che avevano partecipato ad un trial di fase 2, che mirava a valutare l'effetto di RNS60 in pazienti SLA sia sui biomarcatori che sull'effetto clinico del trattamento. L'obiettivo era quello di evidenziare se ci fossero delle differenze in termini di sopravvivenza a lungo termine nei due gruppi di trattamento (Pupillo et al., 2024, PMID: 39182589)

- Un'altra malattia neurodegenerativa rara di cui ci stiamo occupando è la così detta "malattia di Kennedy", conosciuta anche come atrofia muscolare bulbare e spinale. Il nostro gruppo sta collaborando al coordinamento di un clinical trial di fase due per verificare l'effetto del clenbuterolo in questa malattia. Nel 2024 è iniziato il reclutamento e stiamo ora seguendo l'evoluzione dello studio.
- Il nostro Istituto partecipa al progetto "Registro Italiano Sclerosi Multipla e Patologie Correlate" promosso dalla Fondazione Italiana Sclerosi Multipla - FISM Onlus e l'Università degli Studi di Bari. Il Registro ha come obiettivo principale quello di creare una struttura organizzata multicentrica per raccogliere

i dati di tutti i pazienti affetti da SM e patologie correlate seguiti nei diversi centri italiani con finalità epidemiologiche, di sanità pubblica e di ricerca per migliorare le conoscenze sulle cause e sui trattamenti della malattia. Ad oggi il Registro raccoglie attraverso una web application sviluppata ad hoc i dati di più di 80.000 soggetti unici raccolti da più di 130 centri (<https://registroitalianosm.it>). In questo contesto, il nostro Istituto organizzato come STO-struttura tecnico-operativa ha funzioni di coordinamento delle attività del progetto ed è parte del comitato scientifico. Utilizzando i dati prodotti dal registro abbiamo collaborato ad uno studio mirante a verificare i modelli di prescrizione delle terapie della sclerosi multipla nel tempo e in diverse aree geografiche e le latenze di diagnosi e di inizio del trattamento (Lepore et al 2024). Lo studio ha evidenziato omogeneità nelle prescrizioni terapeutiche in Italia e i fattori che influenzano la scelta dei farmaci ad alta efficacia, sia legati all'assistenza sanitaria che al fenotipo clinico.

- Abbiamo svolto uno studio osservazionale volto a verificare i percorsi terapeutici e le caratteristiche cliniche di pazienti in stato vegetativo persistente ricoverati in alcune strutture lombarde. A questo è stata associata un'indagine sulla qualità di vita dei loro caregiver. I dati sono stati completati ed elaborati ed è stato sottomesso il manoscritto finale (under review).
  - Epidemiologia dell'epilessia. Abbiamo investigato la frequenza e le caratteristiche dell'epilessia in età pediatrica nel sud della Sardegna (Giussani et al., PMID: 38039601), la risposta ai farmaci e la prognosi di soggetti con epilessia focale e generalizzata applicando la nuova classificazione sindromica.
  - Abbiamo terminato l'analisi di un trial pragmatico multicentrico per verificare se l'utilizzo di basse dosi di farmaci antiepilettici non fosse inferiore all'utilizzo di dosi standard nelle epilessie di nuova diagnosi (submitted, under review). Abbiamo valutato le potenzialità dei video prodotti con dispositivi mobili per la differenziazione delle crisi funzionali dalle crisi epilettiche (studio PNES-Home Video), mostrandone l'utilità nell'arsenale diagnostico-clinico. Abbiamo inoltre condotto uno studio retrospettivo su una serie di casi italiani di 14 pazienti con diagnosi di NORSE (New-Onset Refractory Status Epilepticus) (compresi casi di FIRES ovvero Febrile-Induced Refractory Status Epilepticus) trattati con Anakinra.
- i. L'Istituto da 20 anni coordina uno studio prospettico di popolazione (Monzino 80-plus Study) che valuta prevalenza, incidenza e fattori di rischio della demenza in una vasta coorte di ultraottantenni residenti nella provincia di Varese. Recentemente i dati sulla prevalenza della demenza nei soggetti centenari di questo studio sono stati pubblicati in un lavoro assieme a quelli di altri gruppi attivi a livello mondiale che si occupano di popolazioni centenarie (Leung Y et al, 2022).
  - ii. Studio dell'epidemiologia dell'acufene, la percezione di un rumore (come un ronzio, un fischio, un fruscio o un sibilo) avvertito nelle orecchie o nella testa in assenza di uno stimolo acustico esterno. Da diversi anni il Laboratorio di Epidemiologia degli Stili di Vita dell'Istituto

Mario Negri di Milano studia quanto questo disturbo sia frequente nella popolazione e quale sia la sua distribuzione nei sessi e nelle differenti classi di età, conducendo sia indagini trasversali sulla popolazione generale italiana ed europea, che revisioni sistematiche e meta-analisi (Jarach CM et al, 2022). Inoltre, il Laboratorio conduce e analizza studi caso-controllo e di coorte per identificare quali siano i potenziali fattori di rischio legati all'insorgenza e alla severità dell'acufene.

- iii. Il comportamento prescrittivo degli psichiatri dei servizi di salute mentale viene indagato in relazione alle benzodiazepine in uno studio che ha coinvolto tutti i servizi di salute mentale della Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari di Trento. Lo studio quantifica le prescrizioni di benzodiazepine per l'insonnia in tutta la popolazione seguita dai servizi e verifica i cambiamenti dopo la formazione a un intervento psicologico per l'insonnia e la sua introduzione nei servizi. Nel 2022 è stata conclusa l'implementazione dell'intervento psicologico in tutti i servizi, che ha coinvolto un totale di 110 persone, ed è stata condotta la seconda rilevazione delle prescrizioni. Dati preliminari suggeriscono che il numero di persone a cui vengono prescritte benzodiazepine per l'insonnia non è diminuito dopo l'introduzione dell'intervento psicologico.
- iv. All'interno Joint Action europea ImpleMENTAL, il Laboratorio di Valutazione della Qualità delle Cure e dei Servizi si occupa di supportare con formazioni mirate l'implementazione di attività volte a rafforzare o avviare la costruzione di servizi di salute mentale basati sulla comunità e in alternativa a soluzioni di carattere istituzionale. È stato costruito il rationale della formazione da offrire ai tredici paesi partecipanti e si sono avviati gli incontri con i singoli paesi per definire le necessità formative connesse ai piani di implementazione delle attività volte alla trasformazione e al miglioramento dei servizi.
- v. Il tema dell'offerta di interventi psicologici alla popolazione generale è stato trattato dalla Consensus Conference sulle terapie psicologiche per ansia e depressione dell'Istituto Superiore di Sanità, che aveva come obiettivi generali promuovere la conoscenza e l'applicazione delle terapie psicologiche di efficacia dimostrata per ansia e depressione e favorire l'accessibilità della popolazione a cure appropriate, in particolare psicologiche, in modo da ridurre l'attuale gap di trattamento, in riferimento alla situazione italiana. In base a revisioni di letteratura e audizioni specifiche, la giuria ha prodotto una serie di raccomandazioni in relazione a: a) efficacia e applicabilità al contesto italiano delle linee guida, delle terapie e dei modelli organizzativi attualmente disponibili; b) modalità, strumenti e procedure per individuare le persone che possono beneficiare di terapie psicologiche per ansia e depressione; c) formazione e aggiornamento dei professionisti che intervengono con le persone che presentano problemi di ansia e di depressione; d) risorse necessarie, modelli organizzativi e percorsi diagnostico-terapeutici per facilitare l'accesso alle terapie psicologiche (Barbato A et al, 2022).
- vi. Lo studio di Monitoraggio del Piano Urbano segue e registra gli esiti dei pazienti con disturbi mentali gravi seguiti dalla Cooperativa Proges, ad essa inviati da tutti i Centri Psicosociali di Milano allo scopo di essere trattati in modo personalizzato e condiviso con attività significative per la persona e finalizzate ad obiettivi precisi e condivisi da perseguire attingendo alle risorse esistenti nel territorio. Sono stati analizzati i dati derivanti dal database

Pronto Badante allo scopo di identificare l'impatto e l'evoluzione dei bisogni di cura e di assistenza legati a situazioni urgenti sostenute dalla Regione Toscana.

vii. In collaborazione con la Fondazione Alzheimer è stato avviato un Progetto articolato volto alla valutazione della fattibilità e degli effetti della pianificazione condivisa delle cure nella demenza agli esordi. È stata condotta una ricerca qualitativa basata su un focus group a cui hanno partecipato operatori sanitari e sociali e volontari e uno con persone anziane e caregiver che hanno messo in evidenza l'interesse dei partecipanti per la pianificazione condivisa delle cure e alcune preoccupazioni relative ad essa. In base a questi elementi, è stata avviata la definizione di uno studio pilota che testerà l'accettabilità e la fattibilità della pianificazione condivisa delle cure con persone con demenza agli esordi e degli strumenti predisposti per la sua realizzazione.

- Il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello e il Laboratorio di Farmacocinetica e Farmacodinamica studiano il **processo patogenetico alla base di numerose patologie associate ad un'alterazione dei meccanismi che regolano l'assemblamento e il traffico delle proteine a livello cellulare**. La conseguente formazione e l'accumulo di aggregati proteici, chiamati depositi di amiloide, induce un processo degenerativo nelle cellule e nei tessuti in cui si depositano. Alcune di queste malattie, definite amiloidosi centrali, sono responsabili di patologie neurodegenerative molto diffuse, come la malattia di Alzheimer, ma per nessuna di esse esiste attualmente una terapia efficace. Il progetto di ricerca prevede lo svolgimento di studi biochimici e biofisici per la descrizione degli eventi molecolari che modulano il processo di amiloidogenesi *in vitro* e *in vivo* con lo scopo di identificare nuovi target rilevanti per il disegno di strategie terapeutiche efficaci. Per gli studi *in vivo* viene utilizzato il *C. elegans* in quanto esso permette di correlare il processo degenerativo associato alla proteotossicità indotta dalla proteina amiloidogena con i suoi livelli di espressione, il suo stato di aggregazione nonché l'espressione di geni che possono essere attivamente coinvolti nelle diverse fasi della malattia. Questo organismo è più vicino all'uomo di quanto si possa immaginare. Il 60% dei suoi geni sono omologhi a quelli umani e molti dei geni coinvolti nello sviluppo e nell'organizzazione del sistema nervoso presenti in *C. elegans*, sono conservati nell'uomo. Questo nematode conserva anche molti dei sistemi di reazione allo stress presenti nei mammiferi e ciò lo rende un sistema rapido e versatile per ricapitolare i meccanismi molecolari alla base di malattie complesse. Almeno il 42% dei geni correlati alle malattie umane hanno un gene ortologo in *C. elegans*, suggerendo che la maggior parte delle vie biochimiche sono state conservate attraverso l'evoluzione. Infine, essendo un animale invertebrato, il suo utilizzo permette di superare, almeno in parte, i problemi di natura etica legati alla sperimentazione animale. Attualmente sono disponibili diversi ceppi transgenici che esprimono, in modo costitutivo o inducibile, vari frammenti della proteina  $\beta$ -amiloide umana, nella forma wild-type o mutata, nei neuroni o nel muscolo. Sono stati generati anche vermi transgenici che esprimono diverse isoforme di proteina tau responsabili della patogenesi delle demenze frontotemporali, un gruppo eterogeneo di malattie neurodegenerative che fa parte della più grande famiglia delle cosiddette tauopatie.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO CARDIOVASCOLARE

Nell'ambito della ricerca Cardiovascolare, gli studi di eccellenza con alcuni dei risultati più rilevanti sono riassunti di seguito.

- ***Studio dei meccanismi di malattia e possibili approcci terapeutici nei modelli sperimentali di arresto cardiaco e rianimazione cardiopolmonare***

- i. L'arresto cardiaco colpisce ogni anno più di 350.000 persone negli Stati Uniti e 700.000 in Europa. Tra coloro che sono rianimati con successo, più del 60% muore in terapia intensiva. Fino ad ora nessun trattamento si è dimostrato efficace nel migliorare l'esito della rianimazione cardiopolmonare e della fase post arresto cardiaco. I gas nobili possiedono proprietà cardio e neuro-protettive dopo eventi ischemici. Nei nostri laboratori abbiamo dimostrato gli effetti neuroprotettivi della ventilazione polmonare con una miscela di Argon e Ossigeno (70% Argon, 30% Ossigeno) dopo l'arresto cardiaco in un modello preclinico nel maiale (Merigo G., et al., *Vascul Pharmacology*, 2024). Attualmente sono in corso nuovi studi per valutare l'effetto cardioprotettivo dell'Argon in un modello di arresto cardiaco nel ratto ed indagarne i meccanismi d'azione.
- ii. Abbiamo dimostrato l'effetto neuroprotettivo dell'Argon somministrato in associazione all'Idrogeno nel modello di arresto cardiaco e rianimazione cardiopolmonare nel maiale, provando che la combinazione di una miscela dei due gas è in grado di ridurre il danno neuronale e la neuroinfiammazione negli animali che sopravvivono dopo arresto cardiaco (Motta F., et al., *J Am Heart Assoc*, 2024). Saranno necessari ulteriori studi per confermare quanto osservato e per stabilire quale regime terapeutico potrebbe risultare clinicamente più efficace.
- iii. Il ruolo del pathway delle chinurenine, la principale via del metabolismo del triptofano, è oggetto di studio in diversi modelli sperimentali (Perego C., et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 2024). Abbiamo dimostrato che l'inibizione genetica del pathway delle chinurenine conduce a una miglior sopravvivenza e ad un miglior esito neurologico dopo arresto cardiaco, associati ad un minor danno neuronale ed una migliore preservazione dei fasci di sostanza bianca nel cervello. Sono in corso ulteriori studi che mirano a valutare gli effetti dell'inibizione genetica di questo pathway sull'evoluzione del danno cardiaco dopo infarto del miocardio, con un'attenzione particolare alle differenze di genere nella risposta al danno.

- ***Disegno e coordinamento di studi clinici osservazionali ed interventistici***

### **ALBIOSS-Balanced.**

Si è concluso lo studio ALBIOSS-Balanced, trial clinico randomizzato finalizzato a testare l'efficacia dell'albumina e delle soluzioni cristalloidi bilanciate a basso contenuto di cloruro nello shock settico. Lo scopo principale del progetto è duplice: (1) valutare se l'albumina in aggiunta ai cristalloidi riduce la mortalità a 90 giorni rispetto ai soli cristalloidi (2) valutare se le soluzioni bilanciate riducono la mortalità a 90 giorni e/o l'incidenza di acute kidney injury (AKI) rispetto alla soluzione salina normale. I risultati finali sono in via di pubblicazione.

- i. **Care-in-Health.** Questo studio è nato per identificare il contributo dei lipidi nella risoluzione dell'infiammazione vascolare cronica al fine di diagnosticare, prevenire e trattare le malattie cardiovascolari. Dalla misurazione del profilo lipidico deriverà la creazione di un algoritmo lipidico. Lo studio randomizzato e controllato, RESOLVIN, valuterà l'utilità di tale algoritmo, nonché l'effetto degli N3-PUFA di origine animale e vegetale sull'algoritmo lipidico (Witoslawska et al. 2024, Eur J Clin Invest). Nel 2024 sono stati identificati i centri che parteciperanno allo studio RESOLVIN.
- ii. **CCM\_Italia.** Abbiamo condotto ricerche sulle familial cerebral cavernous malformations (fCCM) esplorando biomarcatori circolanti, imaging-markers e qualità della vita in pazienti affetti da questa malattia rara (Lazzaroni et al, 2024, EBioMedicine; Meessen et al, 2024, Front Neurol; Rezai Jahromi B. al, 2024, J Neurosurg). Inoltre, abbiamo ottenuto tramite il PNRR fondi per la creazione di un registro nazionale (il registro CCM\_Italia), che ci darà la possibilità di avviare un trial clinico di fase 3 sull'efficacia del propranololo.
- iii. **CPAr.** Questo studio di fase 1 è il primo studio sull'uomo volto a valutare la fattibilità e la sicurezza dell'implementazione nella pratica clinica della ventilazione polmonare con una miscela di-Argon e Ossigeno nei pazienti rianimati in seguito ad ~~da~~-arresto cardiaco. Oltre a valutare l'efficacia dell'Argon in tali pazienti, lo studio creerà una biobanca di campioni biologici per acquisire maggiori informazioni sull'arresto cardiaco. Nel 2024, il Data Safety Monitoring Board dello studio ha concluso che la somministrazione di l'Argon è sicura. Stiamo dunque procedendo all'attivazione della fase 2.
- iv. Nel 2024 abbiamo completato la preparazione della parte regolatoria per l'avvio degli studi **PRACTICAL** e **Prevention**, che recluteranno pazienti intubati in terapia intensiva. In particolare, lo studio PRACTICAL mira a identificare la strategia di ventilazione meccanica ottimale, mentre lo studio Prevention testerà l'efficacia della terapia vasopressoria preventiva per ridurre gli eventi di collasso cardiovascolare nei pazienti intubati. Nel 2024 sono inoltre cominciati i trial **iCARE4CVD** e **CVRiskIT**, entrambi gestiti da grandi consorzi composti da oltre 20 centri. I due progetti mirano a sfruttare i big data per ottimizzare il trattamento delle malattie cardiovascolari. iCARE4CVD si focalizzerà sui pazienti con insufficienza cardiaca e valuterà i percorsi di cura ottimali partendo dalla creazione di un federated database. L'utilità dell'algoritmo sviluppato grazie a questo database verrà successivamente testata in una sperimentazione clinica. Lo studio CVRISKIT si concentrerà invece sulla prevenzione, e tenterà di individuare il metodo di screening ottimale reclutando 30.000 individui senza precedenti di malattie cardiovascolari

## Bioimaging

L'unità di Bio-imaging si occupa dello studio delle alterazioni mitocondriali associate a condizioni patologiche, utilizzando modelli in vivo ed ex-vivo. Sono state descritte, tramite analisi morfologiche e funzionali, le alterazioni dei processi coinvolti nell'integrità mitocondriale sia a livello miocardico che neurologico, associate ad arresto cardiaco seguito da rianimazione cardiopolmonare. Inoltre, negli xenotrapianti derivati da pazienti e in linee cellulari di tumore ovarico resistenti al cisplatino, è stata osservata la

condensazione della matrice periferica mitocondriale, la cristolisi e il rigonfiamento massivo dei mitocondri, ad indicare che l'alterazione mitocondriale è coinvolta nella resistenza tumorale.

- Un'altra condizione patologica associata ad alterazione mitocondriale è il danno indotto da **ischemia e riperfusione che avviene negli organi destinati al trapianto** durante le fasi di espianto e conservazione. Il trasferimento di mitocondri sani è stato recentemente suggerito come una possibile strategia per ridurre il danno e accelerare il recupero, sostenendo la produzione di energia cellulare, mitigando gli effetti negativi dello stress ossidativo e migliorando la conservazione dell'organo. In collaborazione con l'Università di Udine stiamo studiando la sicurezza e l'efficacia del trapianto cardiaco di mitocondri contenuti in vescicole extracellulari in un modello animale di insufficienza cardiaca avanzata e verificheremo se è possibile ottenere l'innesto di mitocondri in cuori espantati da pazienti affetti da cardiopatia ischemica. Stiamo inoltre sviluppando, in collaborazione con il Laboratorio di Nanobiologia e il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello, un approccio innovativo per il trapianto di mitocondri sani in fegati destinati al trapianto che possa limitare il danno da ischemia e riperfusione migliorando così la conservazione dell'organo.
- Ruolo dell'emodinamica nel danno cardiovascolare. Il dipartimento di **Bioingegneria dedica la linea di ricerca *imaging nella biforcazione carotidea allo studio del moto del sangue in modelli di carotidi sane e stenotiche***. La nuova tecnica di imaging Vector Flow permette uno studio approfondito dell'emodinamica nella biforcazione carotidea con una semplice ecografia, ma questa tecnica potrà essere applicata nella routine clinica solo in seguito ad una accurata validazione. Un confronto con le nostre tecniche di fluidodinamica computazionale in modelli di carotidi ci ha permesso di mostrare che il Vector Flow Imaging fornisce una corretta e dettagliata visualizzazione delle porzioni vascolari caratterizzate da flusso sanguigno instabile. Ci proponiamo di contribuire all'ottimizzazione e validazione della nuova tecnica ecografica per favorirne l'ingresso nella pratica clinica.

## Prevenzione cardiovascolare

- Valutazione dei percorsi assistenziali di soggetti a rischio cardiovascolare (**EPIFARM**). La finalità principale di questo progetto del laboratorio di prevenzione cardiovascolare, realizzato nell'ambito di una convenzione stipulata tra Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS e la Regione Lombardia, è quella di analizzare i dati sulla prevalenza, incidenza ed evoluzione nella gestione e cura delle malattie cardio-renali, con particolare attenzione ai pazienti diabetici, soggetti ad alto rischio di complicanze cardiovascolari e mortalità rispetto alla popolazione generale. A questo scopo viene analizzato il database della Regione Lombardia che contiene i dati di circa 10 milioni di residenti, per i quali si hanno a disposizione i dati sull'anagrafica, sulla farmaceutica, sui ricoveri, sul pronto soccorso, e sulle prestazioni ambulatoriali dal 2000 al 2022. Attraverso il cross-linkage di queste informazioni, in maniera anonimizzata, è possibile tracciare il profilo epidemiologico-assistenziale dei pazienti con malattie cardiovascolari conducendo delle analisi farmaco-epidemiologiche e di valutazione degli eventi clinici (outcomes), di real-world su un'ampia popolazione di soggetti residenti in regione Lombardia. L'uso di database sanitari amministrativi Questo permette, pertanto, di studiare popolazioni non selezionate (studi di real-world), a differenza di quanto accade negli studi clinici randomizzati dove alcune categorie di pazienti sono escluse o sono poco rappresentate (ad esempio gli anziani o le donne). Inoltre, avendo a disposizione diversi anni di osservazione è possibile seguire, monitorare e analizzare gli eventi clinici nel tempo le popolazioni.

- **Lo studio SKIM.**

Progetto nell'ambito della prevenzione cardiovascolare primaria, in Medicina Generale, ha lo scopo di facilitare la stima del rischio cardiovascolare nella popolazione generale. Sebbene lo screening sia raccomandato in tutti i soggetti di età superiore a 40 anni, tuttavia, ad oggi questo richiede un dispendio di tempo e di risorse e non sempre si dimostra efficace nel ridurre gli eventi cardiovascolari. Pertanto, l'obiettivo dello studio SKIM è quello di sviluppare un algoritmo di pre-screening, non basato su misure di laboratorio, per ottimizzare i programmi di screening cardiovascolare nella popolazione generale e poter così concentrare le limitate risorse nella prevenzione dei soggetti ad alto rischio. Il target previsto di soggetti da includere è di 3000.

Il progetto è finanziato dal Ministero della Salute, nell'ambito del Bando Ricerca Finalizzata 2016. Lo studio si è concluso il 31.07.2024. Sono stati poi analizzati i dati e i risultati presentati come report finale al Ministero della Salute. Saranno successivamente pubblicati i risultati dello studio.

- **Lo studio osservazionale PAD&CAD.**

in medicina generale ha l'obiettivo di conoscere la prevalenza dell'arteriopatia periferica nei pazienti con coronaropatia, mediante la misurazione della pressione arteriosa alla caviglia e al braccio. Il rapporto ottenuto da queste due misure dà un valore che è predittivo della presenza di arteriopatia periferica. Lo studio ha anche l'obiettivo di descrivere: profilo clinico, fattori di rischio cardiovascolari, terapia e eventi clinici in questa popolazione. Il target previsto di soggetti da includere nello studio era di 1000 pazienti, seguiti per un anno dall'inizio dell'inclusione nello studio. Il progetto è stato finanziato in parte e in maniera

incondizionata da Bayer SpA Italia. Lo studio si è concluso a novembre 2023, con il termine delle visite di follow-up. I risultati dello studio PAD&CAD sono stati quindi analizzati e quindi pubblicati sulla rivista Intern Emerg Med. 2024.

- **Lo studio CVRISK-IT**

È un progetto di ricerca sui nuovi approcci innovativi di predizione del rischio per la prevenzione primaria di malattie cardiovascolari in Italia nei soggetti sani (senza pregresse malattie CV o diabete). Il progetto si articola in due fasi: a) fase I di screening della popolazione per la valutazione del profilo di rischio CV (utilizzando gli score tradizionali per la stima del rischio CV); b) fase II con l'obiettivo di valutare i benefici e gli effetti dell'integrazione di informazioni complementari, derivanti da dati genetici o di imaging, per tracciare meglio il profilo del rischio CV. A ciò vi si aggiungono approcci "patient-targeting" utilizzando programmi educazionali/nutrizionali personalizzati (ed eventuale intervento terapeutico), finalizzati al miglioramento dello stile di vita del partecipante, correggendo così i fattori di rischio.

CVRISK-IT è stato promosso dalla Rete Cardiologica (RC) e finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito della prevenzione CV. Al progetto partecipano 17 IRCCS della RC nazionale, tra cui l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, responsabile anche del coordinamento delle attività per i centri partecipanti a livello territoriale. Nella fase I dello studio saranno inclusi 30.000 soggetti di cui 12.000 parteciperanno anche alla fase II. CVRISK-IT è stato approvato dal Comitato Etico Coordinatore del Policlinico San Donato ed è in fase di valutazione presso i Comitati Etici di competenza per gli altri centri partecipanti.

- **Il progetto CV PREVITAL.**

progetto nell'ambito della prevenzione cardiovascolare primaria, si inserisce in uno studio più generale che coinvolge a livello nazionale i Medici di Medicina Generale (MMG) e i medici degli IRCCS della Rete Cardiovascolare. L'obiettivo dello studio è valutare l'efficacia di un intervento di prevenzione cardiovascolare attraverso l'uso di un approccio digitale (m-Health) rispetto a quello standard. Nello studio sono inclusi i soggetti in prevenzione primaria dotati di uno smartphone su cui possono scaricare l'applicazione di m-Health, disegnata ad hoc per il monitoraggio, l'educazione e la gestione dei più importanti fattori di rischio e per rilevare e modificare gli stili di vita scorretti (scorretta alimentazione, inattività fisica, fumo) attraverso messaggi periodici personalizzati. Il Centro cardiologico Monzino IRCCS è il coordinatore dello studio e l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri è il referente per il coordinamento MMG che partecipano al progetto. Lo studio è finanziato dal Ministero della Salute e nasce su indicazione del Parlamento. La fase di inclusione dei soggetti si è conclusa ed è in corso il follow-up dello studio.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELLE MALATTIE RARE

L'Istituto Mario Negri ha aggiunto alle sue tradizionali linee di ricerca l'interesse per le malattie rare sin dal 1992, quando ha inaugurato il Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare presso la sua sede di Ranica (BG) e ha dato nuovo slancio alle ricerche sulle malattie rare all'interno dei diversi Dipartimenti nelle sedi di Milano e Bergamo.

Particolare impulso è stato dato all'organizzazione di Registri di patologia, quali strumenti utili non solo a raccogliere dati epidemiologici, ma anche per costituire banche di dati e di campioni biologici indispensabili allo sviluppo della conoscenza delle malattie e potenzialmente del loro trattamento. Le prime raccolte di campioni biologici da parte dell'Istituto sono state organizzate agli inizi degli anni '90. Negli anni successivi, queste collezioni di campioni biologici si sono trasformate in vere e proprie Biobanche, nel rispetto dei livelli di qualità e di sicurezza nel trattamento dei dati sensibili richiesti dalle normative e dalle linee guida. Attualmente le diverse Biobanche sono strutturate in un Centro di Risorse Biologiche (CRB) certificato.

Queste attività di raccolta dati sono parte essenziale nello sviluppo di trials clinici per testare l'efficacia di nuovi approcci terapeutici, sia direttamente - coinvolgendo pazienti accolti nella sede di Ranica - sia svolgendo un ruolo di coordinamento per studi multicentrici nazionali e internazionali.

L'Istituto è stato identificato fin dal 2001 da Regione Lombardia quale Centro di Coordinamento della Rete regionale malattie rare. Tale provvedimento, riconfermato in successive delibere di aggiornamento e ridefinizione della Rete (ultima DGR N° XII/2443 del 03/06/2024) attua a livello regionale il dettato del Decreto Ministeriale N° 279 del 2001 che ha istituito la Rete Nazionale per le Malattie Rare, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS). La sede di Ranica dell'Istituto ha acquisito la Certificazione UNI EN 9001/2015 per "Erogazione di prestazioni sanitarie in regime di day-hospital e ambulatoriali" e per "erogazione di prestazioni di laboratorio generale e specializzato", sia per le attività cliniche che per quelle di ricerca (Certificato n: 27361 del 02/07/2019 settore IAF 38 e 34 rilasciato da Certiquality).

Vengono di seguito riepilogate le principali linee di ricerca volte allo studio di specifiche malattie rare.

- **Microangiopatie trombotiche**

La Sindrome Emolitico Uremica (SEU) e la Porpora Trombotica Trombocitopenica (PTT) sono malattie rare caratterizzate da anemia emolitica, diminuzione del numero delle piastrine ed occlusione trombotica dei piccoli vasi (microangiopatia trombotica), con prevalente coinvolgimento dei reni nella SEU e del sistema nervoso nella PTT. Nella loro forma tipica e nell'80-90% dei casi, SEU e PTT si manifestano con un evento acuto seguito da guarigione

senza conseguenze; ciò può avvenire spontaneamente (come in molti casi di SEU infantile, associata ad infezione gastrointestinale) oppure dopo infusione di plasma o plasmateresi. Alcuni pazienti vanno invece incontro ad una remissione transitoria, seguita da ricadute che comportano lo sviluppo di danni renali o neurologici permanenti (forme ricorrenti). Esistono inoltre varianti estremamente rare di SEU/PTT, denominate familiari, in cui sono colpiti almeno due soggetti nella stessa famiglia.

L'Istituto Mario Negri si è sempre interessato di SEU/PTT. Di seguito vengono riassunte le attività più recenti in questo ambito:

- i. Caratterizzazione di anomalie genetiche in SEU.** Grazie ai nostri studi, le analisi molecolari hanno permesso di dimostrare che nella maggior parte dei casi di SEU atipica (aSEU) è presente una predisposizione genetica, ovvero un'anomalia genetica in uno o più fattori di regolazione del complemento (Fattore H, Fattore I, Proteina Cofattore di Membrana, componente C3 del complemento, Fattore B, Trombomodulina, geni *CFH-related*) e che in bambini con esordio precoce (< 1 anno di età) le mutazioni possono essere a carico della diacilglicerolochinasi  $\epsilon$  (DGK $\epsilon$ ). Questi studi hanno inoltre dimostrato che il fenotipo clinico, la risposta al trattamento, la prognosi a lungo termine ed il risultato dell'eventuale trapianto di rene sono influenzati dalle diverse anomalie genetiche. I dati raccolti hanno anche fornito il razionale per nuove terapie, quali la plasmateresi a scopo preventivo, il trapianto combinato fegato-rene ed il trattamento con eculizumab per curare la aSEU e per prevenire o trattare in modo efficace le recidive della malattia dopo trapianto renale (Kavanagh et al., *Kidney Int.*, 2024). Più in generale, gli attuali progetti hanno l'obiettivo di chiarire le conseguenze funzionali delle diverse mutazioni e le loro interazioni con fattori genetici ed ambientali per spiegare l'estrema eterogeneità dei quadri clinici osservati anche nell'ambito di nuclei familiari.
- ii. Registro internazionale per le Forme Familiari e Ricorrenti di SEU e PTT.** Nato nel 1996, il Registro ha permesso di raccogliere la più ampia casistica a livello internazionale (1845 pazienti con SEU/PTT segnalati da 190 Centri italiani, europei ed extraeuropei). Ad oggi è stato possibile riconoscere un fattore genetico predisponente la malattia in circa due terzi dei casi di SEU atipica e nelle forme familiari di PTT. Sono in corso studi di sequenziamento dell'intero esoma per l'identificazione di nuovi geni responsabili di malattia.
- iii. Studi per ottimizzare il trattamento della SEU e individuare nuovi potenziali approcci terapeutici.** Grazie agli studi condotti, è oggi possibile individuare i pazienti in grado di trarre beneficio dall'utilizzo dei farmaci inibitori del sistema del complemento, ottimizzare il dosaggio e ridurre i costi – estremamente elevati – di tali trattamenti ed indirizzare i pazienti verso l'eventuale trapianto di rene, riducendo considerevolmente i rischi di ricorrenza della malattia. L'anticorpo monoclonale anti-C5 eculizumab, che blocca la cascata terminale del complemento, ha dimostrato efficacia nell'indurre la remissione e prevenire recidive della SEU atipica (aSEU) sia in reni nativi che trapiantati. Presso i nostri laboratori è stato sviluppato un test ex-vivo per monitorare l'attivazione del

complemento e personalizzare il trattamento con eculizumab in pazienti con aSEU, che ha permesso di iniziare nuovi studi per valutarne la riduzione o sospensione in sicurezza. Utilizzando questo test, abbiamo valutato lo stato di attivazione del complemento sulle cellule endoteliali in pazienti con TMA post-trapianto di rene, una complicazione molto severa del trapianto che può presentarsi come una ricorrenza di aSEU o de novo. Questo test riesce a diagnosticare in tempi brevi e con precisione la TMA post-trapianto di rene, sia quando è dovuta ad una ricorrenza di aSEU sia quando si presenta de-novo (Aiello et al., *Kidney. Int. Reports.*, 2024). In un altro studio utilizzando lo stesso test abbiamo voluto monitorare l'efficacia di ravulizumab, un anticorpo anti-C5 di lunga durata derivato da eculizumab, nell'inibire la formazione di C5b-9 endoteliale. Abbiamo incluso 5 pazienti con aSEU in remissione che erano passati da eculizumab a ravulizumab. I sieri sono stati raccolti 2 settimane dopo l'ultima dose di eculizumab e 2 e 8 settimane dopo la prima e la seconda dose di ravulizumab, rispettivamente. I risultati dimostrano che la formazione di C5b-9 indotta dal siero aSEU si è completamente normalizzata durante il trattamento con eculizumab e si è mantenuta tale dopo il passaggio al ravulizumab. Questa analisi fornisce la conferma che ravulizumab è efficace quanto eculizumab nel controllare l'attivazione terminale del complemento nell'aSEU. Il saggio della formazione di C5b-9 indotta dal siero su HMEC-1 può aiutare a monitorare la risposta alla terapia anti-C5 e ad adattare la dose e il regime del farmaco.

- iv. **Studio aHUS-iPSC-EC.** La remissione clinica nella aSEU si basa sulla valutazione dell'efficienza di inibizione del complemento a livello endoteliale. Per questo studio abbiamo ottenuto cellule endoteliali a partire da cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) di pazienti con aSEU, che sono portatori di mutazioni nei geni MCP e DGKE. Il progetto aSEU-iPSC-EC (PNRR-MR1-2022-12375758), eseguito dal nostro Istituto in collaborazione con l'A.O.U. Policlinico S. Martino di Messina, pone i seguenti obiettivi: i) generare cellule endoteliali derivate da iPSC ottenute a partire da cellule mononucleate del sangue periferico di pazienti con mutazioni nei geni MCP o DGKE e caratterizzarle per l'espressione delle proteine mutate; ii) valutare come le proteine mutate influenzino l'attivazione del complemento a livello della superficie endoteliale, il fenotipo e la funzionalità endoteliale; iii) identificare in vitro terapie personalizzate in grado di correggere il danno a livello endoteliale in iPSC-EC di pazienti affetti da aSEU con mutazioni nei geni MCP o DGKE. Verranno selezionati pazienti adulti e pediatrici con una diagnosi di aSEU e portatori di mutazioni nei geni MCP o DGKE, tra quelli inclusi nel Registro Internazionale di SEU/PTT coordinato dal nostro Istituto e tra quelli reclutati dal team del Policlinico S. Martino. In particolare, i ricercatori del Policlinico selezioneranno nuovi pazienti attraverso lo screening clinico e genetico degli abitanti di una piccola isola del Sud Italia (Linosa) con un'alta incidenza di pazienti affetti da mutazioni in DGKE e caratterizzati da un alto tasso di endogamia. Lo studio è stato autorizzato dai Comitati Etici e sono stati raccolti i campioni dei soggetti che hanno firmato il consenso. Sono attualmente in corso le analisi previste da protocollo.
- v. **Sviluppo di una terapia cellulare per la PTT congenita (cPTT).** La terapia attuale per la cPTT consiste in infusioni di plasma ogni 2-4 settimane, che espongono i pazienti a

diverse complicazioni quali reazioni allergiche e anafilattiche e al rischio di infezioni che ne limitano notevolmente la qualità della vita. Il progetto si propone di sviluppare un nuovo approccio terapeutico basato sulla generazione di un mini-fegato universale in provetta che una volta trapiantato sia in grado di rilasciare in circolo costanti livelli terapeutici di ADAMTS13 proteggendo il paziente da eventuali ricadute. Sono state generate iPSC universali, ovvero invisibili al sistema immunitario del paziente, dalle quali abbiamo derivato un organoide di fegato composto da epatociti, cellule stellate epatiche che esprimono ADAMTS13, e cellule endoteliali. La capacità di questo mini-fegato in provetta nel rilasciare la proteina ADAMTS13 funzionale verrà valutata trapiantandolo in un modello sperimentale di cPTT generato in Danio rerio.

- vi. Effetto di una mutazione in eterozigosi nel fattore H del complemento sullo sviluppo della SEU.** In pazienti con aSEU si riscontrano anomalie genetiche nelle proteine regolatrici del complemento che compromettono la loro capacità di proteggere le cellule endoteliali da un'attivazione incontrollata del complemento stesso. In particolare, mutazioni nel gene del Fattore H, una proteina prodotta dal fegato che regola l'attivazione del complemento, causano gravi conseguenze sull'organismo. In un recente studio, abbiamo confrontato topi con una mutazione in eterozigosi nel Fattore H ( $FH^{WR}$ ) e topi wild-type ( $FH^{WW}$ ) per valutare se un difetto parziale nella regolazione del Fattore H potesse esacerbare gli effetti patogenetici dell'attivazione del complemento e lo sviluppo di trombosi in risposta a Stx2/LPS. Nei topi con la mutazione del Fattore H si è osservato un peggioramento dell'insufficienza renale, della trombocitopenia e una maggiore trombofilia, con formazione di numerosi trombi, soprattutto nel fegato e nei polmoni, non osservati nei topi  $FH^{WW}$ . La mutazione ha aumentato l'attivazione del complemento, in particolare la formazione del complesso di attacco di membrana C5b9 che distrugge le cellule endoteliali, e l'espressione del recettore dell'anafilotossina C5a (C5aR) nei capillari peritubulari renali. L'alterata regolazione del complemento nei topi  $FH^{WR}$  ha determinato un incremento della produzione dell'anafilotossina C5a, che attrae e attiva i leucociti, portando a un'accentuata risposta infiammatoria in vari organi rispetto ai topi  $FH^{WW}$ . La mutazione nel Fattore H del complemento predispone quindi ad una maggiore severità della malattia. Sulla base di questi risultati, abbiamo testato il trattamento con un antagonista del recettore del C5a e valutato i suoi effetti in diversi organi. A livello renale il trattamento ha determinato un miglioramento della sua funzione, riducendo la formazione dei trombi e dei depositi di complemento. Inoltre è stato osservato un minor accumulo di cellule infiammatorie. L'inibizione del recettore del C5a ha ridotto significativamente anche la formazione di trombi e l'infiammazione sia nel fegato che nei polmoni. Questi risultati suggeriscono il blocco dell'asse C5a-C5aR come possibile nuovo target per il trattamento della SEU.
- vii. Ruolo del complemento nelle malattie renali croniche.** L'attivazione non controllata del complemento può essere causa o contribuire al danno glomerulare in molte malattie renali (Buell et al., Nephron, 2024). Sebbene l'attivazione del complemento abbia un ruolo causale nella SEU e C3G, negli ultimi anni si sono raccolte evidenze di un ruolo dell'attivazione del complemento anche in molte altre malattie, ad esempio diverse

glomerulopatie infiammatorie e la DKD. Nello stesso periodo hanno fatto la loro comparsa in clinica nuovi farmaci inibitori del complemento. Esperti internazionali in collaborazione con l'Istituto Mario Negri hanno recentemente rivisto le evidenze oggi disponibili a supporto del ruolo causale o secondario del complemento nella progressione di molte malattie renali, e discusso in un lavoro come queste evidenze possono in un prossimo futuro aprire la strada a nuovi approcci terapeutici, oltre a identificare potenziali biomarcatori per monitorare il corso della malattia e la risposta ai nuovi trattamenti proposti (Vivarelli et al., *Kidney Int.*, 2024).

- **Glomerulonefrite membranoproliferativa e C3 Glomerulopatia**

La glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN) e la C3 glomerulopatia (C3G) sono nefropatie progressive a prognosi sfavorevole con una sopravvivenza renale a 10 anni del 50-60%. L'alterata regolazione del sistema del complemento gioca un ruolo importante nella loro patogenesi, sia attraverso la via classica (attivata dagli immunocomplessi), sia attraverso la via alternativa. Per molte delle varianti di MPGN/C3G sono state descritte forme familiari e questo suggerisce che anomalie genetiche possano predisporre lo sviluppo. Tra i pazienti che hanno sviluppato un'insufficienza renale terminale come conseguenza di MPGN/C3G, gli studi si propongono di identificare - come già avvenuto per le microangiopatie trombotiche - i casi con potenziale maggiore rischio di recidiva post-trapianto, per attuare misure di prevenzione.

Il nostro Centro è attivamente impegnato nello studio di MPGN/C3G, sia dal punto di vista dell'approfondimento della patogenesi, sia per testare nuovi approcci terapeutici (Noris & Remuzzi, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2024; Nester et al, *CJASN*, 2024). Le attività si svolgono in collaborazione con altri Centri di rilievo internazionale e nell'ambito dell'*European Complement Network* (<http://www.ecomplement.org/>).

- i. **Registro delle MPGN/C3G.** Nato nel 2006, il Registro ha permesso di raccogliere i campioni biologici di 654 pazienti, oltre che dei loro familiari, grazie al coinvolgimento di 35 centri italiani e 15 centri stranieri. In circa il 18% dei casi è stato possibile identificare nell'ambito del sistema del complemento un fattore genetico predisponente lo sviluppo della malattia. Nell'ultimo decennio, la classificazione di queste malattie è stata revisionata più volte. Quella attuale, basata sulla composizione dei depositi osservati con l'immunofluorescenza nella biopsia renale, distingue le forme con coinvolgimento della via classica del complemento (IC-MPGN) da quelle mediate da un'attivazione della via alternativa (C3G). Studi recenti, ai quali il nostro Centro ha contribuito in modo determinante, hanno tuttavia dimostrato che l'attivazione della via alternativa del complemento è coinvolta anche nelle IC-MPGN. Abbiamo inoltre osservato che alcune varianti genetiche comuni sinergizzano con le mutazioni nel predisporre alla malattia. Oltre ai fattori genetici, autoanticorpi che legano e stabilizzano le convertasi della via alternativa del complemento (C3NeFs, C5NeFs) e altri autoanticorpi (anti-FH, anti-FB, anti-C3b, anti-CR1 e anti-FI) sono stati riscontrati sia in pazienti con IC-MPGN (circa 40%) che in pazienti con C3G (circa 50%). Questi dati, uniti alle evidenze che la diagnosi istologica può modificarsi da IC-MPGN a C3G o viceversa in occasione di ripetute biopsie renali ed alla presenza di diversi quadri istologici in membri della stessa famiglia, indicano che alterazioni della via alternativa del complemento sono coinvolte sia nelle IC-MPGN

che nella C3G e sottolineano i limiti dell'attuale classificazione. Recentemente sono state introdotte tecniche di analisi dei dati, conosciute come *cluster analysis*, che esplorano la possibilità di suddividere i pazienti con una determinata patologia in gruppi relativamente omogenei, caratterizzati da specifici meccanismi fisiopatogenetici. Il nostro gruppo ha applicato la cosiddetta *unsupervised cluster analysis* (classificazione non supervisionata) quale strumento obiettivo, *data-driven*, per individuare gruppi a partire dai dati disponibili (clinici, biochimici, genetici, istologici) evitando ogni assunzione o influenza da parte dello sperimentatore. Questo approccio è stato applicato con successo alla casistica dei pazienti con MPGN/C3G raccolta grazie al Registro e ha permesso di identificare la presenza di quattro gruppi/cluster, ciascuno caratterizzato da specifici profili del complemento e quadri clinici. In aggiunta, l'analisi ha assunto un valore prognostico, dimostrando che i malati nel cluster 4 hanno maggiore probabilità di progredire verso l'insufficienza renale terminale. Tali risultati pongono le basi per una nuova classificazione basata sull'eziopatogenesi e consentiranno lo sviluppo di terapie mirate.

- ii. **Studio DECODE.** Il progetto, approvato nell'ambito della *ERAPerMed Joint Transnational Call for Proposals (2020)*, è coordinato dal nostro Istituto e vede la partecipazione di un consorzio di Centri europei. La MPGN primaria è una condizione rara attualmente distinta nelle due forme: C3G e IC-MPGN. Tale classificazione è ampiamente dibattuta e non si è dimostrata utile nello stabilire il trattamento più idoneo e la prognosi dei pazienti. Sulla base degli studi precedenti, il progetto ha implementato l'analisi di cluster combinando l'approccio con tecnologie omiche (WES, proteomica e metabolomica), riuscendo a definire criteri precisi di classificazione dei pazienti affetti da C3G/IC-MPGN. Nell'ambito del Registro attivo presso il nostro Istituto e mediante la raccolta di parametri clinici, istologici, genetici e biochimici, sono stati analizzati i dati relativi a 378 pazienti. I nostri laboratori hanno in particolare eseguito la caratterizzazione dei profili genetici, delle anomalie autoimmuni e dei parametri di attivazione del complemento. Nel complesso sono stati identificati cinque cluster di pazienti con differenti caratteristiche fenotipiche e specifico profilo di attivazione del complemento. La correlazione con i dati relativi all'esteso follow-up clinico ha permesso di identificare nei pazienti del cluster 4 quelli a maggior rischio di progressione verso l'insufficienza renale terminale, mentre la prognosi più favorevole è stata documentata per i pazienti del cluster 1. Altro dato di grande interesse, la più alta percentuale di ricorrenza della malattia dopo trapianto di rene nei cluster 1 e 2. Il progetto ha inoltre consentito la realizzazione di un sistema informatizzato user-friendly, che sarà disponibile via web, per aiutare il clinico ad identificare il cluster più vicino al proprio paziente e ad operare le idonee strategie terapeutiche. Il manoscritto con i dati relativi alla nuova classificazione e alla web application è in corso di sottomissione, mentre si è conclusa l'analisi dei dati relativi agli ulteriori obiettivi del progetto. Le analisi di proteomica e metabolomica sono state eseguite nei laboratori dei partner operativi in Grecia e Germania, con l'obiettivo di individuare biomarker specifici per ciascun cluster. Il terzo obiettivo del progetto è stato quello di identificare potenziali terapie specifiche per i pazienti di ciascun cluster. Tale ipotesi è stata testata analizzando l'effetto del siero dei pazienti e l'azione dei farmaci inibitori del complemento in diversi modelli di studio (fase

fluida, fase solida e cellule renali). I risultati ottenuti saranno cruciali per il successo dei trial con farmaci innovativi ed aiuteranno i clinici ad offrire ai loro pazienti una maggiore possibilità di terapie personalizzate. Un ulteriore work package del progetto DECODE ha preso in considerazione i bisogni e le preoccupazioni dei pazienti e dei loro genitori per capire come organizzare al meglio i prossimi studi clinici e migliorarne sia la qualità che l'efficacia complessiva. I risultati sono stati recentemente pubblicati (Cave et al., Rare, 2024).

- iii. **Studio COMPRare.** I test diagnostici in grado di rilevare le anomalie genetiche e/o acquisite nel sistema del complemento variano in modo considerevole da laboratorio a laboratorio e non sempre sono conclusivi. Da qui la necessità di sviluppare test diagnostici accurati e standardizzati, in particolare quelli per la rilevazione dei C3NeFs, autoanticorpi che legano e stabilizzano la C3 convertasi. Nella aSEU e nella C3G vengono spesso trovate varianti di significato incerto (VUS)/varianti probabilmente patogenetiche (LPV) nei geni del sistema del complemento. Una rapida e funzionale identificazione e interpretazione delle VUS/LPV potrebbe aiutare a comprendere meglio la patofisiologia di queste due malattie rare e influenzarne così la diagnosi e il trattamento. Attualmente, i pazienti affetti da aSEU vengono trattati efficacemente con eculizumab e ravlizumab, due anticorpi monoclonali che bloccano il fattore C5 del complemento. Tuttavia, la durata e le dosi ottimali del trattamento sono ancora argomento di grande discussione, soprattutto a fronte dell'elevato costo dei farmaci. Nonostante studi recenti abbiano dimostrato una possibile restrizione nell'utilizzo di eculizumab, vi è una chiara necessità di identificare ulteriori biomarcatori e stabilire nuovi protocolli per il monitoraggio e il follow-up dei pazienti affetti da aSEU e C3G. Questo studio fa parte del progetto COMPRare (COMPLEMENT-mediated Rare kidney diseases), finanziato nell'ambito del programma EJP RD (European Joint Programme on Rare Diseases) ed è condotto da un consorzio scientifico a cui prendono parte 7 Paesi europei. I ricercatori del nostro Istituto che partecipano al progetto hanno l'obiettivo di sviluppare strumenti specifici per permettere la diagnosi precoce e monitorare le fasi della malattia nei pazienti affetti da aSEU e C3G e valutare l'efficacia, la dose e la durata delle cure. Inoltre, poiché l'identificazione e la caratterizzazione delle VUS/LPV (per lo più eterozigoti) rimangono una sfida aperta a causa della scarsità di studi funzionali, i nostri ricercatori hanno l'obiettivo di studiarle e caratterizzarle funzionalmente.
- iv. **Studio UNEARTH.** Lo studio prende spunto dall'ipotesi, supportata da robusti dati preliminari, che le anomalie genetiche associate alle IC-MPGN/C3G abbiano effetti eterogenei sull'attivazione del complemento, sia in fase fluida che sulla superficie cellulare, comportando anomalie funzionali e strutturali della barriera di filtrazione glomerulare e, in particolare, dei podociti. Gli obiettivi specifici sono: i) caratterizzare le conseguenze delle anomalie identificate in C3 e CFH-CFHRs, i geni più frequentemente alterati nelle IC-MPGN/C3G, in relazione all'attivazione del complemento nella fase fluida e sulle cellule glomerulari; ii) analizzare gli effetti delle anomalie genetiche di C3 e CFH-CFHRs su fenotipo, funzioni podocitarie e sul *crosstalk* endotelio-podocita; iii) determinare gli effetti delle alterazioni del gene IQGAP1, recentemente identificati, su struttura e

funzione dei podociti, nonché sull'attivazione secondaria del complemento; iv) valutare l'effetto degli inibitori che agiscono a differenti livelli e su diversi componenti del sistema del complemento, al fine di prevenirne la deposizione e correggere la disfunzione dei podociti indotta dalle specifiche anomalie genetiche di C3, CFH-CFHR e IQGAP1 identificate nei nostri pazienti con IC-MPGN/C3G. I risultati di questo studio, che prevedeva l'utilizzo dei campioni biologici relativi a 23 pazienti, hanno consentito di caratterizzare i determinanti molecolari coinvolti nella patogenesi di IC-MPGN/C3G e di caratterizzare le conseguenze funzionali del deficit genetico di IQGAP1 sulla funzione del podocita e sulla deposizione di fattori del complemento.

Attualmente non esiste una terapia specifica per IC-MPGN/C3G. Negli ultimi anni, il successo dell'eculizumab nel trattamento di altre malattie complemento-mediate ha stimolato l'interesse dell'industria farmaceutica per lo sviluppo di inibitori che abbiano come bersaglio varie componenti della cascata del complemento. Tuttavia, non è attualmente noto quali pazienti potrebbero beneficiare della terapia con eculizumab e quali invece necessitino di un "blocco" ad un livello iniziale della cascata del complemento. Il nostro Centro partecipa inoltre ai seguenti studi clinici internazionali con nuovi farmaci inibitori del complemento in C3G o IC-MPGN, per alcuni dei quali sono disponibili risultati preliminari.

- i. **Studio LNP023 (iptacopan) in C3G.** Si tratta di uno studio in aperto, non randomizzato, sull'efficacia, farmacocinetica, farmacodinamica, sicurezza e tollerabilità di LNP023 in due popolazioni di pazienti con C3G. Questo studio, che prevede il trattamento con un inibitore del Fattore B, ha incluso sia pazienti con ridotti livelli di C3 nel sangue e un quadro di C3G sui reni nativi (coorte A), sia pazienti con C3G che dopo il trapianto hanno avuto una recidiva della malattia (coorte B). L'obiettivo principale per i pazienti non trapiantati era testare l'efficacia del trattamento per somministrazione orale nella riduzione della proteinuria, mentre per i pazienti trapiantati era quello di verificare una eventuale riduzione del deposito di C3 nelle biopsie renali. Lo studio valutava inoltre l'effetto di dosi da impiegare in un successivo trial di fase III. Il nostro Centro ha arruolato tre pazienti nella coorte A (malattia su reni nativi) ed un paziente nella coorte B (recidiva di malattia su rene trapiantato). I risultati ottenuti hanno dimostrato una significativa efficacia del farmaco nel ridurre la proteinuria e normalizzare i livelli di C3 nei pazienti con malattia sui reni nativi e nel ridurre i depositi di C3 sui reni trapiantati, mantenendo un profilo favorevole per quanto riguarda sicurezza e tollerabilità. I risultati dello studio di estensione sono in fase di pubblicazione.
- ii. **Studio APPEAR-C3G.** Studio multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, a gruppi paralleli, controllato verso placebo per valutare l'efficacia e la sicurezza di iptacopan (LNP023) nella glomerulopatia da C3. Al termine del 2024, il nostro Centro Clinico ha arruolato 7 pazienti.  
Terminati i periodi di trattamento attivo con Iptacopan previsti dai due trial, 9 dei pazienti arruolati proseguono ora il trattamento nell'ambito di un comune protocollo di estensione.
- iii. **Studio NOBLE:** Studio randomizzato, controllato, in aperto, di fase II per valutare la sicurezza e l'efficacia di pegcetacoplan nel trattamento della recidiva post-trapianto di

C3G o IC-MPGN. Pegcetacoplan è un peptide ciclico sintetico coniugato ad un polimero di polietilenglicole che si lega specificamente al C3 ed al C3b, bloccando tutte e tre le vie di attivazione del complemento. Il nostro Centro Clinico, unico attivato in Italia, ha contribuito al numero massimo di 13 soggetti previsti dal protocollo. I risultati in termini di riduzione della attivazione del sistema del complemento a livello renale, recentemente pubblicati, evidenziano una risposta significativa a 12 settimane dall'inizio del trattamento (Bomback et al., *Kidney Int. Rep.*, 2024). Dati preliminari confermano l'efficacia ad un anno per quanto riguarda i parametri di risposta clinica.

- iv. **Studio VALIANT.** Studio di fase III, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco e multicentrico volto a valutare l'efficacia e la sicurezza di pegcetacoplan in pazienti affetti da C3G o MPGN da immunocomplessi. Lo studio, iniziato nel 2022, si basa sull'arruolamento di circa 80-100 pazienti grazie al coinvolgimento di oltre 100 centri di ricerca a livello globale. Ad oggi, questo studio è l'unico che prevede l'arruolamento di pazienti a partire dai 12 anni di età. Il nostro Centro Clinico ha contribuito con tre pazienti adolescenti e tre adulti.

Altri studi per chiarire la patogenesi di IC-MPGN/C3G e la risposta a specifici trattamenti.

- i. **Studio CPV-104/C3G.** Studio pilota per testare l'efficacia del fattore H ricombinante CPV-104, per antagonizzare la stabilizzazione della C3 convertasi della via alternativa da parte di fattori nefritici (C3NeF) di pazienti con C3G. Il CPV-104 è una versione ricombinante del fattore H umano prodotto nel muschio, in fase di sviluppo clinico da parte di Eleva GmbH. Grazie all'ottimizzazione del modello di glicosilazione, il CPV-104 è un analogo/equivalente del FH umano. Il Fattore H ricombinante, inibendo la formazione della C3 convertasi e favorendo la sua dissociazione, potrebbe essere un approccio terapeutico efficace per la C3G. Potrebbe correggere l'iperattivazione del complemento C3G minimizzando il rischio di infezioni, rappresentando così un'alternativa promettente e sicura agli inibitori non selettivi attualmente in fase di studio. Nel nostro laboratorio abbiamo messo a punto un saggio, che rileva e quantifica specificamente la formazione e il decadimento spontaneo e mediato dall'FH della C3 convertasi. Abbiamo sfruttato questo saggio per studiare la formazione e il decadimento anomalo della C3 convertasi in pazienti con C3G e C3NeF, utilizzando proteine del complemento purificate e IgG isolate dal siero dei pazienti. Rispetto alle IgG di controllo, l'aggiunta alla reazione di quantità uguali di IgG provenienti da pazienti con C3NeF+ C3G ha provocato la formazione di una maggiore quantità di C3 convertasi e ne ha inibito la dissociazione. L'FH ricombinante, CPV-104, è risultato efficace nell'antagonizzare l'attività stabilizzante dei NeF sulla formazione e il decadimento della C3 convertasi AP.
- ii. **Studio LNP023/IC-MPGN.** Studio pilota per testare l'efficacia dell'inibitore del fattore B, iptacopan nel bloccare l'attivazione della via alternativa del complemento nel siero di pazienti con IC-MPGN. Iptacopan (LNP023) è una piccola molecola attiva per via orale che si lega ai fattori B e Bb. Iptacopan inibisce specificamente l'attività enzimatica della C3 convertasi, bloccando la scissione del C3 e l'attivazione della via alternativa. Nel

nostro laboratorio abbiamo messo a punto un saggio su micropiastra che genera in modo specifico una C3 convertasi della via alternativa funzionalmente attiva a utilizzando il siero umano come fonte di complemento. I prodotti della C3 convertasi attiva sono misurati nel surnatante. Con questo assay abbiamo valutato l'efficacia di iptacopan per correggere in vitro l'iperattività del complemento nel siero di pazienti con IC-MPGN primaria (due dosi di iptacopan corrispondenti ai livelli medi di picco e di fondo registrati dopo la somministrazione del farmaco in vivo). Complessivamente, iptacopan è stato efficace nell'inibire l'attivazione del complemento nella maggior parte (9/12) dei pazienti con IC- MPGN misurato come rilascio di C3a. Tuttavia, 3 pazienti hanno risposto parzialmente a iptacopan suggerendo che la via classica e quella delle lectine hanno contribuito in modo sostanziale all'attivazione totale del complemento. Infatti, quando MgEGTA è stato combinato con l'inibitore di FB il rilascio di C3a è stato completamente inibito in tutti i pazienti.

- iii. **Effetto renoprotettivo del silenziamento del fattore B nel fegato per trattare la C3G in un modello sperimentale nel topo.** L'attivazione anomala della via alternativa del complemento ha un ruolo patogenetico nella C3G. In un precedente studio abbiamo dimostrato che il silenziamento selettivo della sintesi di C3 nel fegato, mediante un small interfering RNA (siRNA; qui definito SLN500), riduceva i depositi di C3 nel rene e rallentava lo sviluppo delle alterazioni ultrastrutturali nei glomeruli di topi con un deficit parziale del fattore H (FH) del complemento (topi Cfh+/-), una condizione in grado di alterare il controllo fisiologico dell'attivazione di C3 e che presenta caratteristiche molto simili alla C3G nell'uomo (la perdita funzionale parziale del FH, infatti, è una condizione frequente nei pazienti affetti da C3G). Abbiamo successivamente ampliato la nostra ricerca in topi con un deficit completo del FH (topi Cfh-/-) che sviluppano una malattia più severa rispetto ai topi Cfh+/-, caratterizzata dall'attivazione incontrollata della AP del complemento e da un marcato accumulo di C3 nel rene. Nello studio recentemente pubblicato (Zanchi et al., Mol. Immunol., 2024), abbiamo analizzato l'effetto farmacologico di SLN501 (una versione ottimizzata dell'SLN500) dimostrando che l'inibizione efficace della biosintesi di C3 nel fegato dei topi Cfh-/- era in grado di limitare la disregolazione del complemento, ridurre i depositi di C3 nel rene e rallentare lo sviluppo delle alterazioni ultrastrutturali. Questi risultati, insieme alle precedenti osservazioni, offrono un'importante evidenza a favore dell'uso di siRNA, che inducono il silenziamento di C3 nel fegato, come potenziale terapia per il trattamento dei pazienti con C3G dalla perdita funzionale parziale o completa di FH.
- iv. **Valutazione dell'attività di un nuovo Fattore H plasmatico purificato da frazioni di plasma di scarto.** Sebbene il potenziale terapeutico dell'FH purificato sia stato suggerito da esperimenti in vivo in modelli animali, non è ancora disponibile un concentrato di FH approvato clinicamente. Il nostro obiettivo è stato quello di sviluppare un processo di purificazione dell'FH da una frazione di scarto piuttosto che dal plasma intero, consentendo un uso più efficiente ed etico delle donazioni di sangue e plasma. Si è ottenuta un'elevata resa di FH altamente purificato (92,07%). Il concentrato di FH è intatto e pienamente funzionale, come dimostrato da saggi funzionali in vitro. La

biodistribuzione ha rivelato una minore clearance renale ed epatica dell'FH umano nei topi Cfh<sup>-/-</sup> rispetto ai topi wild-type. Il trattamento dei topi Cfh<sup>-/-</sup> ha documentato la sua efficacia nel limitare l'attivazione del C3 e nel promuovere la clearance dei depositi glomerulari di C3 (Mori et al., Front. Immunol., 2024).

- v. **Valutazione dell'attività del fattore H del complemento umano prodotto dal muschio con glicani modificati.** Finora, il trattamento sistemico dei disturbi associati al complemento con l'FH è stato ritenuto impraticabile, principalmente a causa degli alti costi di produzione, dei rischi legati all'FH purificato dal sangue dei donatori e della difficile espressione dell'FH ricombinante in diversi sistemi ospiti. Un sistema di espressione basato sul muschio può produrre elevate rese di FH ricombinante completamente funzionale. Tuttavia, l'emivita della variante iniziale (CPV-101) era relativamente breve. Lo stesso polipeptide con glicosilazione modificata (CPV-104) raggiunge un profilo farmacocinetico paragonabile a quello dell'FH nativo derivato dal siero umano. Il trattamento di topi FH-deficienti con CPV-104 ha migliorato significativamente importanti parametri, come la normalizzazione dei livelli sierici di C3 e la rapida degradazione dei depositi di C3 nel rene, rispetto al trattamento con CPV-101. Inoltre, il CPV-104 ha mostrato una funzionalità paragonabile a quella dell'FH derivato dal siero in vitro, nonché prestazioni simili in saggi ex vivo che hanno coinvolto campioni di pazienti con aSEU e C3G (Todor Tschongov et al., Front. Immunol., 2024).

- **Sindromi nefrosiche**

La denominazione Sindrome Nefrosica (SN) si applica ad una condizione clinica caratterizzata dall'associazione di proteinuria conclamata, ipoalbuminemia, edema generalizzato e dislipidemia. Una SN può derivare dalla presenza di lesioni renali primitive o essere secondaria a malattie sistemiche. La Sindrome Nefrosica Steroideo-Resistente (SNSR) è una malattia renale rara che colpisce soprattutto bambini e giovani adulti, caratterizzata da una mancata risposta ai corticosteroidi. Attualmente, non esiste una cura specifica per questa malattia che, entro 10 anni dalla diagnosi, obbliga il 50-70% circa delle persone affette a ricorrere alla dialisi. Si pensa che molte delle forme di SN resistenti agli steroidi ed agli altri immunosoppressori siano dovute ad alterazioni genetiche delle proteine del podocita. La maggior parte delle conoscenze attuali sulle cause genetiche di SNSR deriva dagli studi di forme familiari. Oltre alle forme isolate di SNSR, sono state descritte diverse sindromi caratterizzate da SNSR con manifestazioni extra-renali, come ad esempio la sindrome di Denys-Drash, i disordini MYH9-correlati e la sindrome rene-coloboma.

Il contributo del nostro Istituto alla comprensione delle SN spazia dagli studi sperimentali, alla validazione dei biomarcatori di malattia, alla identificazione di nuovi bersagli terapeutici, grazie anche a collaborazioni internazionali.

- i. **Registro delle sindromi nefrosiche.** Gli studi condotti negli ultimi anni hanno dimostrato che la SNSR può essere causata da mutazioni in diversi geni che codificano per proteine importanti per la funzione e la struttura dei podociti. Nella maggior parte dei casi di SNSR, tuttavia, le cause rimangono sconosciute. L'obiettivo generale del Registro, istituito nel 2007, è l'individuazione di nuovi fattori genetici associati alla malattia. La successiva caratterizzazione funzionale delle proteine codificate permette di acquisire conoscenze

sulle funzioni della barriera filtrante del glomerulo renale e di capire le conseguenze delle loro alterazioni per disegnare terapie specifiche ed evitare l'uso di farmaci inefficaci e tossici. Inoltre, l'individuazione di portatori di mutazioni nelle famiglie permette di intervenire prima che si manifestino i sintomi con terapie preventive. Fino ad oggi, nell'ambito di diversi progetti, sono stati raccolti le storie cliniche ed i campioni biologici di 765 pazienti, oltre che dei loro familiari, grazie al coinvolgimento di 36 Unità di Nefrologia italiane e di 14 internazionali. Un'alterazione genetica è stata identificata in circa il 35% dei casi.

- ii. **Studio PARSEC.** Le SN primitive possono essere associate a diverse lesioni a livello renale, caratterizzate dalla fusione dei pedicelli dei podociti (visibili con la microscopia elettronica), nefropatia a lesioni minime, Glomerulosclerosi Focale Segmentaria (GSFS) o proliferazione mesangiale diffusa. Tra queste varianti, la GSFS è la malattia con la prognosi peggiore, in quanto risponde alla terapia steroidea solo nel 30% dei casi. La GSFS è inoltre la lesione renale primaria con il più alto tasso di recidiva dopo trapianto renale, che tipicamente si verifica con proteinuria (spesso in range nefrosico) in circa il 30% dei pazienti trapiantati. La recidiva tende ad essere più frequente nei bambini che negli adulti. Diversi studi suggeriscono come la GSFS idiopatica, ovvero la forma non associata a mutazioni genetiche, sia causata dalla presenza di un fattore circolante in grado di alterare la struttura e la funzione dei podociti. Sebbene siano stati fatti numerosi sforzi per identificare anomalie del sistema immunitario nei pazienti affetti da GSFS che potrebbero spiegare l'insorgenza e l'inesorabile progressione della malattia, finora non è stato possibile capire la cascata di eventi che causano la malattia. Gli obiettivi fondamentali dello studio sono: i) identificare il pattern di anomalie del sistema immunitario innato ed adattativo che caratterizzano i pazienti con recidiva di GSFS nel rene trapiantato e ii) stabilire se tali anomalie possono effettivamente spiegare la recidiva di GSFS nel rene trapiantato. Lo studio si articola in due fasi: studio caso-controllo e studio di coorte prospettico. Ad oggi sono stati arruolati 10 pazienti.
- iii. **Studio BLINDER.** La SN è uno dei maggiori "problemi irrisolti" in nefrologia e rappresenta una sfida di lunga data in termini di meccanismi patogenetici e ricerca della cura efficace. La proteinuria in range nefrosico ( $>3,5$  g/die) è accompagnata da un insieme di anomalie note collettivamente come SN. È caratterizzata da complicanze sistemiche che derivano da alterazioni della composizione del pool proteico corporeo, da ritenzione di sodio, dislipidemia, anomalie dei fattori della coagulazione e un grado variabile di insufficienza renale. Quando non è possibile identificare cause secondarie, la presentazione clinica è denominata sindrome nefrosica idiopatica (INS). L'INS è associata a scomparsa dei pedicelli dei podociti (visibili al microscopio elettronico) e da cambiamenti minimi (malattia a cambiamenti minimi, MCD) o, allo stadio più avanzato, da glomerulosclerosi focale e segmentale (GSFS) al microscopio ottico. La INS può venire trattata con corticosteroidi, i quali rappresentano il trattamento di prima linea, tuttavia, tra le forme di SN, la GSFS ha il tasso più basso di risposta alla terapia. Ancora più importante, nel 30% dei pazienti con GSFS, la recidiva della malattia si sviluppa rapidamente dopo il trapianto, a volte entro pochi minuti o ore, e porta all'immediata insorgenza di proteinuria e disfunzione del

trapianto. Per la recidiva di GSFS post-trapianto, non sono disponibili strategie di prevenzione o trattamento e gli attuali approcci terapeutici sono per lo più basati sull'esperienza clinica. La recidiva di GSFS nel rene trapiantato presuppone la presenza di uno o più fattori circolanti di origine extrarenale che possono selettivamente colpire e danneggiare la barriera glomerulare, in particolare i podociti, determinando una massiccia proteinuria. Tuttavia, l'identità, la natura e la fonte cellulare di fattori circolanti nell'INS non sono ancora note. La recente evidenza dell'efficacia terapeutica degli anticorpi anti-cellule B nell'indurre e/o mantenere la remissione nei pazienti con INS indica la presenza di una possibile disfunzione delle cellule B. A supporto di ciò, uno studio recente ha descritto la presenza di autoanticorpi anti-nefrina (un componente strutturale dello slit diaphragm podocitario) in un sottogruppo di pazienti pediatrici e adulti con MCD. Questi autoanticorpi erano presenti durante la fase attiva della malattia, e si associavano ad una colorazione puntiforme di IgG nelle biopsie renali in corrispondenza delle specifiche zone di presenza della nefrina. Inoltre, è stata riscontrata la presenza di autoanticorpi contro la nefrina nella recidiva precoce della FSGS post-trapianto. Questo risultato preliminare è stato confermato da uno studio multicentrico giapponese condotto su 11 pazienti pediatrici con recidiva di GSFS post-trapianto. In questi pazienti gli autoanticorpi anti-nefrina erano elevati sia prima del trapianto sia durante la recidiva della malattia ed erano correlati alla deposizione puntiforme di IgG che colocalizzavano con nefrina nella biopsia del trapianto al momento della recidiva. Queste recenti evidenze suggeriscono che gli anticorpi circolanti anti-nefrina rappresentano un possibile fattore circolante coinvolto nella patogenesi dell'INS, in particolare della recidiva di FSGS post-trapianto. Questo studio osservazionale ha lo scopo di: i) valutare i livelli di autoanticorpi anti-nefrina circolanti nei pazienti con INS, compresi quelli con MCD/ GSFS e nei pazienti che hanno manifestato recidiva di GSFS post-trapianto, rispetto ai gruppi controllo (pazienti con malattia renale dovuta a nefropatia membranosa primitiva (MN), con nefropatia da IgA, glomerulopatia C3 e altre glomerulonefriti mediate da immunocomplessi; volontari sani); ii) valutare se i livelli circolanti di autoanticorpi anti-nefrina nei pazienti con MCD/GSFS definiti nell'obiettivo 1 sono correlati alla risposta al trattamento con steroidi o anticorpi anti-cellule B.

- **Nefropatia membranosa**

La nefropatia membranosa (NM), principale causa di SN nell'adulto, è il risultato della deposizione di immunoglobuline IgG negli spazi subepiteliali dei capillari glomerulari. Per decenni il trattamento di questa malattia rara ha generato accese controversie in ambito nefrologico, principalmente dovute alla mancanza delle conoscenze dei meccanismi patogenetici alla base dell'insorgenza della malattia, alla variabilità nella risposta dei pazienti ai diversi approcci terapeutici utilizzati e alla necessità di bilanciare l'efficacia del trattamento con gli effetti collaterali potenziali. Circa il 70% dei pazienti affetti da NM presenta specifici autoanticorpi prodotti dai linfociti B diretti contro uno specifico antigene espresso dai podociti, il PLA<sub>2</sub>R1. Questo suggerisce quindi che la malattia sia di origine autoimmune nella maggior parte dei casi. Sulla base di questa evidenza, siamo stati i primi a mettere a punto un protocollo terapeutico per la NM che punta ad una maggiore selettività e minore tossicità rispetto alle

terapie immunosoppressive tradizionali e che si basa sull'impiego di un anticorpo monoclonale anti-CD20 (rituximab), che specificamente distrugge le cellule B coinvolte nei meccanismi che portano alla produzione di autoanticorpi che causano la NM. Negli ultimi anni, ci siamo anche concentrati sull'identificazione degli specifici autoanticorpi contro PLA<sub>2</sub>R1 che sono maggiormente coinvolti nella patogenesi della NM. PLA<sub>2</sub>R1 è una proteina estremamente grande, che presenta almeno 11 diverse porzioni che possono essere riconosciute dagli autoanticorpi. In un lavoro di recente pubblicazione abbiamo dimostrato che esiste una particolare porzione di PLA<sub>2</sub>R1, chiamata CysR, che rappresenta la principale porzione immunogenica di questa proteina (Ruggenti et al., Am. J. Kidney Dis., 2024). La capacità di rituximab di eliminare questi anticorpi specifici contro CysR era associata ad una maggior probabilità di remissione della malattia. Questo rappresenta un importante passo per chiarire quale è il principale target dell'autoimmunità nella NM, con il fine ultimo di identificare terapie più mirate per eliminare i linfociti B che producono questi autoanticorpi. Sebbene il rituximab si sia dimostrato efficace nel controllare la malattia, questa terapia può fallire nel 25-30% dei pazienti con SN e, in un numero significativo di casi, la NM può provocare un progressivo peggioramento della funzionalità renale fino alla necessità di iniziare la dialisi o ricorrere ad un trapianto di rene nell'arco di pochi anni. Quindi i nostri sforzi sono ora concentrati sull'identificazione di trattamenti delle forme resistenti.

Il nostro Istituto ha disegnato e attivato nel 2024 alcuni studi con nuovi farmaci biologici per migliorare il trattamento dei pazienti con NM. In particolare:

- i. **Studio RESTORE.** Circa il 30% di pazienti con NM sono resistenti al trattamento con rituximab o ne diventano intolleranti con reazioni da ipersensibilità dopo ripetute esposizioni al farmaco. Il nostro gruppo ha documentato la sicurezza e l'efficacia di ofatumumab (anticorpo monoclonale anti-CD20 di 2° generazione completamente immunizzato) in un paziente con NM ricorrente e SN in cui l'intolleranza a rituximab si è sviluppata in seguito a ripetuti trattamenti con quest'ultimo farmaco. Queste osservazioni ci hanno motivato ad utilizzare ofatumumab come terapia di salvataggio per pazienti intolleranti o resistenti a rituximab. In una serie di 7 pazienti intolleranti e in 3 su 10 pazienti resistenti a rituximab con follow-up mediano di 5 mesi (3.0-9.8 mesi) abbiamo documentato remissione completa o parziale della SN con ofatumumab e confrontato la sicurezza e la tollerabilità (Podestà et al., Am. J. Kidney Dis., 2024).
- ii. **Studio ORION.** Ripetute infusioni di rituximab possono provocare reazioni di ipersensibilità per cui questi pazienti non possono più essere trattati. Indipendentemente dalla risposta al trattamento, i pazienti intolleranti necessitano di una terapia alternativa efficace e sicura che riduca il rischio di ipersensibilità. D'altro canto, una percentuale significativa di pazienti che non traggono beneficio da rituximab potrebbero rispondere ad altri anticorpi anti-CD20. Una piccola percentuale di pazienti infine beneficia del trattamento con rituximab, ma ha frequenti recidive e presenta quindi quasi costantemente una proteinuria in range nefrosico (pazienti dipendenti da rituximab). Abbiamo quindi disegnato ed attivato uno studio pilota multicentrico per valutare l'efficacia di obinutuzumab (un anticorpo monoclonale innovativo anti-CD20 di 2° generazione) nell'indurre remissione della malattia in pazienti con NM intolleranti, resistenti o dipendenti

dalla terapia con rituximab. Inoltre, si valuterà se il farmaco sia sicuro e ben tollerato in queste coorti di pazienti seguiti per 24 mesi dopo il trattamento. Saranno arruolati nello studio soggetti adulti con NM primaria e proteinuria in range nefrosico, nonostante la terapia con inibitori del sistema RAS. Il farmaco è somministrato con 4 infusioni (3 dosi) nell'arco di un mese. Il reclutamento dei 20 soggetti previsti da protocollo è stato completato a gennaio 2024, tutti i pazienti sono attualmente in follow-up.

- iii. **Studio MONET.** Per i pazienti con NM resistenti o dipendenti dalla terapia con rituximab è necessario individuare nuove opzioni terapeutiche. È probabile che in questi pazienti la produzione di autoanticorpi sia sostenuta da meccanismi indipendenti dalle cellule B che esprimono l'antigene CD20. Recentemente è stato dimostrato che le plasmacellule del midollo osseo CD19 negative, le quali esprimono CD38, sono numerose nel tessuto cronicamente infiammato e secernono anticorpi. Pertanto, gli anticorpi anti-CD38 potrebbero rappresentare un nuovo approccio terapeutico per il trattamento di pazienti con NM. Abbiamo disegnato uno studio in aperto, di fase II, in cui pazienti con NM sono trattati con MOR202 (un anticorpo monoclonale umano ricombinante anti-CD38) per un totale di 9 somministrazioni in 24 settimane. I pazienti saranno seguiti per 24 mesi a partire dalla prima somministrazione del farmaco. L'obiettivo primario dello studio è valutare l'efficacia di MOR202 nel ridurre e/o eliminare l'escrezione urinaria di proteine in pazienti affetti da NM con proteinuria nel range nefrosico resistenti o dipendenti dal trattamento con anticorpi anti-CD20. Ad oggi sono stati arruolati e trattati tutti i 10 pazienti previsti. Il follow-up di 2 anni come da protocollo si concluderà a febbraio 2025.
- iv. **Studio PEPTIDE.** Questo studio consiste in un monitoraggio delle cellule B anti- PLA2R autoreattive e dei leucociti circolanti nella NM per identificare predittori di outcome e studiare i meccanismi patogenetici. Obiettivi primari dello studio sono: i) valutare la presenza di cellule B auto-reattive anti- PLA2R in pazienti con NM al basale e durante la ricostituzione delle cellule B dopo trattamento con anticorpi anti-cellule B; ii) determinare se la presenza di sottopopolazioni di cellule B anti- PLA2R è predittiva della risposta al trattamento. Si vuole, inoltre, valutare l'eventuale presenza di una alterazione specifica nei leucociti circolanti dei pazienti con NM e stabilire se una particolare popolazione leucocitaria al basale o durante il periodo di monitoraggio condizioni la risposta al trattamento con anticorpi anti-cellule B. Nello studio sono stati inclusi 68 pazienti con NM di cui verranno a breve analizzati i dati.
- v. **Studio PROMENADE.** I ricercatori dell'UOC di Medicina Renale, insieme ai medici dell'Ospedale di Bergamo, hanno documentato per primi nel 2002 che il rituximab, un anticorpo monoclonale (anti-CD20) che attacca un tipo particolare di cellule linfatiche responsabili - almeno in parte - del danno renale, era in grado di guarire totalmente o parzialmente circa il 70% dei pazienti affetti da questa malattia. Per questo il trattamento con rituximab è diventata una delle terapie di elezione per la cura della nefropatia membranosa. Negli ultimi vent'anni, l'Unità di Nefrologia dell'ASST-PG23 è diventata un Centro di eccellenza specializzato nella cura dei pazienti con nefropatia membranosa primaria (NMP), e i suoi medici, in collaborazione con il Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare Aldo e Cele Daccò" di Ranica (BG) dell'Istituto Mario Negri IRCCS, hanno

seguito nella pratica clinica più di 300 pazienti. I dati raccolti durante le visite di routine di questi pazienti rappresentano una preziosa fonte di informazioni per capire l'evolversi della storia naturale di questa malattia rara. Lo scopo dello studio PROMENADE è quello di raccogliere i dati delle visite di follow-up dei pazienti seguiti nella pratica clinica dai medici dell'Unità di Nefrologia di Bergamo e del Centro Daccò di Ranica, che accetteranno di partecipare allo studio dopo aver fornito il proprio consenso all'utilizzo dei dati a scopo di ricerca. La raccolta di dati a lungo termine da un ampio campione di pazienti potrà fornire importanti informazioni quali ad esempio i fattori prognostici, le caratteristiche di coloro che rispondono meglio alle terapie e le stime sulla durata di un trattamento infruttuoso dopo il quale un paziente può essere considerato non-responder. Le variabili valutate in questo studio serviranno per completare ed ampliare le conoscenze esistenti sulla NMP, e forniranno anche importanti dettagli sul decorso clinico della malattia. Queste informazioni costituiranno inoltre la base per il disegno di nuovi trial clinici. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico ed è ora in corso la raccolta dei dati dei pazienti che accettano di partecipare alla raccolta dati.

- vi. **Studio BICONNECTED.** Nelle malattie autoimmuni le cellule B giocano un ruolo chiave nella produzione di autoanticorpi che attaccano i tessuti sani, danneggiandoli. I trattamenti attualmente disponibili sono mirati all'eliminazione delle cellule B per bloccare la produzione di autoanticorpi. Sebbene molto efficaci, tali trattamenti inducono la soppressione generalizzata di tutte le cellule B, compromettendo potenzialmente la risposta immunitaria del paziente. Al contrario, nelle malattie autoimmuni è stato stimato che le cellule B protogenetiche rappresentino solo lo 0,1-0,5% di tutte le cellule B circolanti. Per questo motivo, una delle più importanti sfide della ricerca nell'ambito dei trattamenti per le malattie autoimmuni è quella di eliminare in modo selettivo la piccola quantità di cellule B autoreattive. A questo scopo, abbiamo disegnato e testato una nuova molecola, chiamata BiAATE (bi-specifici AutoAntigene-T cell engager), che permette di indurre le cellule T ad eliminare in modo selettivo la piccola popolazione di cellule in una malattia autoimmune che colpisce il rene, la nefropatia membranosa. Ex vivo, questa molecola si è dimostrata in grado di eliminare le cellule B autoreattive, lasciando intatte tutte le altre cellule B che funzionano normalmente. Anche in vivo, questa nuova molecola ha mostrato la possibilità di ridurre gli anticorpi circolanti, rappresentando potenzialmente un nuovo approccio mirato per questa malattia autoimmune (Perico et al., *Front. Immunol.*, 2024).

- **Malattia renale policistica**

La malattia renale policistica autosomica dominante (ADPKD) è caratterizzata dalla formazione di cisti nel parenchima renale (ed epatico) che ne riducono progressivamente la funzione. I farmaci che potrebbero prevenire la formazione e l'aumento di dimensioni delle cisti sono oggetto di studio. In particolare, il nostro Istituto è stato il primo a proporre l'analogo della somatostatina (octreotide-LAR) come terapia del rene policistico, farmaco attualmente inserito da AIFA nell'elenco dei prodotti erogabili a carico del SSN per indicazione terapeutica diversa

da quella autorizzata (Legge 648/1996). Questo è il risultato degli studi clinici multicentrici ALADIN e ALADIN 2 disegnati o coordinati dall'Istituto negli scorsi anni.

Nel nostro Centro l'interesse per la malattia ADPKD è proseguito con altri studi illustrati qui di seguito:

**i. Studio di meccanismi patogenici mediante l'uso di un modello in piastra di ADPKD.**

Ad oggi non esiste un farmaco ideale per la ADPKD in grado non solo di rallentare la crescita, ma anche di regredire la formazione delle cisti, privo di effetti collaterali. Recentemente abbiamo sviluppato un modello di malattia *in vitro* partendo dalle cellule dei pazienti stessi al fine di studiare i meccanismi alla base della formazione delle cisti per sviluppare nuovi farmaci. Il modello parte dalla generazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) che abbiamo differenziato verso organoidi della gemma ureterica, uno stadio embrionale dello sviluppo da cui prende origine il dotto collettore (il segmento renale più colpito nei pazienti con ADPKD). Utilizzando questo protocollo, nello studio in corso abbiamo dimostrato che gli organoidi generati da cellule iPSC nelle quali abbiamo deletato il gene *PKD1* mediante tecniche di ingegneria genetica formano spontaneamente cisti, a differenza delle cellule di un donatore sano, confermando la bontà del modello. I prossimi studi prevedono l'analisi della cistogenesi in organoidi del dotto collettore derivati da iPSC di due pazienti con mutazioni in *PKD1* (responsabili dell'85% dei casi di ADPKD), fondamentale per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche paziente specifiche più mirate.

**ii. Trattamento di ADPKD attraverso somministrazione per via inalatoria di nanotrasportatori contenenti ormone tiroideo.**

Alcuni dei nostri studi hanno dimostrato che il trattamento con L-tiroxina (T4) - un ormone prodotto naturalmente dalla ghiandola tiroidea - può prevenire la progressione della MRC. Poiché T4 regola diversi processi biologici nel nostro organismo, il trattamento sistemico potrebbe causare alcuni effetti indesiderati. In questo studio vogliamo rafforzare gli effetti benefici di T4 ed evitare quelli indesiderati. Per fare ciò, stiamo sviluppando un approccio basato sulla nanomedicina (NanoT4) in grado di veicolare in modo specifico T4 alle sole cellule delle cisti renali. A tal fine, valuteremo la specificità di diversi sistemi NanoT4 e il loro potenziale nell'inibire la formazione e la crescita delle cisti in modelli 3D umani, ottenuti a partire da pazienti affetti da ADPKD, anche grazie all'utilizzo di approcci di intelligenza artificiale (AI) (Monaco et al., Sci. Rep., 2024). Per garantire la massima specificità e sicurezza, ottimizzeremo le dosi e i tempi in vivo in un modello animale di ADPKD, monitorando i livelli di NanoT4 nel sangue e nelle urine, nonché valutando l'effetto in vari organi. Successivamente, svilupperemo un metodo minimamente invasivo (es. aerosolizzando le nanoparticelle), per somministrare i sistemi NanoT4 selezionati e valuteremo la loro efficacia nel prevenire la crescita delle cisti e la progressione della malattia nel modello ADPKD. Questo progetto aspira a sviluppare un metodo sicuro, efficiente e facile da utilizzare per il trattamento della ADPKD ed a generare importanti conoscenze sulla sua patobiologia.

**iii. Valutazione dell'efficacia di un agonista del recettore nucleare farnesoide (FXR) in un modello sperimentale di rene policistico.** Il recettore FXR, altamente espresso nel

fegato e nel rene, regola il metabolismo degli acidi biliari e dei lipidi, oltre a esercitare effetti anti-infiammatori e anti-fibrotici. Un agonista di FXR ha dimostrato proprietà renoprotettive in studi clinici sulla steatoepatite non alcolica e in modelli di malattie renali. In questo studio stiamo valutando l'efficacia di questa molecola in un modello sperimentale di rene policistico, utilizzando ratti PCK geneticamente predisposti a sviluppare cisti renali ed epatiche.

- iv. **Studio REORIENTED.** Attualmente, esistono solo due opzioni farmacologiche specifiche in ADPKD, tolvaptan e octreotide-LAR, i quali tuttavia sono disponibili solamente per i pazienti ad alto rischio di insufficienza renale terminale (ESKD). D'altra parte, molti pazienti con ADPKD sviluppano ESKD nonostante queste terapie. Questo è in larga parte dovuto alla grande variabilità patofenotipica e genotipica tra pazienti, alla complessa patobiologia della malattia e alla scarsità di modelli animali in grado di mimare fedelmente il fenotipo umano. È quindi necessario individuare i meccanismi che regolano la patogenesi della malattia per scoprire nuovi bersagli terapeutici. Le ricerche fatte finora suggeriscono che gli ormoni tiroidei (TH) possano fungere da modulatori pleiotropici anche nella patobiologia della ADPKD. I segnali TH giocano un ruolo cruciale nella regolazione della de-differenziazione cellulare e riattivazione del ciclo cellulare, nonché nel metabolismo ed evoluzione delle malattie cardiache e renali. La capacità dei TH di modulare i processi anti-cistogenici e renoprotettivi nella ADPKD non è ancora stata studiata. Grazie alle nostre conoscenze di ingegneria dei tessuti e utilizzando modelli animali e cellulari abbiamo infatti dimostrato, con studi meccanicistici, che i TH - in particolare T4 - possiedono forti proprietà anticistogeniche e sono in grado di modulare la crescita delle cisti e la progressione della malattia. Recentemente abbiamo disegnato REORIENTED con l'obiettivo generale di determinare i livelli sierici di TH in pazienti ADPKD con diversi gradi di funzione renale (normale, lieve, moderata o grave insufficienza renale). In particolare, lo studio si propone di: i) stabilire i livelli sierici di T3 e T4 totale e libera, di ormone tireostimolante (TSH) e di triiodotironina inversa (rT3) nei pazienti con ADPKD; ii) di correlare i valori di TH con i parametri di funzionalità renale dei pazienti oggetto di studio; iii) di valutare se i livelli sierici di TH variano in base alla gravità del danno renale e valutare lo specifico ruolo che le molecole esaminate rivestono nei confronti dello sviluppo del danno renale. Lo studio è concluso, sono in corso le analisi dei risultati.
- v. **L'analisi delle mutazioni dei geni PKD1 e PKD2 in un'ampia coorte italiana rivela nuove varianti patogene, tra cui nuovi riarrangiamenti complessi.** La maggior parte delle varianti che causano la malattia osservate nei pazienti affetti da ADPKD si trovano in due geni: PKD1 e PKD2. 237 pazienti di 198 famiglie con diagnosi clinica di ADPKD sono stati sottoposti a screening per le varianti genetiche di PKD1 e PKD2 utilizzando il sequenziamento Sanger e l'analisi di amplificazione con sonda a legatura multipla. Sono state identificate varianti che causano la malattia in 173 famiglie (211 pazienti), 156 su PKD1 e 17 su PKD2. In altre 6 famiglie sono state individuate varianti di significato sconosciuto, mentre nelle restanti 19 famiglie non sono state trovate mutazioni. Tra le varianti diagnostiche individuate, 51 erano nuove. In dieci famiglie sono stati trovati sette

grandi riarrangiamenti e sono stati identificati i punti di rottura molecolari di 3 riarrangiamenti. La sopravvivenza renale è risultata significativamente inferiore nei pazienti con mutazioni del PKD1, in particolare in quelli portatori di mutazioni troncanti. In questi ultimi pazienti, l'esordio della malattia era significativamente più precoce rispetto ai pazienti con varianti non troncanti di PKD1 o con mutazioni di PKD2. Il test genetico completo conferma la sua utilità nella diagnosi dei pazienti con ADPKD e contribuisce a spiegare l'eterogeneità clinica osservata in questa malattia. Inoltre, la correlazione genotipo-fenotipo può consentire una prognosi più accurata della malattia (Orisio et al., Nephron, 2024).

- vi. **Studio POPULAR.** La malattia policistica renale autosomica dominante (ADPKD) è la malattia renale ereditaria più comune ed è generalmente ad esordio tardivo. È una malattia geneticamente eterogenea, in quanto può essere causata da varianti patogenetiche in geni diversi: i due geni maggiormente coinvolti sono PKD1 (responsabile del 78% dei casi), e PKD2 (responsabile del 13% dei casi), mentre, nel 6-9% dei pazienti, sono coinvolti altri geni. Dal punto di vista clinico, le persone che presentano varianti patogenetiche nel gene PKD2 hanno una migliore prognosi rispetto a coloro che hanno varianti patogenetiche in PKD1. Esiste, tuttavia, una ampia variabilità clinica tra i pazienti e tra i soggetti affetti all'interno di una stessa famiglia, con diversi gradi di progressione verso l'insufficienza renale, influenzata in parte da fattori genetici e ambientali. Per l'ADPKD, sono disponibili poche informazioni in merito a possibili varianti patogenetiche associate ad 'effetto fondatore', ovvero la presenza di un gruppo di persone affette appartenenti ad una ristretta area geografica che, pur non direttamente imparentate tra loro, presentano la medesima variante, suggerendo la possibilità che essa derivi da un antenato comune. I nostri ricercatori hanno recentemente pubblicato i risultati di un'analisi genetica mediante MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) in un'ampia coorte di pazienti italiani con ADPKD. Questa metodica di biologia molecolare permette di rilevare la variazione del numero di copie (Copy Number Variation - CNV) di una specifica sequenza di DNA, indicativa di duplicazioni, delezioni o altri riarrangiamenti strutturali che possono interessare lunghe sequenze di DNA. Nell'ambito dell'attività di diagnostica, in 7 famiglie (10 pazienti) l'analisi MLPA ha rivelato nel gene PKD2 la presenza, in eterozigosi di una CNV indicativa di una o più delezioni, (di almeno 11.000 paia di basi) coinvolgente almeno gli esoni 1-2. Ulteriori analisi si sono rese necessarie per approfondire l'esatta estensione di questa/e delezione/i nel gene PKD2 e identificarne il/i breakpoint. In tutti i pazienti delle 7 famiglie è stata riscontrata la presenza dello stesso breakpoint e quindi, della medesima delezione, indicativa di una possibile origine ancestrale comune. Queste famiglie non sono anagraficamente imparentate, ma vivono o sono originarie di un'area geografica della provincia di Bergamo che comprende tre paesi (Torre de Roveri, Albano S. Alessandro, Scanzorosciate), suggerendo la presenza di una potenziale delezione genetica con 'effetto fondatore'. Lo studio POPULAR ha lo scopo di: i) valutare se questa nuova delezione in eterozigosi nel gene PKD2 è associata ad un 'effetto fondatore'; ii) indagare la correlazione tra genotipo-fenotipo nelle famiglie che presentano questa delezione. Sono in corso le analisi dei dati.

- vii. Studio ADPKD648.** Negli ultimi anni, gli studi ALADIN e ALADIN 2 coordinati dai ricercatori dell'Istituto con la collaborazione di nefrologi di diverse unità di nefrologia italiane, hanno dimostrato che l'analogo della somatostatina octreotide a lento rilascio (LAR) ha importanti effetti nefroprotettivi in pazienti con ADPKD. Sulla base dei risultati dello studio ALADIN 2, l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), ha inserito octreotide LAR (Delibera n. 1264 del 3 agosto 2018) nell'elenco dei farmaci da prescrivere secondo quanto previsto dalla Legge 648/96 per i pazienti con ADPKD e grave insufficienza renale (stadio IV: velocità di filtrazione glomerulare stimata [eGFR] 30-15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup> misurata dall'equazione MDRD a 4 variabili). L'obiettivo dello studio è quello di valutare il valore prognostico dei parametri basali (pre-trattamento) tra cui età, sesso, indice di massa corporea, pressione sanguigna, HbA1c, creatinina sierica, proteinuria/albuminuria, GFR e TKV in una coorte di pazienti affetti da ADPKD allo stadio IV di CKD e che hanno iniziato il trattamento cronico con octreotide LAR e sono sequenzialmente stati monitorati con valutazioni morfo-funzionali, in accordo con le linee guida della Legge 648/96 (Determina n. 1264 e successive modifiche). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico ed è in corso la raccolta dati retrospettiva dei pazienti che hanno firmato il consenso.
- viii. Quadro clinic e prognosi di ADPKD atipica da variante mono allelica di *IFT140*.** Le varianti patogeniche monoalleliche nel gene *IFT140* sono state associate ad uno spettro di malattia renale clinicamente simile a quello di ADPKD. È stato condotto uno studio in cui si sono descritti i casi di 75 soggetti con ADPKD-*IFT140*. Lo studio internazionale, coordinato dal Servizio di Nefrologia dell'Università di Brest, ha visto la partecipazione dell'Istituto Mario Negri come parte del Consorzio ADPKD Europeo CYST1c. I 75 soggetti sono stati identificati tra 2797 individui europei con fenotipo simile a ADPKD sottoposti a test genetico che ha documentato la presenza di varianti mono alleliche predittive di perdita di funzione (pLoF) in *IFT140*. Si è dimostrato che i soggetti ADPKD-*IFT140* presentavano quadri atipici alla risonanza magnetica dei loro reni, con meno cisti renali ma di maggior volume rispetto ai pazienti con quadro classico ADPKD. Inoltre, questi pazienti raramente sviluppavano cisti epatiche. Sebbene la prognosi renale fosse migliore rispetto alla forma classica ADPKD, il 70% dei soggetti di età superiore a 60 anni presentava una funzione renale compatibile con lo stadio 3 di CKD o più grave. Lo studio ha concluso che i soggetti con ADPKD-*IFT140* probabilmente sviluppano un quadro di cisti renali atipico di ADPKD. Tuttavia, la loro prognosi renale sembra favorevole (Zagorec et al, Am J. Kidney Dis., 2024).

- **Malattie rare senza diagnosi: UDNI**

- i. Sviluppo di un modello diagnostico efficace e sostenibile per l'inquadramento di pazienti orfani di diagnosi.** Il nostro Centro ha partecipato al progetto "Sviluppo di un modello diagnostico efficace e sostenibile per l'inquadramento di pazienti orfani di diagnosi", coordinato dalla Associazione Rete Italiana Salute dell'Età Evolutiva (Rete IDEA) presso l'Ospedale Pediatrico Bambino Gesù di Roma. Il progetto mira a validare e trasferire nella pratica clinica le nuove tecnologie di sequenziamento genomico, grazie alle attività combinate di strutture di comprovata esperienza nella genetica clinica e nella genomica disseminate sul territorio nazionale. La rete è disegnata per raggiungere

capillarmente i pazienti al fine di ridurre l'odissea diagnostica. Alla rete clinica si affianca una rete di laboratori per la centralizzazione delle analisi genomiche in centri con documentata esperienza in grado di assicurare l'offerta delle nuove tecnologie nella pratica clinica mediando una corretta interpretazione dei dati genomici, anche attraverso approcci sperimentali di validazione funzionale, per il trasferimento del risultato al letto del paziente. La peculiarità della diagnosi e della presa in carico dei pazienti pediatrici rispetto a quelli adulti viene declinata sviluppando due workflow paralleli. Nell'ambito del progetto, il nostro Centro ha coordinato la rete dedicata ai pazienti adulti, entrata a far parte del network nel 2021, costituita da tre Unità Operative (Istituto Mario Negri IRCCS; Centro Multidisciplinare di Immunopatologia e Documentazione su Malattie Rare di Torino ed ISS) e focalizzata in particolare sulla caratterizzazione di pazienti con nefropatie di origine non chiarita. Sono stati complessivamente valutati e discussi collegialmente 323 casi (pazienti/nuclei familiari) relativi ad adulti con patologie non diagnosticate, selezionati dai database costantemente aggiornati presso il Centro di Torino e il nostro Centro. L'approfondimento multidisciplinare e l'avvio dei conseguenti accertamenti, comprendenti la conduzione di analisi genetiche con tecniche NGS e WES, hanno permesso di giungere alla definizione diagnostica in 89 dei 273 casi analizzati. Il risultato presenta importanti implicazioni per quanto riguarda l'impostazione del follow-up e il counseling genetico nei rispettivi nuclei familiari. La descrizione dei fenotipi associati ai geni coinvolti e l'allargamento delle indagini ai potenziali soggetti a rischio contribuiscono alla caratterizzazione di malattie rare sicuramente sotto diagnosticate anche nell'ambito dell'assistenza condotta in centri specialistici. Sono state in particolare identificate anomalie nei seguenti geni responsabili di malattie con manifestazioni multisistemiche, renali ed extra renali: ABCG2, ACTN4, APOL1, ATP6V1B1, C3, CASR, CD59, CEP290, CEP83, CFH, CFHR, CLCN5, COL4A3, COL4A4, COL4A5, CR1, FAT1, FN1, GLA, INF2, HNF1B, HPRT, MMACHC, MYH9, MYO1E, NPHP4, NPHS1, NPHS2, PAX2, PKD1, PKD2, SERPINA2, SLC4A1, SLC7A7, SLC7A9, TRPC6, TSC1, TTC21B, TTR, UMOD, WT1. È stato inoltre identificato un nuovo gene associato alla C3G: IQGAP1. IQGAP1 interagisce con le proteine della barriera di filtrazione glomerulare e del citoscheletro, regolando la morfologia, la motilità e la permeabilità dei podociti. Nell'ambito di uno studio finanziato dalla Fondazione Regionale per la Ricerca Biomedica (FRRB) Early Career Award, sono stati quindi avviati studi funzionali per determinare gli effetti delle alterazioni di IQGAP1 su struttura e funzione dei podociti, nonché sull'attivazione secondaria del complemento nei pazienti portatori delle varianti patogenetiche.

- ii. **Studio ANTHEM.** Nell'ambito delle malattie rare non diagnosticate, l'Istituto proseguirà le attività con il progetto di recente attivazione ANTHEM (*Advanced Technologies for Human-centred Medicine*), finanziato dal "Piano nazionale per gli investimenti complementari al PNRR", coordinato dall'Università di Milano-Bicocca in collaborazione con 22 enti italiani. Le malattie genetiche rare costituiscono un gruppo molto eterogeneo di malattie, spesso non diagnosticate, per le quali i pazienti ricevono solo un trattamento sintomatico. Lo sviluppo della tecnologia di sequenziamento massivo di nuova generazione (Next-Generation-Sequencing, NGS) ha reso possibile l'identificazione di

molti dei geni responsabili di queste patologie permettendo di delinearne i meccanismi patogenetici. Le metodiche più comunemente utilizzate, quali il sequenziamento dell'esoma (Whole-Exome Sequencing, WES) o del genoma (Whole-Genome Sequencing, WGS), basate sul sequenziamento del DNA, permettono di identificare mutazioni patogenetiche che causano la perdita di funzionalità della proteina, quali mutazioni di stop, ampie inserzioni e delezioni e la perdita di siti canonici di splicing. Al contrario, l'attribuzione di patogenicità ad una variante di sostituzione amminoacidica (missenso) o di una variante sinonima è spesso dubbia e, di conseguenza, tali varianti sono spesso catalogate come varianti di significato incerto (VUS). Inoltre, il sequenziamento dell'esoma non è in grado di identificare le possibili varianti patogenetiche localizzate nelle regioni non codificanti, come i siti di splicing non canonici o le varianti introniche profonde. Il sequenziamento WGS, pur consentendo l'identificazione di varianti presenti nelle regioni non codificanti di un gene, è molto costoso e produce una enorme quantità di dati di bassa informatività patogenetica. A causa di queste limitazioni, il 50% circa dei pazienti con malattie genetiche rare rimane senza diagnosi e non può beneficiare dei vantaggi della medicina personalizzata. Il sequenziamento del trascrittoma (RNA-Seq) permette di determinare variazioni nella sequenza e nei livelli di RNA, fornendo informazioni complementari a quelle ottenute con WES e WGS, migliorando così l'efficienza della diagnosi genetica. Poiché l'espressione di RNA, in termini di livelli e di isoforme prodotte dallo splicing alternativo, è tessuto-specifica, il materiale biologico più informativo dal punto di vista trascrizionale è sicuramente il tessuto affetto. Tuttavia, questo non è sempre di facile ottenimento e la raccolta può essere troppo invasiva per il paziente. In questi casi è possibile ricorrere all'utilizzo di tessuti alternativi, quali il sangue intero o biopsie cutanee, che presentano una bassa invasività e un ampio profilo di espressione dell'RNA. I fibroblasti ottenuti da biopsie cutanee, in particolare, si sono dimostrati essere la matrice alternativa più affidabile, omogenea ed informativa per le analisi di RNA-Seq, in un ampio spettro di patologie. Il progetto ANTHEM si propone di identificare, attraverso la tecnologia dell'RNA-Seq, le alterazioni genetiche alla base di malattie rare non diagnosticate in pazienti pediatrici e adulti con esordio precoce e con WES negativo. Nonostante l'NGS sia fondamentale per la diagnosi di malattie genetiche, le sue percentuali di successo vanno dal 30% al 50%. L'avvento dell'RNA-Seq ha aumentato la possibilità di diagnosticare le malattie genetiche dall'8% al 36%. Attraverso questo progetto ci proponiamo di applicare la metodica di RNA-Seq, ad integrazione delle analisi di WES, per la diagnosi di malattie genetiche rare. Il progetto prevede: i) messa a punto e validazione del protocollo di analisi del trascrittoma in soggetti sani e in pazienti con alterazioni note di splicing e/o alterata espressione di RNA; ii) studio delle alterazioni di splicing e dei livelli di RNA in fibroblasti in coltura ottenuti da biopsie cutanee di pazienti con malattie genetiche rare ed esoma negativo. Ad oggi sono stati inclusi nello studio 8 pazienti e 5 volontari sani.

- iii. **Intolleranza alle proteine con lisinuria: non solo un disturbo per i pediatri.** L'intolleranza alle proteine con lisinuria (LPI) è un errore congenito del metabolismo con

un'espressività clinica variabile che di solito esordisce nell'infanzia con insufficienza della crescita e problemi gastroenterologici/neurologici legati all'alterazione del ciclo dell'urea e, successivamente, con complicanze che coinvolgono il sistema renale, polmonare e immunoematologico. Abbiamo studiato il caso di una donna di 40 anni affetta da malattia renale cronica nel contesto di una LPI, la cui diagnosi è stata impegnativa perché i segni della malattia erano sempre sfumati e la paziente non ha mai manifestato episodi critici tipici di questa malattia multisistemica. Oltre alla malattia renale, erano presenti splenomegalia, trombocitopenia, aumentati livelli di lattato deidrogenasi (LDH), iperferritinemia e ipertrigliceridemia. Un'indagine approfondita delle preferenze alimentari della paziente ha rivelato la sua spontanea avversione per gli alimenti contenenti proteine e l'eccessiva sonnolenza durante il verificarsi di episodi infettivi o nelle rare occasioni di assunzione eccessiva di proteine, anche se senza mai rivolgersi al medico. Questi segni sfumati ci hanno fatto sospettare un'alterazione del ciclo dell'urea e ci hanno permesso di restringere la diagnosi alla LPI attraverso indagini biochimiche e genetiche. (Rigoldi et al., Nephron, 2024)

- **Miopatia correlata a SEPN1 (SEPN1-RM)**

Il Laboratorio di Trasduzione del Segnale è impegnato nello studio di una rara miopatia congenita, definita miopatia correlata a SEPN1. La miopatia correlata a SEPN1 è caratterizzata da debolezza muscolare, caratteristiche aberrazioni della colonna vertebrale quali quelle definite da spina rigida e compromissione respiratoria dovuta ad anomalie del diaframma. Ad oggi, la SEPN1-RM manca di alcun trattamento farmacologico. Attraverso l'uso del modello murino della malattia ed altri modelli preclinici quali le biopsie muscolari dei pazienti studiamo il meccanismo patogenico della SEPN1-RM per identificare target farmacologici e mettere a punto una terapia target (Germani S. et al Cell Reports Medicine 2024) (Zito E. et al Trends Endocrinol Metab 2024).

- **Amiloidosi da catene leggere delle immunoglobuline**

Il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello si occupa dello studio dei meccanismi responsabili dell'amiloidosi da catene leggere delle immunoglobuline (o amiloidosi AL), una patologia rara, con un'incidenza di 10 nuovi casi per milione di persone all'anno. Questa amiloidosi è causata da un difetto nelle plasmacellule che induce la produzione anomala delle catene leggere delle immunoglobuline (LC - Light Chains), che acquisiscono così la capacità di aggregare e formare depositi fibrillari in vari tessuti e organi. Le terapie attualmente disponibili sono efficaci su circa il 60% dei pazienti ed una percentuale considerevole di soggetti muore, principalmente per insufficienza cardiaca prima di avere accesso alle cure. Questo è da attribuire all'elevata cardiotoxicità delle LC circolanti che fanno dell'amiloidosi AL una patologia cardiaca. Il meccanismo alla base di questa tossicità non è noto e la sua identificazione è reso ancora più difficoltoso dall'assenza di modelli animali che ricapitolino le principali caratteristiche della malattia. Il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello, in collaborazione con il Centro per la cura delle Amiloidosi Sistemiche del Policlinico San Matteo di Pavia, e il Dipartimento di Bioscienze dell'Università di Milano, ha sviluppato un nuovo modello animale basato sull'utilizzo del nematode *C. elegans*, contribuendo alla descrizione di alcuni meccanismi coinvolti nella tossicità delle LC. Lo sviluppo e la caratterizzazione di questo

nuovo modello animale rappresentano un risultato molto importante che possono tradursi nell'identificazione di nuovi bersagli farmacologici e la valutazione della loro efficacia mediante studi preclinici.

- **Amiloidosi da gelsolina**

L'amiloidosi da gelsolina (AGel) è una malattia degenerativa genetica rara caratterizzata dalla deposizione in diversi tessuti di aggregati proteici glicolici insolubili. Questa malattia, anche nota come amiloidosi familiare di tipo finlandese, è causata da mutazioni puntiformi in diversi domini della proteina gelsolina. Le varianti patologiche più comuni sono quelle causate da mutazioni nel dominio G2 della proteina che risultano in un'amiloidosi sistemica caratterizzata dalla progressiva deposizione di fibrille amiloidi in diversi organi e tessuti. Recentemente, sono state descritte nuove varianti patologiche associate ad altre mutazioni localizzate nell'interfaccia tra il dominio G4 e G5. Il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello, in collaborazione con l'Istituto di Biofisica del CNR di Milano, studia i meccanismi alla base dell'aggregazione delle proteine in cui le mutazioni sono presenti sui diversi domini. Per questi studi viene utilizzato come modello animale il nematode *C. elegans*, in grado di riconoscere le forme tossiche delle proteine amiloidogeniche. I risultati ottenuti finora indicano che le tre varianti patologiche che risultano dalle nuove mutazioni nell'interfaccia G4:G5 sono molto più tossiche in vivo rispetto alle varianti legate a G2. Sulla base di questi risultati, abbiamo disegnato alcuni nuovi composti peptidomimetici che si sono rilevati efficaci nel contrastare la proteotossicità delle proteine mutate.

- **Patologie fibrotiche e infiammatorie polmonari ed epatiche**

Il laboratorio di Nanobiologia è principalmente coinvolto nella caratterizzazione di metodi terapeutici innovativi associati all'impiego di nanovettori, per il miglioramento dell'indice terapeutico di alcune categorie di farmaci correntemente utilizzati nella pratica clinica di **patologie infiammatorie e fibrosanti epatiche e polmonari**. In particolare, abbiamo investigato l'impatto dell'internalizzazione dello steroide **desametasone** o dell'antineoplastico inibitore della tirosin chinasi **imatinib**). Tale obiettivo riveste una capitale importanza in quanto, l'utilizzo di nanoparticelle biocompatibili, biodegradabili e già approvate per l'uso clinico, potrebbe consentire un rapido trasferimento sui pazienti. I primi studi effettuati, sia sul modello epatico sia sul modello polmonare, sono risultati estremamente promettenti. E' stato osservato che il legame degli steroidi con i nanovettori, è in grado di aumentare drasticamente il rapporto tra i livelli del farmaco nell'organo bersaglio e quelli misurati nel plasma e nei principali organi filtro non interessati alla patologia. Parallelamente, preliminari studi di tossicità sembrano indicare una riduzione degli effetti collaterali, tipici del trattamento di queste categorie di farmaci quando somministrati liberamente, supportando così la rilevanza del rilascio mirato nanovettore-mediato. È tuttora in corso la valutazione dell'efficacia dei trattamenti nanomedicali mediante la valutazione di parametri clinici facilmente trasferibili alla clinica quali l'analisi ematochimica da plasma, gli studi di funzionalità respiratoria e le indagini non invasive quali risonanza magnetica e ecografia). Per effettuare tutta questa serie di progetti il Laboratorio di Nanobiologia si avvale della collaborazione di centri nazionali e internazionali operanti nel campo nanotecnologico, in particolare il **Dipartimento della Scienza del farmaco dell'Università degli studi di Padova** e il **Centro di Nanotecnologia Catalano**. Inoltre rimane

costante la collaborazione con alcuni centri clinici quali il **Dipartimento di Gastroenterologia della fondazione IRCCS-Ospedale San Gerardo di Monza**, il **Dipartimento di Pneumologia della Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia**, e con il **Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgia Toracica dell'Ospedale di Modena**. Internamente all'Istituto il Laboratorio di Nanobiologia collabora fattivamente con il **Laboratorio di Farmacodinamica e Farmacocinetica** del Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare e con il **Laboratorio di Spettrometria di Massa** presso il Dipartimento di Ambiente e Salute. Nel contesto delle patologie epatiche è in corso di svolgimento un progetto in collaborazione con **l'Ospedale san Gerardo di Monza e l'Università La Sapienza di Roma**, focalizzato al trattamento della fibrosi epatica murina mediante l'utilizzo di specifici small interfering RNA (siRNAs) inglobati in nanovettori biocompatibili e biodegradabili. Al fine di ottimizzare la strategia di delivery intracellulare e di minimizzare il numero di animali utilizzati una serie di studi in vitro sono stati effettuati per comprendere i meccanismi di endocitosi, rilascio citoplasmatico e degradazione intracellulare delle sonde e del nanocarrier.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELLE MALATTIE RENALI

Da anni il nostro Istituto si è affermato come realtà di eccellenza per la ricerca sulle malattie renali croniche (MRC) che colpiscono l'8-10% della popolazione mondiale e causano la morte prematura di più di 1,2 milioni ogni anno. In Italia si stima che la prevalenza della MRC sia del 10% (circa 6 milioni di nefropatici), con coinvolgimento maggiore degli uomini rispetto alle donne (7,5% e 6,5%, rispettivamente) (Imberti & Benigni, *Nephron*, 2024). Tra i fattori di rischio della MRC vanno considerati il diabete, l'ipertensione e l'obesità, oltre ai tossici ambientali, ma, a sua volta, la MRC è causa di eventi cardiovascolari, anche fatali. Dati epidemiologici dell'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS) e dell'iniziativa *Global Burden of Diseases* (GBD) coordinata dall'*Institute of Health Metrics and Evaluation* (IHME) a Seattle, a cui ha contribuito anche il nostro Istituto, indicano che la prevalenza della MRC è in crescita a livello globale. Aggiornamenti epidemiologici più recenti del programma globale GBD hanno confermato il ruolo rilevante della MRC (nelle sue diverse forme) nella morbilità e mortalità cardiovascolare (GBD 2021 Causes of Death Collaborators, *Lancet* 2024a) e ampliato lo scenario dei fattori di rischio per queste malattie (GBD 2021 Causes of Death Collaborators, *Lancet* 2024b). Poiché la MRC rappresenta una causa importante di morbilità/mortalità nella popolazione generale e costituisce un problema di salute pubblica, l'OMS ne ha riconosciuto, insieme alle malattie cardiovascolari ed ai tumori, un ruolo significativo nell'ambito delle malattie non comunicabili che complessivamente sono in progressiva crescita negli ultimi decenni. La natura cronica della malattia comporta costi ingenti per la società, sia di tipo diretto che indiretto. Il trattamento della MRC allo stadio terminale comporta oneri elevati per il *Sistema Sanitario Nazionale* (SSN), con un costo diretto annuo di circa 40000 euro per paziente in dialisi, e costi stimati in 52000 euro per il primo anno, e 15000 euro per ogni anno successivo al primo in caso di trapianto. Per esempio, la possibilità di ritardare di almeno cinque anni la progressione del danno renale per il 10% dei soggetti con insufficienza renale moderata e l'entrata dei pazienti in dialisi, permetterebbe al SSN di risparmiare risorse per 2,5 miliardi di euro.

Anche il Ministero della Salute, con il *Piano Nazionale della Cronicità*, ha identificato diverse linee di intervento volte a migliorare la gestione complessiva delle patologie croniche. Nel contesto delle MRC e dell'insufficienza renale terminale, il Piano Nazionale si propone di raggiungere tre obiettivi chiave: i) individuare le persone a rischio di MRC; ii) ritardare l'insorgenza dell'insufficienza renale; iii) personalizzare le terapie sostitutive, sia in fase predialitica che dialitica.

Da più di trent'anni il nostro Istituto, attraverso l'Unità Operativa Complessa Medicina Renale, i Dipartimenti di Medicina Molecolare e Bioingegneria, e il Centro di Ricerche Cliniche per le Malattie Rare Aldo e Cele Daccò nella sede di Bergamo, si dedica allo studio delle cause e delle possibili nuove strategie di prevenzione e cura di molte malattie renali, quali ad esempio: la nefropatia diabetica e non, e le nefropatie su base genetica; le malattie dovute a difetti

acquisiti o genetici del sistema del complemento e del sistema immunitario più in generale ad interessamento sistemico oltre che renale; le complicanze del trapianto d'organo.

Nello specifico, i ricercatori del nostro Istituto sono impegnati nell'identificazione e nella caratterizzazione di:

- 1) meccanismi d'azione e mediatori responsabili della progressiva perdita di funzione renale nella nefropatia diabetica e non, e possibili nuovi trattamenti farmacologici o riqualifica di vecchi farmaci per nuove indicazioni sulla base dei meccanismi identificati
- 2) strategie di intervento atte a prevenire l'insorgenza delle nefropatie croniche e loro complicanze
- 3) interventi innovativi con farmaci biologici o terapie cellulari, per prevenire o rallentare la progressione delle nefropatie croniche ed eventualmente ottenere la remissione/regressione del danno renale
- 4) protocolli farmacologici innovativi di immunosoppressione e terapie cellulari per indurre la tolleranza immunologica al trapianto di rene nell'uomo

- **Nefropatia diabetica**

La nefropatia diabetica (DKN) è una delle principali complicanze associate al diabete che coinvolge il rene. L'attuale terapia farmacologica non è sempre efficace nel limitare la progressione della malattia verso l'insufficienza renale terminale che richiede di ricorrere il ricorso a terapie costose, quali la dialisi ed il trapianto. Nasce quindi la necessità di identificare e caratterizzare nuovi meccanismi e mediatori responsabili della progressiva perdita della funzione renale nella DKN, per sviluppare nuove terapie farmacologiche o nuovi regimi di trattamento in grado di rallentarne o bloccarne la progressione.

Questo obiettivo è stato perseguito attraverso una serie di studi preclinici e clinici illustrati di seguito:

- i. **Antagonisti recettoriali della frazione C3a del complemento in un modello di danno renale nella DKD.** Il frammento C3a, derivato dalla scissione della componente C3 del complemento, ha un ruolo chiave in diverse glomerulopatie. Questo progetto mira a chiarire il ruolo patogenetico di C3a nel danno glomerulare, in particolare sui podociti, in un modello sperimentale di DKD. Nei topi BTBR ob/ob con DKD abbiamo osservato elevati livelli di C3a e del suo recettore C3aR, associati a perdita di podociti e albuminuria. Il trattamento con un antagonista recettoriale di C3a ha ridotto l'albuminuria, la perdita di podociti, mitigandone i danni mitocondriali e lo stress ossidativo. L'analisi trascrizionale di glomeruli ha evidenziato che la condizione diabetica altera geni legati alla motilità, al citoscheletro e all'interazione con la matrice extracellulare. Il trattamento con l'antagonista recettoriale di C3a ha normalizzato queste alterazioni, indicando che esse dipendono dall'attivazione dell'asse C3a/C3aR. Tra le proteine chiave delle vie intracellulari coinvolte, abbiamo identificato IQGAP, che regola il citoscheletro, e la fibronectina. Entrambe le proteine sono state normalizzate dal trattamento. Questi risultati supportano l'importanza di bloccare C3aR per ridurre il danno glomerulare, aprendo prospettive per testarne l'efficacia in altre patologie renali. I risultati di questo progetto di ricerca sono in corso di elaborazione per la sottomissione del manoscritto.

- **Malattie renali croniche proteinuriche non diabetiche**

Escludendo la DKD, esistono varie MRC caratterizzate da eccessiva perdita di proteine con le urine, le quali rappresentano una causa importante di morbidità/mortalità nella popolazione generale e costituiscono un problema di salute pubblica. Sono condizioni di persistente e progressivo deterioramento della funzione renale dovuta a cause immunologiche e non-immunologiche, e/o genetiche, per cui non sempre le terapie disponibili sono efficaci o lo sono solo in modo parziale. Anche per queste MRC, la nostra ricerca ha riguardato sia studi preclinici che studi clinici come indicato di seguito:

- i. **Sirtuine3 (Sirt3) come target farmacologico nella MRC.** Le sirtuine sono coinvolte nell'insorgenza e nella progressione di diverse malattie renali, sia acute che croniche, per il loro ruolo nei processi biologici critici per lo sviluppo e il funzionamento dei reni (Perico et al., Nat. Rev. Nephrol., 2024). Sirt3, la principale deacetilase dei mitocondri, modula i livelli di acetilazione dei substrati che regolano il metabolismo e lo stress ossidativo. Nel rene abbiamo in precedenza documentato che Sirt3 modifica il funzionamento delle cellule ad alta richiesta energetica, quali tubulari e podociti. Tuttavia, poco si conosce sul ruolo di Sirt3 nel regolare le funzioni delle cellule endoteliali e nella progressione della MRC. Abbiamo ora dimostrato che in topi-deficienti del gene SIRT3, la densità dei capillari renali è ridotta, in conseguenza della disfunzione endoteliale e della ridotta espressione di VEGF-A rispetto ai topi con profilo genetico normale. In parallelo, si è osservata l'attivazione del segnale di ipossia, sovraregolazione di HIF-1 $\alpha$  e angiopoietina-2, nonché aumento dello stress ossidativo. Queste alterazioni non risultavano però in un quadro di malattia renale. Tuttavia, i topi SIRT3-deficienti esposti allo stimolo nefrotossico adriamicina (ADR) sviluppavano un'ulteriore rarefazione endoteliale, alterato segnale VEGF-A e maggiore stress ossidativo rispetto a topi normali a loro volta trattati con ADR. Di conseguenza i topi sirt3-deficienti trattati con ADR mostravano un severo danno renale, perdita dei podociti e lesioni fibrotiche. Questi risultati suggeriscono che Sirt3 è un regolatore critico dell'omeostasi vascolare renale, la cui alterazione rappresenta un fattore predisponente alla MRC. Considerando che i trattamenti oggi disponibili non sono ancora ottimali, Sirt3 potrebbe essere un target farmacologico importante nella malattia renale progressiva.
- ii. **Ruolo dell'inibizione della proteina ROCK nella protezione dei podociti dal danno.** Le diverse forme di malattia glomerulare possono condurre alla MRC, la cui progressione può essere solo parzialmente rallentata con le terapie standard. I podociti, cellule responsabili del mantenimento della permeabilità selettiva della barriera di filtrazione glomerulare, sono un possibile bersaglio per la prevenzione e il trattamento della MRC. I podociti esprimono la proteina chinasi ROCK, una serina/treonina chinasi coinvolta nella regolazione di molte funzioni cellulari. L'iper-attivazione di ROCK contribuisce al danno dei podociti e allo sviluppo della malattia renale. Il nostro studio ha dimostrato che l'inibizione di ROCK protegge i podociti dal danno indotto in vitro da mediatori infiammatori, vasoattivi o proteine. Infatti, il trattamento dei podociti con l'inibitore di ROCK

aveva un effetto protettivo riducendo la motilità cellulare e l'espressione di molecole pro-fibrotiche e proteggendo i mitocondri.

- iii. **Studio ADAPT.** Alcuni studi documentano che nuovi farmaci, inclusi gli SGLT2i a livello del tubulo prossimale, migliorano l'iperfiltrazione glomerulare e la proteinuria e rallentano la progressione della malattia renale in pazienti con diabete di tipo 2 con meccanismi apparentemente indipendenti dal miglioramento del controllo metabolico. Gli effetti renoprotettivi di SGLT2 sono stati dimostrati in pazienti con DKD, con profilo di sicurezza e tollerabilità eccellente. In particolare, diversamente dagli ACEi e ARBs, gli SGLT2i non si sono associati ad un elevato rischio di iperpotassiemia, un evento avverso che può rappresentare un limite della terapia con inibitori del sistema RAS, soprattutto in pazienti con insufficienza renale severa. Ciò può avere implicazioni importanti nelle strategie di intervento per rallentare la progressione della malattia renale in pazienti a rischio elevato di insufficienza renale terminale per la presenza già di un quadro severo, nonché a maggiore rischio di iperpotassiemia da inibitori RAS. Per questo, l'Istituto ha disegnato e attivato uno studio di fase IIb, prospettico, randomizzato, cross-over, in doppio cieco e controllato con placebo. L'obiettivo primario è valutare se SGLT2i dapagliflozin migliori l'iperfiltrazione glomerulare e riduca la proteinuria rispetto al placebo in pazienti non diabetici con MRC e, in particolare, in quelli a più alto rischio di progressione verso l'insufficienza renale terminale a causa dell'insufficienza renale severa (stadio IV di MRC) e proteinuria (maggiore 0.5 g/24h). Per ciascun paziente, lo studio ha una durata complessiva di 24 settimane (inclusa la fase di screening). Lo studio si è concluso nel 2024 e sono in corso le analisi dei risultati.
- iv. **Studio FIND-CKD.** Il finerenone è un nuovo antagonista non steroideo del recettore dei mineralcorticoidi (aldosterone) con una maggiore selettività e capacità di legame con il recettore rispetto allo spironolactone ed esplerenone. Studi recenti a breve e lungo termine hanno dimostrato che il finerenone riduce l'albuminuria e rallenta il declino della funzione renale in pazienti con nefropatia diabetica. L'Istituto partecipa ad uno studio multicentrico internazionale di fase III che ha l'obiettivo di valutare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità del finerenone, in aggiunta allo standard terapeutico con ACEi o sartani sulla progressione della malattia renale in pazienti affetti da MRC non diabetica proteinurica. Si tratta di uno studio randomizzato in doppio cieco, controllato con placebo, per gruppi paralleli in soggetti di età superiori a 18 anni trattati per un periodo di 32 mesi. A livello globale, sono stati arruolati 750 partecipanti per gruppo di trattamento, l'Istituto ha contribuito con l'inclusione di 6 pazienti attualmente in follow-up.
- v. **ACEi verso sartani nella MRC avanzata.** In pazienti con MRC in fase avanzata, non esiste consenso sugli effetti di trattamento con ACEi o sartani rispetto al rischio di insufficienza renale terminale e necessità di terapia sostitutiva con dialisi o trapianto, e morte. Per chiarire questo aspetto, il Consorzio internazionale *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Clinical Trials* (di cui fa parte anche l'Istituto Mario Negri) ha recentemente analizzato i risultati di 18 trial clinici (in totale 1739 pazienti con MRC in fase avanzata – GFR medio 22.2 ml/min/1.73mq). L'obiettivo è stato quello di esaminare l'associazione tra inizio del trattamento con ACEi o sartani rispetto a chi non ricevesse

questi farmaci, e incidenza di insufficienza renale terminale/terapia sostitutiva e di mortalità. I risultati hanno dimostrato che iniziare la terapia con ACEi o sartani in pazienti con MRC avanzata limita il rischio di progressione verso l'insufficienza renale terminale e la necessità di dialisi/trapianto, ma non quello della morte rispetto a chi non era trattato con questi farmaci (Ku et al., Ann. Int. Med., 2024).

- vi. Impatto degli effetti acuti della filtrazione glomerulare di trattamenti farmacologici sulla renoprotezione a lungo termine.** Gli interventi farmacologici per rallentare la progressione delle MRC (ad esempio, ACEi, sartani, o SGLT2i) spesso producono un effetto acuto sul GFR che differisce dal loro effetto cronico a lungo termine. Gli studi osservazionali che valutano le implicazioni degli effetti acuti non sono in grado di distinguerli da modifiche di GFR indipendenti dal trattamento farmacologico. L'Istituto Mario Negri ha recentemente partecipato ad un'analisi collaborativa internazionale di numerosi trial clinici per isolare gli effetti acuti e determinare le loro implicazioni a lungo termine. Sono stati analizzati i dati di 64 trial clinici randomizzati (dati individuali di 154.045 partecipanti) considerando gli effetti acuti come differenza media tra gruppo nella riduzione ("slope") di GFR dal basale a 3 mesi di trattamento, gli effetti sulla slope cronica di GFR (a partire dal 3° mese dopo la randomizzazione ad un trattamento), e gli effetti su 3 endpoints renali combinati definiti da insufficienza renale ( $\text{GFR} \leq 15 \text{ ml/min/1.73m}^2$ , dialisi cronica, o trapianto di rene), o riduzione sostenuta di GFR rispettivamente del 30%, 40%, 57%. Utilizzando un approccio di meta-regressione Bayesiana, i risultati suggeriscono che nel gruppo di trial clinici randomizzati considerati (con numeri molto variabili di pazienti arruolati) gli effetti acuti di interventi possono influenzare gli effetti dei trattamenti farmacologici sugli outcome clinici renali (Heerspink et al., Kidney Int., 2024).
- vii. Riduzione acuta della funzione renale con inibitore RAS e rischio di esiti sfavorevoli a lungo termine.** Il declino della funzione renale (GFR) si osserva comunemente in pazienti che ricevono inibitori del sistema renina-angiotensina (RAS) nelle fasi iniziali del trattamento. Uno studio internazionale, in cui ha contribuito l'Istituto Mario Negri, ha valutato in 17 trials in cui sono stati utilizzati inibitori RAS, la relazione tra declino di eGFR e l'esito a lungo termine della funzione renale. Complessivamente sono stati inclusi 11800 soggetti con eGFR medio di  $43 \text{ ml/min/1.73m}^2$  e una mediana del rapporto albumina/creatinina nelle urine di  $362 \text{ mg/5}$ . Di questi 1162 (10%) hanno sviluppato insufficienza renale terminale. L'analisi ha dimostrato che in pazienti trattati con inibitori RAS, la riduzione di eGFR  $\leq 13\%$  in un periodo di 3 mesi, o di  $\leq 21\%$  in un mese di trattamento si associavano ad un minor rischio di insufficienza renale terminale rispetto a chi non aveva riduzione di eGFR tra coloro assegnati al gruppo placebo o a trattamento con farmaci antipertensivi (Ku et al., JASN, 2024),
- viii. Iperfiltrazione glomerulare in pazienti MAFLD.** La malattia epatica steatosica associata a disfunzione metabolica (MAFLD) e l'ipertensione glomerulare hanno in comune di fattori di rischio, quali obesità, resistenza insulinica, tolleranza al glucosio alterata, diabete, dislipidemia e ipertensione. Uno studio condotto dall'Università delle Baleari in Spagna, a cui ha contribuito l'Istituto Mario Negri, ha valutati la prevalenza di MAFLD e la sua associazione con l'iperfiltrazione glomerulare e il declino progressivo della funzione renale

in soggetti normoglicemici, prediabetici, o con diabete di tipo 2. Sono stati analizzati i dati di più di 125000 individui spagnoli di età compresa tra 18 e 65 anni, con GFR stimato (equazione CKD-EPI)  $\geq 60$  mL/min. I risultati hanno dimostrato che la prevalenza di MAFLD aumenta in relazione allo spettro dei livelli glicemici. Inoltre, MAFLD si associava in modo significativo all'iperfiltrazione glomerulare e determinava un più rapido declino della funzione renale in relazione all'età (Abbate et al, Diabetes Metab. Res. Rev., 2024).

**ix. Studi su nuove terapie per il trattamento della nefropatia da IgA.** La nefropatia da IgA è la più comune malattia glomerulare cronica primitiva. Si manifesta clinicamente in modo variabile con ematuria macroscopica o microematuria, e proteinuria senza microematuria. La progressione della malattia può essere predetta da segni clinici (ipertensione, proteinuria, ridotta funzione renale) e dal quadro delle lesioni istologiche alla biopsia (grado di sclerosi glomerulare e danno tubulare interstiziale). Tra questi, i livelli più elevati e la maggior durata della proteinuria rappresentano i principali fattori di rischio di progressione della malattia. Il trattamento della nefropatia da IgA non è cambiato molto nel corso degli ultimi 30 anni ed ancora manca una terapia specifica, efficace ed approvata. La terapia raccomandata si basa principalmente sul blocco del sistema RAAS, con ACEi o sartani per il controllo della pressione arteriosa o la riduzione della proteinuria. Tuttavia, anche con l'inibizione completa del sistema RAAS ed il controllo pressorio ottimale, persiste ancora un rischio sostanziale di progressione della malattia. L'Istituto Mario Negri partecipa ad alcuni trial clinici multicentrici internazionali in cui si esplora l'efficacia di terapie innovative nel rallentare la progressione della nefropatia da IgA, come indicato di seguito:

- **Studio ALIGN.** Si tratta di uno studio di fase III, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, di un trattamento con atrasentan in pazienti affetti da nefropatia da IgA e rischio di perdita progressiva della funzione renale, nonostante la terapia con una dose massima tollerata e stabile di un inibitore del sistema RAAS. Saranno arruolati circa 320 soggetti. Atrasentan è un potente antagonista del recettore dell'endotelina A, che viene proposto in questo studio sulla base dell'effetto di riduzione della proteinuria e del rallentamento della progressione della malattia verso l'insufficienza renale terminale osservati in precedenza in pazienti con nefropatia diabetica (studio SONAR). L'obiettivo primario di ALIGN è di valutare l'effetto di atrasentan rispetto al placebo sui livelli di proteinuria dopo 24 settimane dall'inizio del trattamento. Tra gli obiettivi secondari si valuta l'effetto di atrasentan rispetto al placebo sul declino della funzione renale durante 2 anni di trattamento.
- **Studio PROTECT.** L'Istituto partecipa ad uno studio internazionale randomizzato, in doppio cieco per gruppi paralleli, con controllo attivo in pazienti con nefropatia da IgA, in precedenza trattati con la massima dose tollerata di un ACEi e/o un sartano, con l'obiettivo di valutare l'efficacia, la sicurezza e la tollerabilità di sparsentan in questa MRC. Sparsentan è il primo di una classe di farmaci che combina un'azione antagonista del recettore di tipo 1 dell'angiotensina II ed uno antagonista del recettore di tipo A dell'endotelina. L'obiettivo primario dello studio è di valutare l'efficacia di

sparsentan nel ridurre la proteinuria e preservare la funzione renale, rispetto a quella offerta dal trattamento con il solo sartano (irbersartan). Sono stati arruolati e randomizzati 406 pazienti (203 pazienti per gruppo) seguiti per 110 settimane (28 mesi) con il contributo anche del nostro Istituto. I risultati dello studio documentano che il trattamento con sparsentan riduce in modo significativo l'escrezione urinaria delle proteine e preserva la funzione renale rispetto a quanto osservato con irbesartan alla massima dose tollerata (gruppo controllo). Non sono stati evidenziati particolari problemi di tollerabilità e sicurezza del trattamento con sparsentan. L'Istituto sta ora contribuendo ad un sottostudio di PROTECT in cui al trattamento con sparsentan si associa un SGLT2i, tuttora in corso.

- **Studio APPLAUSE.** Studi recenti sperimentali e dati di genetica suggeriscono un ruolo importante dell'attivazione del complemento nella patogenesi e progressione della nefropatia da IgA. Nel 75-90% dei pazienti con nefropatia da IgA è attivata la via alternativa del complemento e nel 17-25% la via della lectina. Al contrario, in questi pazienti non sembra coinvolta la via classica di attivazione del complemento. Queste osservazioni hanno rappresentato il razionale per disegnare lo studio APPLAUSE, un trial multicentrico, randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo, a gruppi paralleli di fase III per valutare l'efficacia e la sicurezza di iptacopan, un inibitore del Fattore B della via alternativa del complemento, in pazienti affetti da nefropatia da IgA primitiva. Questo trattamento è in aggiunta alla dose massima tollerata di ACEi o sartano. L'obiettivo primario è di dimostrare la superiorità di iptacopan rispetto al placebo nel ridurre la proteinuria dopo 9 mesi dall'inizio del trattamento e nel rallentare la progressione della malattia nel corso di 24 mesi. Lo studio è nella fase di arruolamento dei 450 pazienti con nefropatia da IgA previsti dalla stima del campione, a cui contribuisce anche il nostro Istituto.
- x. **Studio DROP.** L'iperpotassiemia refrattaria è tra le principali cause che determinano l'inizio o la cronicizzazione della terapia renale sostitutiva tramite emodialisi o dialisi peritoneale in pazienti con MRC. La dialisi rappresenta una terapia salvavita, ma ha un forte impatto sulla qualità di vita dei pazienti ed è molto costosa. Pertanto, cercare di posticipare l'inizio della dialisi attraverso la prevenzione dell'iperpotassiemia è fondamentale sia per i pazienti che per il SSN. Nei pazienti con MRC, i maggiori fattori di rischio che determinano l'iperpotassiemia sono un  $GFR < 45 \text{ ml/min/1.73 m}^2$ , l'età avanzata, la presenza di diabete o di insufficienza cardiaca e l'inibizione del RAAS da parte di ACEi, degli inibitori dei recettori dell'angiotensina (ARBi) o degli antagonisti dell'aldosterone. Diversi studi clinici randomizzati hanno dimostrato che gli inibitori RAAS sono più efficaci rispetto ad altre classi di farmaci antipertensivi nel rallentare la progressione delle nefropatie croniche verso l'insufficienza renale terminale. Pertanto, gli RAAS rappresentano la terapia di prima linea per i pazienti con MRC, in particolare per i soggetti affetti da nefropatie proteinuriche. Tuttavia, nei pazienti affetti da MRC, lo sviluppo dell'iperpotassiemia rappresenta il maggior ostacolo per un adeguato blocco del RAAS, soprattutto quando i farmaci che inibiscono tale sistema vengono utilizzati alle dosi massime o in terapia combinata. Una consulenza dietetica, la correzione dell'acidosi

metabolica e il trattamento con diuretici dell'ansa sono componenti chiave della terapia per abbassare il potassio in pazienti con MRC. Tuttavia, per prevenire o trattare l'iperpotassiemia, spesso è necessario introdurre anche farmaci che legano il potassio, soprattutto nei pazienti con GFR <45 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, diabete e/o trattati con inibitori del RAAS. Abbiamo quindi disegnato lo studio DROP in pazienti con MRC avanzata (stadio IIIb-V) che prevede l'utilizzo di patiomer (Veltassa), che fa parte di una categoria di nuovi farmaci molto efficaci e ben tollerati e che può risultare utile nei casi di iperpotassiemia più severa e/o più difficile da trattare con le terapie convenzionali. Patiomer è un polimero legante il potassio e privo di sodio che non viene assorbito, agendo scambiando cationi a livello del tratto gastrointestinale (approvato sia da FDA sia da EMA). Grazie al suo buon profilo rischio/beneficio, ci aspettiamo che patiomer possa migliorare in sicurezza il controllo dell'iperpotassiemia e ridurre la necessità di interrompere o ridurre il dosaggio degli inibitori RAAS in pazienti con grave MRC. A sua volta, questo potrebbe tradursi in una maggiore nefroprotezione e in un differimento della terapia dialitica, in particolare nei pazienti con MRC agli stadi IIIb e V. Lo studio è stato interrotto per mancato arruolamento del numero di pazienti previsti da protocollo.

- xi. Standardizzazione di un protocollo per la misura della funzione renale.** C'è consenso internazionale sulla necessità di sviluppare protocolli standardizzati per la misura della velocità di filtrazione glomerulare (mGFR) nel soggetto adulto per facilitare l'impiego del test mGFR in ambito clinico e di ricerca. Per questo il consorzio *European Kidney Function* (a cui partecipa anche l'Istituto Mario Negri) ha realizzato una ricerca estesa e approfondita della letteratura sull'argomento per mettere a punto raccomandazioni per la determinazione di mGFR usando il modello di clearance plasmatica ad un compartimento e il composto ioexolo come marker esogeno di filtrazione. Ioexolo è stato scelto perché è un marker non radioattivo, poco costoso, sicuro e ben tollerato e può essere misurato in un laboratorio centrale, mentre altri markers non radioattivi comuni sono stati (inulina) o verranno a breve (iotalamato) tolti dal commercio. Il modello della clearance plasmatica è stato selezionato rispetto a quello della clearance renale perché più semplice in quanto non richiede la raccolta di campioni di urine. Le raccomandazioni raccolte in una pubblicazione si basano sulle evidenze in letteratura abbinate a quelle di esperti internazionali coinvolti nelle misure di mGFR (Ebert et al., *Kidney Int.*, 2024).
- xii. Misure di GFR in pazienti con MRC: prestazioni di misure semplificate di clearance plasmatica di ioexolo.** La clearance plasmatica dello ioexolo è stata introdotta da tempo nella parte clinica per la misura diretta e accurata di GFR. Tra i diversi protocolli di clearance plasmatica proposti, quella di durata 10 ore, con 16 campionamenti ematici, e analisi a 2 compartimenti delle concentrazioni plasmatiche misurate è stato definito in precedenza il metodo di riferimento per la misura di GFR. Tuttavia, questo protocollo è di difficile applicabilità nella pratica clinica di tutti i giorni. Uno studio condotto dall'Istituto Mario Negri ha dimostrato che la proposta recente del modello popPK a due compartimenti non offre vantaggi rispetto alla procedura standard ad un compartimento con prelievi durante 8 ore o 4 ore per la misura di GFR i pazienti con MRC stadio III-IV, e dovrebbe perciò essere abbandonata. Infatti, i risultati ottenuti con il modello popPK non

sono superiori a quelli ottenuti mediante stima di GFR con equazioni a base creatinina. Per pazienti con  $eGFR \leq 40$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>, il modello clearance plasmatica dello ioxelo ad un compartimento con prelievi nel corso di 7 o 6 ore, sembra sufficientemente accurato, sebbene ci sia una tendenza a sovrastimare GFR rispetto ai valori ottenuti con il metodo di riferimento ad 8 ore di campionamento e protocollo ad un compartimento. Lo studio conclude che procedure troppo semplificate vanno evitate per misurare accuratamente GFR (Carrara et al, PLOS One, 2024).

**xiii. Stima della funzione renale con formule a base creatinina in pazienti con proteinuria moderata/severa.** Le formule di eGFR sviluppate con il valore della concentrazione sierica di creatinina introducono un errore sostanziale nelle stime di GFR in pazienti con proteinuria in range nefrosico. Rimane da definire l'accuratezza e l'errore di queste formule in pazienti con proteinuria non-nefrosica. In uno studio europeo, a cui ha contribuito l'Istituto Mario Negri, è stato affrontato questo problema, rianalizzando i dati degli studi REIN 1 e REIN 2 e confrontando eGFR stimati con formula CKD-EPI o l'equazione recente proposta da *European Kidney Function Consortium* (EKFC) con la misura diretta di GFR mediante clearance plasmatica del marker esogeno ioexolo. Complessivamente sono stati analizzati 471 pazienti. I risultati dimostrano che le equazioni CKD-EPI e EKFC offrono un'accuratezza sufficiente nella stima di GFR in pazienti CKD con proteinuria moderata/severa e non diabetici (Zoccali et al., CJASN, 2024).

**xiv. Eritropoietina in pazienti con MRC e deficit cognitivo.** I pazienti con MRC spesso presentano un deficit cognitivo lieve e altri disordini neurocognitivi. Studi hanno dimostrato che l'eritropoietina (EPO) e il suo recettore hanno effetti neuroprotettivi in cellule e modelli animali di alterazioni del sistema nervoso. L'EPO ricombinante umana (rHuEPO), comunemente usata per il trattamento dell'anemia in pazienti con MRC, potrebbe essere una terapia neuroprotettiva. Il gruppo di lavoro CONNECT (Cognitive Decline in Nephro-Neurology European Cooperative Target) di cui fa parte l'Istituto Mario Negri, ha condotto una revisione sistematica sui benefici cognitivi del trattamento con rHuEPO in soggetti con ridotta funzione renale. Sono stati individuati e analizzati 24 studi. Complessivamente i risultati in questi pazienti con MRC indicano che rHuEPO migliora la funzione cerebrale, e la performance dei tests neuropsicologici, e ha un impatto positivo sulle misure elettroencefalografiche. Questi risultati suggeriscono che rHuEPO potrebbe essere un farmaco neuroprotettivo promettente per il trattamento del deficit cognitivo associato alla MRC (Barbieri et al., Pharmacol. Res., 2024).

- **Imaging a risonanza magnetica per lo studio della fisiopatologia renale**

Nel Laboratorio di Medical Imaging viene studiata la possibile applicazione di tecniche di imaging d'avanguardia all'ambito renale. In questo contesto, il Laboratorio ha recentemente contribuito ad una review sull'imaging molecolare renale (Klinkhammer et al., Nephron, 2024). Una delle linee principali di ricerca del Laboratorio si focalizza sulla standardizzazione e la validazione clinica di nuove tecniche di imaging a risonanza magnetica senza contrasto per lo studio della fisiologia e patofisiologia renale. L'avvento di nuove tecniche di risonanza magnetica (RM) ha reso possibile ottenere informazioni dettagliate sulla struttura e la funzione

renale nel corso di un'unica acquisizione di RM, senza la necessità di somministrare alcun mezzo di contrasto. Tuttavia, i protocolli di acquisizione ed elaborazione delle immagini variano a seconda del centro di acquisizione, rendendo difficile il confronto dei risultati e la determinazione di parametri di normalità. Nell'ambito di una collaborazione internazionale, il Laboratorio di Medical Imaging partecipa alla standardizzazione delle nuove tecniche di RM, con l'obiettivo di renderle utilizzabili nella gestione clinica dei pazienti con malattie renali. Il Laboratorio è impegnato nell'identificazione di nuovi marcatori di RM sensibili alla progressione di malattia fin dagli stadi precoci e in grado di monitorare la risposta a nuove terapie, e nella validazione degli stessi nell'ambito di studi clinici, con l'obiettivo di favorirne l'ingresso nella pratica clinica. Il Laboratorio è inoltre impegnato nello sviluppo di metodi di elaborazione di immagini (sia diagnostiche che istologiche) basati sull'intelligenza artificiale, mirati ad approfondire la caratterizzazione delle malattie renali. Il Laboratorio si occupa anche di analisi di emodinamica computazionale nella stenosi dell'arteria renale dovuta a displasia fibromuscolare. Di seguito sono presi in esame gli studi in corso sui nuovi approcci preclinici e clinici di analisi di immagini nelle malattie renali:

- I. **Studio RESPECT.** Rispetto all'analisi istologica di un frammento bioptico, la RM è una tecnica non invasiva che permette di caratterizzare l'intero rene con elevata risoluzione spaziale. Nonostante alcuni studi in singoli centri abbiano dimostrato la fattibilità della RM renale e la sua potenzialità nel rispondere a numerosi importanti quesiti clinici, le metodologie impiegate sono diverse nei vari studi, rendendo difficile un confronto affidabile dei risultati. L'Istituto Mario Negri coordina il progetto RESPECT (*Renal MRI Standardization to improve personalized management of CKD patients*) (ERAPerMed Joint Call 2020 – Project number 2020-326) svolto in collaborazione con altri centri europei, che si pone come obiettivo la standardizzazione della RM renale multiparametrica per migliorare la gestione personalizzata dei pazienti con MRC. Nell'ambito del progetto, dopo una prima fase di standardizzazione della RM su appositi fantocci, si inserisce uno studio clinico, esplorativo, multicentrico per valutare la ripetibilità, la riproducibilità, l'accettabilità da parte dei pazienti e la validità clinica della RM renale multiparametrica, che vede il coinvolgimento di Università in Italia, Spagna, Danimarca, Germania, oltre che l'Istituto Mario Negri. Lo studio è attualmente in corso. È stato inoltre messo a punto un questionario per valutare la prospettiva dei soggetti partecipanti a studi di ricerca sull'utilizzo dei loro dati per ricerche future e sull'utilizzo dell'intelligenza artificiale per l'elaborazione di dati medicali. La somministrazione del questionario è attualmente in corso.
- II. **RM nucleare funzionale per monitorare la progressione delle MRC senza la necessità di biopsie ripetute: l'esempio della MPGN.** La MPGN è una malattia renale rara, con prognosi sfavorevole e mancanza di terapie specifiche. L'eterogeneità della malattia e la difficoltà di eseguire biopsie renali ripetute rappresentano un ostacolo importante nella gestione di pazienti con MPGN. Tra le tecniche di RM renali, quella pesata in diffusione (DWI-MRI), che permette di raccogliere informazioni dettagliate sulla microstruttura e funzione dell'organo, è stata utilizzata recentemente per localizzare il danno a carico del tessuto renale e valutarne il suo significato anche prima che si osservi

una riduzione della funzione renale, così da poter predire l'evoluzione funzionale e seguire le modifiche della microstruttura tissutale che si possono verificare durante il trattamento della MRC. Inoltre, la RM a contrasto di fase (PC-MRI) permette di valutare la perfusione dei reni, fornendo informazioni utili aggiuntive. Abbiamo applicato queste tecniche di RM (DWI-MRI e PC-MRI) al monitoraggio di un piccolo numero di pazienti con MPGN e documentato una correlazione importante e significativa tra i parametri di RM, i dati istologici della biopsia renale e quelli clinici (Villa et al., Nephron, 2024). Questi risultati sottolineano la potenziale validità della RM renale funzionale per monitorare la progressione di MRC. Mentre la biopsia renale rimane determinante per la diagnosi, la RM renale multiparametrica potrebbe limitare la necessità di biopsie ripetute per monitorare la progressione della malattia. Sono ora necessari studi con una numerosità di pazienti maggiore per confermare questi risultati e dimostrare il beneficio in rapporto ai costi di questo approccio con RM nella gestione delle malattie renali rare.

**III. Sviluppo di metodi di elaborazione di immagini basati sull'AI per approfondire la caratterizzazione della malattia policistica renale (studio AI4PKD).** Il volume totale renale è un biomarcatore importante per monitorare e predire la progressione dell'ADPKD e la risposta ai trattamenti. Dato che molti pazienti con ADPKD sono affetti anche da fegato policistico, il volume totale epatico e il volume delle cisti epatiche e del fegato possono fornire ulteriori informazioni rilevanti. Le misurazioni dei volumi epatici, renali, e delle cisti sono basate sulla segmentazione delle regioni di interesse, che generalmente è eseguita manualmente tramite tracciamento manuale. Tuttavia, questa è una tecnica operatore dipendente e che richiede molto tempo e competenza. Per questo si è reso necessario sviluppare dei metodi automatici che siano veloci e riproducibili, ma al tempo stesso accurati. Nell'ambito del consorzio *CYStic*, l'Istituto ha partecipato allo sviluppo e validazione di un algoritmo generato attraverso un approccio di AI per la misura di routine del volume totale renale (TKV) in pazienti con ADPKD, partendo da immagini ottenute con RM. Il nuovo algoritmo automatizzato si è dimostrato molto preciso nel determinare il TKV rispetto all'approccio di segmentazione normale. Questa tecnica di AI è stata validata in un range molto ampio di volumi renali, forma dei reni, e coesistenza di malattia policistica del fegato. Con questo approccio, i tempi di misura di TKV si riducono moltissimo (in media 9 minuti per caso) rispetto alla valutazione manuale tradizionale (in media un'ora per caso) (Taylor et al., Kidney Int. Rep., 2024). Oltre alla quantificazione dei volumi renali ed epatici, la caratterizzazione del tessuto renale non cistico può fornire informazioni rilevanti aggiuntive sulla patofisiologia dell'ADPKD. Tecniche avanzate di elaborazione delle immagini, come la radiomica, che mira ad estrarre dalle immagini radiologiche informazioni sull'eterogeneità spaziale dei tessuti, hanno il potenziale per caratterizzare la microstruttura tissutale. Le tecniche radiomiche potrebbero inoltre essere utili a costruire modelli multiparametrici di stratificazione e predizione. Nell'ambito dello studio AI4PKD, l'Istituto, in collaborazione con l'Istituto di Tecnologie Biomediche del CNR (Milano), l'Università di Bergamo e l'università americana Cornell University di New York, oltre a sviluppare tecniche basate sull'intelligenza artificiale, spiegabili e robuste, per l'identificazione accurata di reni, fegato e cisti, sta sviluppando tecniche avanzate per

l'identificazione di nuovi biomarcatori di imaging, anche attraverso l'uso della radiomica, per la caratterizzazione della microstruttura del tessuto ADPKD, per stratificare i pazienti e per il monitoraggio e la predizione della progressione di malattia e della risposta a nuove terapie. In collaborazione col Mannheim Institute for Intelligent System in Medicine dell'Heidelberg University (in Germania), l'Istituto ha inoltre sviluppato modelli multiparametrici che combinano il volume renale, caratteristiche radiomiche estratte immagini, dati clinici e di laboratorio, età e eGFR per predire lo stadio di MRC e la perdita di funzione renale nel tempo (Raj et al., Z. Med. Phys., 2024).

- IV. Sviluppo di tecniche basate sull'AI per caratterizzare la microstruttura del rene su immagini istologiche: studio AI-TIME.** L'analisi istopatologica basata sulla morfologia del tessuto renale gioca un ruolo chiave nella diagnosi e nelle decisioni terapeutiche di molte malattie renali. Ad oggi, l'analisi istopatologica viene principalmente eseguita in modo qualitativo, mediante ispezione visiva, richiedendo patologi esperti altamente qualificati. I risultati istopatologici vengono spesso valutati dai patologi anche utilizzando scale di classificazione diagnostica semiquantitativa, che sono comunque dispendiosi in termini di tempo e operatore dipendenti. Nell'ambito dello studio AI-TIME l'Istituto sta sviluppando nuove tecniche di elaborazione delle immagini istologiche renali, basate su metodi AI, che consentano di caratterizzare la microstruttura renale in diverse patologie e/o nei diversi stadi delle malattie. Ci proponiamo inoltre di identificare nuovi biomarcatori di imaging istologico che possano supportare la diagnosi differenziale, la stadiazione delle malattie, il monitoraggio e la predizione della progressione della malattia e della risposta alla terapia. Nell'ambito di precedenti studi clinici volti ad esplorare l'associazione tra biomarcatori di RM e variabili istologiche, abbiamo sviluppato un metodo di quantificazione del volume interstiziale peritubulare basato su tecniche di stereologia che, per quanto consenta una quantificazione accurata, è molto dispendioso in termini di tempo ed è soggetto alla variabilità intra- e inter-operatore. Per questo, in collaborazione con il Politecnico di Milano e l'Università degli Studi di Bergamo, mediante l'utilizzo di tecniche di AI e sulla base di quantificazioni manuali del volume interstiziale peritubulare utilizzate come gold standard, abbiamo sviluppato un tool consente di segmentare e quantificare in modo automatico tale volume. Il tool è attualmente in fase di validazione e testing su immagini istologiche tratte da biopsie di pazienti con patologie varie.
- V. Analisi di emodinamica computazionale nella stenosi dell'arteria renale dovuta a displasia fibromuscolare.** La stenosi dell'arteria renale dovuta a displasia fibromuscolare costituisce un importante problema clinico, la cui diagnosi dipende da misure di pressione a monte e a valle della stenosi, che attualmente vengono acquisite con una procedura invasiva di cateterismo. Il nostro obiettivo è sviluppare una procedura robusta che fornisca una stima affidabile dei valori di pressione usando tecniche di fluidodinamica computazionale e, in un secondo momento, validare la stessa confrontando i valori stimati con quelli misurati con cateterismo. In collaborazione con Saint-Luc Université Catholique di Lovanio, è stata sviluppata la procedura di simulazione fluidodinamica e sono stati raggiunti risultati interessanti su 6 pazienti (2 con patologia

grave focale, 2 con patologia moderata multifocale e 2 con patologia allo stadio iniziale focale) con risultati significativi per quanto riguarda la fattibilità della tecnica.

- **Studi in pazienti che necessitano terapia emodialitica cronica**

L'emodialisi è il trattamento più comune per pazienti che sviluppano insufficienza renale terminale in conseguenza della loro MRC. Il trattamento emodialitico richiede inizialmente la confezione di una fistola arterovenosa (FAV), ma il suo tasso di fallimento è ancora elevato. L'Istituto Mario Negri ha in corso alcuni studi clinici con l'obiettivo generale di migliorare l'esito della FAV a lungo termine in pazienti in emodialisi, di cui presentiamo di seguito un aggiornamento:

- i. **Utilizzo di un algoritmo di machine learning per la predizione del flusso sanguigno nella FAV.** Il dataset di 124 pazienti usato nello studio con il sistema di simulazione AVF.SIM, integrato con 32 pazienti aggiuntivi, è stato poi utilizzato per condurre un'analisi esplorativa volta a comprendere il potenziale delle nuove tecniche di machine learning per la predizione del flusso sanguigno nella FAV. Dopo aver testato diversi algoritmi di machine learning, abbiamo mostrato che  $k$ -NN è l'approccio che permette di ottenere la predizione più accurata del flusso di sangue dopo la maturazione della fistola arterovenosa, rivelandosi un valido algoritmo per il miglioramento della pianificazione della chirurgia dell'accesso vascolare per emodialisi (Doneda et al., J. Vasc. Access, 2024)
- ii. **Uso del dispositivo VasQ per la creazione delle fistole arterovenose: studio RESHAPE.** I meccanismi che determinano la formazione di stenosi nella FAV sono ancora poco chiari. Studi di fluidodinamica computazionale condotti dal nostro Istituto hanno evidenziato la presenza di flusso disturbato nel lato venoso della FAV. Partendo da evidenze sperimentali, l'azienda *Laminate Medical Technologies* ha realizzato il dispositivo VasQ, progettato per regolarizzare il flusso del sangue e favorire un moto più stabile nella FAV. Tuttavia, gli effetti benefici del dispositivo VasQ sulle condizioni emodinamiche nella FAV non sono ancora stati dimostrati. Un'analisi dettagliata dei cambiamenti morfologici legati all'adattamento dei vasi e dei cambiamenti emodinamici nell'accesso vascolare può essere ottenuta combinando tecniche di risonanza senza mezzo di contrasto e tecniche di fluidodinamica computazionale, con un metodo che è stato recentemente ottimizzato dal nostro gruppo di ricerca. Abbiamo disegnato e condotto uno studio pilota, monocentrico, a gruppi paralleli, longitudinale, prospettico (studio RESHAPE), in cui sono state confrontate FAV create usando il dispositivo VasQ e quelle confezionate con chirurgia tradizionale. I risultati hanno dimostrato la fattibilità di caratterizzare le modifiche morfologiche ed emodinamiche che si verificano nel tempo in FAV create usando il dispositivo VasQ ed hanno fornito evidenze preliminari dei suoi potenziali effetti emodinamici favorevoli (Bozzetto et al., J. Vasc. Access, 2024).
- iii. **Studio dell'interazione fluido-struttura nella FAV per emodialisi.** L'obiettivo di questo progetto è studiare la presenza di vibrazioni nella parete della FAV e di comprendere il loro possibile coinvolgimento nello sviluppo di stenosi. In collaborazione con il gruppo

norvegese *Simula Research Laboratory* di Oslo, il nostro Istituto ha rivisitato l'ipotesi che le vibrazioni possano avere un ruolo nello sviluppo di stenosi (Carrara et al., IJAO, 2024). Abbiamo sviluppato ed applicato tecniche sofisticate di simulazione in fluido-struttura, che costituiscono un importante passo avanti rispetto alle tecniche convenzionali di fluidodinamica computazionale, poiché permettono di modellare anche l'elasticità dei vasi. Abbiamo poi applicato i codici sviluppati in modelli paziente-specifici di FAV e dimostrato che la parete della vena vibra con frequenze elevate (Bozzetto et al., Phys. Eng. Sci. Med., 2024). Inoltre, evidenze preliminari mostrano che le vibrazioni con ampiezza e frequenza più elevate si collocano nelle zone della vena dove tipicamente si sviluppa la stenosi, suggerendo la presenza di un nuovo ed importante meccanismo che coinvolge la parete del vaso. Abbiamo poi condotto analisi di sensibilità per valutare la robustezza e la coerenza dei risultati ed iniziato ad applicare queste tecniche di simulazione nell'ambito di uno studio longitudinale attualmente in corso (Soliveri et al., BMM, 2024).

- iv. **Studio VASOUND: analisi acustica dei suoni emessi dal flusso sanguigno per rilevare complicanze vascolari nelle fistole per emodialisi.** Lo studio VASOUND ha l'obiettivo di esplorare le potenzialità dell'analisi acustica dei suoni emessi dalle fistole arterovenose per emodialisi come tecnica di monitoraggio e previsione di eventuali complicazioni. La registrazione e l'analisi dei suoni è semplice, poco costosa e non invasiva e può quindi consentire una sorveglianza continua della funzione degli accessi vascolari. Tuttavia, prima di entrare nella pratica clinica di routine, il suo valore prognostico e il suo potenziale devono ancora essere dimostrati. Lo studio VASOUND prevede l'arruolamento di 24 pazienti che necessitano la creazione della fistola ed è in corso presso *l'Unità di Nefrologia e Dialisi* dell'ASST Papa Giovanni XXIII di Bergamo. I pazienti vengono sottoposti a registrazione e analisi dei suoni e vengono monitorati parallelamente attraverso un'ecografia, in 8 visite distribuite nell'arco di due anni. Ad oggi sono stati arruolati 15 pazienti e le visite di follow-up di questi pazienti sono in corso. Una prima analisi ci ha permesso di mostrare che l'analisi del suono può fornire importanti informazioni sulle condizioni emodinamiche presenti della fistola arterovenosa e una misura indiretta del suo corretto funzionamento (Poloni et al., ABME 2024).

- **Terapie innovative per il trattamento delle malattie renali**

L'Istituto ha interesse di ricerca primario nelle terapie farmacologiche e cellulari innovative per la cura delle malattie renali e per il trapianto d'organo. Di seguito vengono presentati brevemente i risultati ottenuti in studi preclinici e clinici in questo campo di ricerca:

- i. **Approcci innovativi alle MRC.** Negli ultimi 50 anni sono stati fatti notevoli progressi nella ricerca pre-clinica e clinica delle malattie renali. Tuttavia, molti aspetti attendono ancora una soluzione, tra cui gli ostacoli alla diagnosi precoce delle malattie renali, le disparità all'accesso alle cure e la variabilità individuale alla risposta alle terapie esistenti, ma anche a quelle emergenti. Innovazioni nello sviluppo dei farmaci, ricerca in tecnologie, la medicina rigenerativa e l'ingegneria tissutale aprono oggi potenzialità importanti per migliorare la cura dei pazienti con MRC e possibilmente arrestarne la progressione. L'Istituto Mario Negri, che da anni affronta questi temi in campo di ricerca pre-clinica e

clinica, ha partecipato in una collaborazione internazionale alla stesura di un lavoro che delinea le nuove prospettive di interventi terapeutici in grado di implementare la capacità di fornire strategie avanzate e di impatto innovativo per la cura dei pazienti con malattie renali (Zoccali et al., Nat. Rev. Nephrol, 2024).

- ii. **Vescicole extracellulari ottenute da cellule stromali mesenchimali (MSC) per la rigenerazione del tessuto renale.** Il medium condizionato (CM) e le vescicole extracellulari (EV) derivate da cellule mesenchimali stromali umane da cordone ombelicale (ucMSC) hanno mostrato un interessante potenziale terapeutico nelle malattie renali. Il nostro studio ha permesso di confrontare in un modello di insufficienza renale acuta indotta da cisplatino nel topo, l'effetto del CM e delle EV e i risultati hanno mostrato un effetto renoprotettivo simile. Inoltre, abbiamo potenziato l'effetto rigenerativo delle EV modificando le ucMSC per fare overesprimere NAMPT, un mediatore cruciale del metabolismo mitocondriale. Le EV ingegnerizzate (EV-NAMPT) avevano maggiore efficacia nel ridurre il danno renale, sia in vitro che nel modello animale. Abbiamo anche osservato che le EV-NAMPT proteggevano la struttura renale, riducevano l'apoptosi, acceleravano la rigenerazione delle cellule renali e riducevano l'infiammazione. Questi dati saranno oggetto di pubblicazione di un articolo scientifico attualmente in preparazione.
- iii. **Rigenerare il cuore e rene diabetico utilizzando nanoparticelle in grado di rilasciare selettivamente l'ormone tiroideo (TH) nelle cellule danneggiate.** La nefropatia diabetica e la cardiopatia diabetica sono due fra le maggiori complicanze del diabete e causa di circa un terzo dei decessi nella popolazione diabetica. Studi preclinici e le fasi iniziali di studi clinici indicano che il trattamento con TH potrebbe rivelarsi una potenziale strategia terapeutica. Tuttavia, la necessità di utilizzare alte dosi di TH per stimolare i processi riparativi e rigenerativi negli organi danneggiati ne limita fortemente l'utilizzo nella pratica clinica. L'obiettivo del progetto è quello di sviluppare sistemi innovativi di rilascio mirato del farmaco basati su nanoparticelle, in grado di riconoscere e rilasciare il TH selettivamente nelle cellule danneggiate dallo stress diabetico per rigenerare i tessuti e ripristinare la funzionalità cardiaca e renale. A questo scopo sono stati sintetizzati due sistemi di delivery basati, rispettivamente, su nanoparticelle liposomiali e polimeriche. Entrambi i sistemi non hanno mostrato segni di tossicità sia in vitro, su podociti e cardiomiociti umani, che in vivo, in un modello animale di diabete di tipo 2 (ratti ZDF). Nel nostro laboratorio sono poi stati eseguiti studi di specificità in vivo per determinare la capacità dei nanotrasportatori di rilasciare TH selettivamente nel rene e nel cuore dei ratti diabetici. Dopo una singola somministrazione i.v. di entrambi i sistemi marcati con un fluoroforo, è stato osservato un accumulo selettivo di TH nel rene e nel cuore dei ratti ZDF, e l'assenza di deposito significativo negli altri organi studiati (e.g., cervello, polmoni, fegato). Sulla base di questi risultati siamo passati alla fase successiva dello studio che prevedeva il trattamento in cronico (3 mesi) in ratti ZDF per valutare l'efficacia terapeutica dei due sistemi. Da questi studi, è emerso che il trattamento con entrambi i nanotrasportatori ha migliorato significativamente la funzionalità cardiaca (diastolica e sistolica) e renale (riduzione della perdita di proteine nelle urine) negli animali diabetici.

Questi effetti sono accompagnati da una marcata riduzione della fibrosi in entrambi gli organi, riduzione del danno glomerulare e tubulare nel rene e dal mantenimento della funzionalità contrattile dei cardiomiociti. Infine, non è stato notato un aumento dei livelli sierici di T3 e non sono stati rilevati possibili effetti indesiderati sui due organi target (e.g., aumento del battito cardiaco, iperfiltrazione glomerulare), indicando che i nanotrasportatori rilasciano selettivamente TH nelle sole cellule danneggiate.

- iv. **Sviluppo di un organ-on-chip per riprodurre le funzioni del glomerulo in vitro.** Uno dei limiti maggiori nello studio di meccanismi patofisiologici e nello sviluppo di approcci terapeutici efficaci per patologie che causano MRC è la mancanza di modelli che possano riprodurre in modo adeguato il fenotipo delle malattie nell'uomo e l'elevata complessità fenotipica fra pazienti. Attualmente stiamo sviluppando un organ-on-chip a partire da iPSC per: i) riprodurre le funzioni del glomerulo in vitro; (ii) riprodurre più fedelmente malattie renali rare, come la sindrome di Alport; (iii) testare la tossicità e l'efficacia di farmaci in maniera personalizzata.
- v. **Studio NEPHSTROM.** La terapia cellulare con cellule mesenchimali stromali (MSC) rappresenta una strategia di trattamento innovativa per prevenire e riparare il danno renale della malattia diabetica. Il nostro Istituto, in collaborazione con i partner dei centri clinici di Bergamo, Galway (Irlanda), Birmingham e Belfast (UK), ha disegnato e coordinato il trial clinico NEPHSTROM di fase 1b/2a (Novel Stromal Cell Therapy for Diabetic Kidney Disease), che è parte di un progetto *EU Horizon 2020 Framework Programme* (grant 634086). L'obiettivo è di studiare in primo luogo la sicurezza, la fattibilità e la tollerabilità e, secondariamente, fornire dati preliminari sull'efficacia della terapia con MSC (purificate con tecnica innovativa dal midollo osseo di soggetti sani) in pazienti affetti da diabete di tipo 2 e nefropatia diabetica progressiva. NEPHSTROM è un trial randomizzato in doppio cieco che prevede gruppi di pazienti trattati con singole dosi di MSC (80, 160, 240x10<sup>6</sup> cellule) a gruppi sequenziali o con placebo, seguiti per 18 mesi. I risultati preliminari indicano la sicurezza e tollerabilità della terapia cellulare con ORBCEL-M nella coorte di pazienti trattati con la dose più bassa (80x10<sup>6</sup> cellule). La velocità di riduzione di GFR stimato (eGFR) durante i 18 mesi di follow-up era significativamente inferiore nei pazienti che ricevevano la terapia cellulare rispetto a quelli trattati con placebo. Nel 2024 sono in corso le analisi dei dati della seconda coorte di pazienti (MSC 160, 240x10<sup>6</sup> cellule).

- **Trapianto di rene**

Il trapianto d'organo è uno dei maggiori successi della medicina degli ultimi 40 anni, raggiunto grazie alle tecniche chirurgiche più avanzate e all'introduzione di nuovi farmaci e regimi di immunosoppressione che hanno ridotto al minimo il rischio di rigetto acuto dell'organo (Aiello et al., *J. Immunol.*, 2024). L'obiettivo ora è permettere all'organo trapiantato di sopravvivere a lungo evitando il rigetto cronico, un processo non ancora ben definito nei suoi meccanismi patogenetici e per il quale non ci sono approcci farmacologici adeguati o risolutivi, ma a cui in parte contribuisce anche la tossicità dei farmaci immunosoppressivi stessi.

L'Istituto, che da anni fa ricerca preclinica e clinica nel campo del trapianto di rene, si è dedicato ultimamente al problema del rigetto cronico e alle possibili strategie di prevenzione. Di seguito vengono presentati brevemente i risultati ottenuti in questo campo di ricerca:

**i. MSC nel trapianto di rene.** Studi condotti in centri americani nel decennio scorso hanno dimostrato la fattibilità clinica e, in alcuni casi, l'efficacia di terapie cellulari con cellule staminali ematopoietiche per indurre tolleranza in pazienti con trapianto di rene. Tuttavia, queste terapie cellulari richiedono regimi di condizionamento pre- e peri-trapianto con farmaci e biologici citotossici che pongono i pazienti a rischio elevato di infezioni (a volte mortali), aplasia midollare e malattia del trapianto contro il ricevente (GVHD). I rischi di questi protocolli superano di gran lunga i benefici associati all'eventuale sviluppo della tolleranza immunologica dell'organo trapiantato. Altri hanno proposto più recentemente una terapia cellulare con cellule immuni modificate derivate dal donatore del rene da trapiantare (MIC) (monociti e linfociti). Tuttavia, non esistono evidenze che questa strategia sia in grado di promuovere tolleranza immunologica in pazienti con trapianto di rene. Ciò ci ha suggerito di individuare soluzioni alternative che abbiano un rapporto rischio/beneficio accettabile nella pratica clinica. In questo contesto, l'infusione delle MSC potrebbe rappresentare la strategia alternativa ed innovativa per indurre tolleranza in pazienti con trapianto di rene. Ci sono anche evidenze che le MSC eludono il sistema immunitario e possono quindi essere infuse in un organismo allogenico senza rigetto e la necessità di regimi di pre-condizionamento. Sulla base di studi preclinici, l'Istituto ha disegnato e condotto alcuni progetti clinici con l'impiego delle MSC nel trapianto d'organo, di cui di seguito illustriamo quelli relativi al trapianto di rene:

- **Studio MSC-Tolerance.** Oltre alla loro potenzialità riparativa ed anti-infiammatoria, le MSC esercitano un'importante azione immuno-modulatoria che coinvolge le cellule T regolatorie, le cellule T della memoria e le cellule dendritiche. Sulla base dei risultati incoraggianti nel modello sperimentale di trapianto di rene e di cuore, abbiamo disegnato ed attivato per la prima volta un trial clinico con MSC autologhe in pazienti con trapianto di rene da donatore vivente. Si tratta di uno studio che ha come obiettivo iniziale la tollerabilità e la sicurezza dell'infusione pre-trapianto di MSC isolate dal midollo osseo e la caratterizzazione degli eventuali meccanismi di immuno-modulazione pro-tollerogenici attivati dalle cellule nel ricevente, in presenza della terapia farmacologica di immunosoppressione convenzionale. Nei lavori ad oggi pubblicati si dimostra che la terapia con MSC è sicura e, in alcuni pazienti, promuove lo sviluppo di un ambiente pro-tollerogenico. Sebbene lo studio iniziale non sia disegnato per verificare l'efficacia della terapia cellulare nell'indurre tolleranza immunologica al trapianto, il corso clinico favorevole e l'ambiente pro-tollerogenico sviluppato in un paziente dall'infusione pre-trapianto di MSC ha permesso di ridurre - e poi sospendere completamente - la terapia farmacologica immunosoppressiva. Da quasi 6 anni, il paziente non è più in terapia con farmaci antirigetto e ha una funzione perfetta del rene trapiantato; questo grazie al trattamento pre-trapianto con MSC isolate dal suo midollo osseo. Il nostro centro ha arruolato altri pazienti con trapianto di rene da donatore vivente che hanno ricevuto pre-trapianto con MSC autologhe; il loro

monitoraggio immunologico e quello della funzione dell'organo trapiantato proseguono secondo quanto previsto dal protocollo di studio. Nel 2024, un secondo paziente che ha sviluppato un ambiente pro-tollerogenico in seguito alla singola infusione pre-trapianto di cellule MSC autologhe ha completato il programma di riduzione e sospensione completa della terapia immunosoppressiva finora senza effetti negativi sulla funzione del rene trapiantato, che si mantiene nel range di normalità.

- **Studio Third-party MSC-TX tolerance.** Questo secondo studio, disegnato più recentemente dal nostro Istituto, coinvolge pazienti con trapianto di rene da donatore deceduto, la modalità più comune di trapianto di rene in Italia. Lo scopo generale dello studio è di testare la terapia cellulare con MSC allogeniche (terza parte) rispetto al ricevente ed al donatore dell'organo, come strategia per indurre tolleranza in pazienti che ricevono un trapianto di rene da un donatore deceduto. Le MSC vengono ottenute dal midollo osseo secondo protocolli standardizzati ed autorizzati dalle autorità regolatorie competenti. Anche per questo studio, l'obiettivo primario è stabilire la tollerabilità e sicurezza dell'infusione pre-trapianto delle MSC allogeniche e quello secondario è di caratterizzare gli eventuali meccanismi di immuno-modulazione pro-tollerogenici attivati dalle cellule nel ricevente, in presenza della terapia farmacologica immunosoppressiva convenzionale. Lo studio è randomizzato in aperto, con un gruppo di pazienti trattati con MSC e terapia immunosoppressiva convenzionale ed un secondo gruppo di controllo, in cui i pazienti ricevono la sola terapia di immunosoppressione convenzionale. Lo studio è stato chiuso dopo aver arruolato 11 pazienti.
- **Studio POWER.** Negli ultimi anni, un crescente interesse è stato rivolto all'uso della conservazione dinamica dei reni come strumento per migliorare il recupero funzionale e l'outcome a lungo termine dei reni trapiantati. Analisi retrospettive e uno studio randomizzato controllato hanno dimostrato che la perfusione del rene pre-trapianto con la Machine Perfusion (MP) è associata ad una minore incidenza del ritardo della ripresa funzionale dell'organo (Delayed Graft Function) e ad un prolungamento della sopravvivenza dell'organo trapiantato di più di un anno rispetto alla sopravvivenza dell'organo preservato mediante conservazione statica a freddo. Questo effetto benefico si osserva quasi completamente quando si trapiantano reni da donatori marginali. La perfusione pulsatile *ex vivo* è quindi diventata una procedura standard in caso di trapianto di reni da donatori marginali. Nonostante la perfusione *ex vivo*, il recupero funzionale dell'organo trapiantato e la sua sopravvivenza a lungo termine continuano ad essere sub ottimali. Una spiegazione potrebbe essere che durante il processo di perfusione si abbia comunque una qualche produzione di mediatori dell'infiammazione o dello stress ossidativo o una attivazione del complemento che sostengano comunque il danno da ischemia/riperfusion che può avere un impatto negativo sul trapianto specie quando si utilizzino reni da donatori marginali. Sulla base di questo rationale, abbiamo ipotizzato che la rimozione di queste sostanze durante il processo di perfusione utilizzando metodiche di assorbimento potrebbe aiutare a migliorare l'outcome del trapianto, specie nel caso di utilizzo di reni da donatori

marginali. Gli effetti benefici dell'emoadsorbimento sono stati documentati nel trattamento sostitutivo renale continuo per shock settico. Nel condizionamento degli organi pre-trapianto, è stato scoperto che l'adsorbimento di citochine abbinato alla perfusione normotermica riduce l'espressione genica infiammatoria e aumenta l'espressione genica della via della fosforilazione ossidativa nei reni umani. Per cui abbiamo disegnato uno studio per valutare se la procedura di adsorbimento consenta effettivamente di rimuovere i mediatori dell'infiammazione, dello stress ossidativo e i fattori del complemento che comunque si generano durante il processo di perfusione e verificare se questo si riflette in una riduzione delle resistenze vascolari intraparenchimali misurate durante la perfusione, effetto che avrebbe un valore prognostico in termine di recupero funzionale dell'organo trapiantato estremamente importante. L'obiettivo principale dello studio POWER è di esplorare gli effetti sui parametri biochimici e funzionali della perfusione combinata all'adsorbimento rispetto alla perfusione da sola. Lo studio è in corso inclusi nello studio 2 pazienti.

- **Studio ONSET.** Nei pazienti che ricevono un trapianto di rene, è necessario usare farmaci immunosoppressori che servono a ridurre o prevenire il rischio di rigetto. Alcuni di questi farmaci vengono infusi solo nei primi giorni del trapianto proprio per ridurre più efficacemente la reattività del sistema immunitario quando il rischio di rigetto è più elevato. Tra questi ci sono le timoglobuline, anticorpi che distruggono le cellule del sistema immunitario (linfociti) che possono causare il rigetto. Per questo motivo nel nostro Centro abbiamo messo a punto un protocollo che prevede l'infusione delle timoglobuline per sette giorni consecutivi a partire dal giorno del trapianto. La prima infusione inizia ancora prima che si esegua il trapianto affinché i linfociti vengano distrutti prima che il rene venga impiantato e possa quindi essere riconosciuto dal sistema immunitario come un organo estraneo. Questa prima somministrazione è quindi certamente la più importante, al punto tale che forse le infusioni successive di timoglobuline potrebbero anche non essere necessarie. Sulla base di questo ragionamento, a partire dal primo Aprile del 2023 abbiamo iniziato ad infondere solo la prima dose di timoglobuline, iniziando sempre l'infusione prima che si eseguisse il trapianto, evitando le somministrazioni successive. Il nostro obiettivo era quello di mantenere la stessa efficacia antirigetto, ma riducendo il rischio di effetti collaterali. Infatti, le timoglobuline riducono il numero di globuli bianchi e piastrine nel sangue e possono aumentare il rischio di infezioni, opportunistiche che sono facilitate dal fatto che l'attività del sistema immunitario è ridotta proprio dalle timoglobuline. In altre parole, gli effetti delle timoglobuline sul sistema immunitario che servono a ridurre il rischio di rigetto sono gli stessi che aumentano il rischio di infezioni. Lo studio ONSET ha l'obiettivo di confrontare il profilo rischio/beneficio, nel corso di un follow-up di sei mesi, di due regimi immunosoppressivi di induzione basati su una o sette infusioni perioperatorie a basso dosaggio di timoglobuline (o RATG) in aggiunta alla stessa terapia di induzione con basiliximab e steroidi (progressivamente ridotti dopo il trapianto) e terapia di mantenimento con inibitori della calcineurina e micofenolato mofetile. Si tratta di uno studio retrospettivo volto a confrontare i dati già raccolti per

motivi clinici nei riceventi di un trapianto di rene trattati con una sola dose di timoglobuline con i dati, anch'essi già raccolti, nei riceventi di un trapianto di rene che hanno invece ricevuto tutte e sette le dosi di timoglobuline presso l'UO di Nefrologia dell'Ospedale Papa Giovanni XIII. È in corso la raccolta dei dati per le analisi.

ii. **Studio PHOENIX.** Il trapianto d'organo è la sola opzione per milioni di pazienti con insufficienza funzionale terminale di un organo, ad esempio il rene. Nonostante i risultati del trapianto sono significativamente migliorati negli ultimi 10-20 anni, la necessità di terapia immunosoppressiva cronica determina una inibizione generalizzata del sistema immune del ricevente, esponendo i pazienti al rischio di tumori e infezioni (incluso COVID-19), oltre che ad aumentare i rischi di malattie cardiovascolari e metaboliche (i.e. diabete). Queste complicanze pongono un dilemma importante ai medici: bilanciare la riduzione della terapia immunosoppressiva con il rischio elevato di rigetti e perdita dell'organo trapiantato da un lato, con il rischio altrettanto elevato di infezioni e tumori dall'altro. Perciò c'è necessità urgente di terapie innovative in grado di indurre tolleranza del ricevente specificatamente verso l'organo trapiantato, riducendo al minimo o possibilmente eliminando la terapia cronica farmacologica antirigetto. Con questo obiettivo, l'Istituto Mario Negri, in collaborazione con *Consorti Institut d'Investigaciones Biomediques Ayguot PII Sunyer* (FCRB), in Barcellona, Spagna, e il *Centre Hospitalier Universitaire de Rennes* (CHUR) in Rennes, Francia, ha disegnato il progetto PHOENIX supportato da HORIZON-HLTH-2022-DISEASE-06-02. PHOENIX propone di valutare una nano-immunoterapia innovativa che consiste di nanoparticelle rivestite con complessi di proteine (molecole del complesso maggiore di istocompatibilità – MHC con uno specifico ligando) che dovrebbe essere in grado di riprogrammare le cellule del sistema immune specificatamente dirette contro l'organo trapiantato in cellule regolatorie in grado di indurre tolleranza al trapianto. Queste cellule riprogrammate infatti indurranno un microambiente tollerogenico, localmente nell'organo trapiantato, senza effetti sistemici. Questo progetto nasce sulla base di studi precedenti condotti da alcuni dei collaboratori di PHOENIX sulla riprogrammazione della risposta autoreattiva di cellule T per mitigare alcune malattie autoimmuni, e vuol estendere questo approccio alla capacità di bloccare il rigetto dell'organo trapiantato. L'obiettivo generale di PHOENIX è di validare attraverso studi sperimentali pre-clinici questo approccio nel trapianto di due organi (rene e fegato) in due modelli (topo e maiale) e raccogliere evidenze solide per trial clinici futuri. Il progetto è a metà del suo programma.

- **Studio EPIFARM-KiT**

Questo studio osservazionale, condotto all'interno del progetto EPIFARM, si occupa di esaminare come il profilo di prescrizione (i.e., incidenza e la prevalenza) dei farmaci immunosoppressori e di altri medicinali (i.e., statine) siano cambiati nel corso degli ultimi due decenni nei pazienti con trapianto di rene in Regione Lombardia. Per il periodo 2002-2021 sono stati identificati 3.030 interventi di trapianto di rene, eseguiti su 2.935 pazienti. 95 pazienti hanno avuto 2 trapianti nel periodo analizzato, in questo caso è stato considerato come evento indice il primo trapianto in ordine cronologico. Una prima grezza analisi della sopravvivenza ha dato come risultato che la probabilità di sopravvivenza stimata è del 98% a 1 anno, 92% a 5

anni, 80% a 10 anni, 63% a 15 anni e 46% a 20 anni. I principi attivi maggiormente prescritti nel corso del primo anno di follow-up risultano l'acido micofenolico (71%) nei pazienti in età superiore ai 18 anni al trapianto e il tacrolimus (76%) nei pazienti in età fino a 18 anni al trapianto. È infine interessante valutare i cambiamenti di prevalenza delle prescrizioni dei singoli principi attivi nel corso del periodo di osservazione, con un principio attivo che declina fortemente (ciclosporina) mentre tacrolimus e acido micofenolico arrivano ad avere una prescrizione di circa l'80% nel 2021. Le analisi sono state momentaneamente effettuate su circa la metà della popolazione: con l'anno successivo verranno effettuate le stime sull'intera popolazione lombarda.

- **Effetto delle forze emodinamiche e delle vibrazioni sulle cellule della parete vascolare**

Scopo del progetto del Dipartimento di Bioingegneria è lo studio delle sollecitazioni meccaniche generate dalla circolazione sanguigna sulle cellule endoteliali che rivestono la parete interna dei vasi e sulle cellule muscolari che costituiscono il vaso. Per raggiungere questo obiettivo abbiamo sviluppato e stiamo utilizzando tre dispositivi: un dispositivo basato su una geometria a piatto-cono che ci ha permesso di esporre colture di cellule endoteliali a diversi valori di sforzi di taglio; un secondo dispositivo con un piatto vibrante che permette di esporre colture di cellule endoteliali e muscolari a vibrazioni ad alte frequenze; un terzo dispositivo in cui è possibile alloggiare un tubo elettrofilato colonizzato da cellule endoteliali e muscolari ed esposto a flusso. L'attività sperimentale è in corso e permetterà di accrescere la nostra conoscenza sull'effetto che le sollecitazioni meccaniche hanno sull'espressione genica e sulla biologia molecolare delle cellule vascolari.

- **Applicazioni della micro tomografia assiale computerizzata a modelli sperimentali - Dipartimento di Bioingegneria**

La micro tomografia assiale computerizzata (microTAC) è una metodica diagnostica che permette di ottenere immagini anatomiche ad altissima risoluzione di strutture scheletriche e, con l'utilizzo di un mezzo di contrasto, dei tessuti molli. Uno dei mezzi di contrasto maggiormente utilizzati ex vivo è il Microfil, un polimero radiopaco a base di silicone, che permette la visualizzazione della rete vascolare e, dopo l'analisi delle immagini ottenute, la sua geometria assegnando ad ogni vaso il suo diametro ed il livello di ramificazione nella rete. L'utilizzo della microTAC, con l'infusione del mezzo di contrasto, ci ha consentito di studiare la vascolarizzazione e la crescita delle cisti renali in un modello sperimentale di rene policistico. In questo contesto, il Laboratorio di Medical Imaging, in collaborazione con l'Università degli studi di Bergamo, sta sviluppando un metodo automatico di segmentazione basato su tecniche di intelligenza artificiale per la quantificazione automatica dei volumi renali e delle cisti su immagini microTAC murine. In collaborazione con il laboratorio di Biologia e Terapia delle Metastasi Tumorali, stiamo inoltre valutando la possibilità di studiare l'evoluzione dell'angiogenesi (formazione di nuovi vasi sanguigni) in modelli di tumori murini mediante perfusione con Microfil. Useremo la microTAC come tecnica non invasiva per analizzare alterazioni del tessuto osseo causate dai tumori. È infine in corso la valutazione della crescita di metastasi tumorali nel fegato mediante infusione in vivo di un mezzo di contrasto a nanoparticelle.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELLE MALATTIE ONCOLOGICHE

Nell'ambito delle malattie oncologiche, l'obiettivo principale della ricerca è di rendere più efficaci le terapie per la cura dei tumori attraverso studi che approfondiscano gli aspetti molecolari, biologici e farmacologici, per arrivare ad applicazioni cliniche in grado di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita di pazienti oncologici.

I progetti riguardano diversi tipi di neoplasie. Tuttavia la maggioranza degli studi preclinici e clinici si focalizzano sui tumori ginecologici, sui sarcomi, sui tumori toracici (polmone, mesoteliomi e timomi), sui tumori pancreatici e sui tumori cerebrali con i seguenti obiettivi comuni:

- i. identificare nuovi bersagli molecolari per cui possano essere sviluppati nuovi farmaci
- ii. identificare nuovi marcatori diagnostici, prognostici e predittivi della risposta a specifiche terapie antitumorali per migliorare la diagnosi e la selezione delle terapie più adatte al paziente• studiare la biologia dei tumori, per comprendere i pathways responsabili della loro crescita e metastatizzazione, e i meccanismi di interazione con il microambiente, come i vasi sanguigni, i fibroblasti, la matrice extracellulare e la risposta immunitaria
- iii. Studiare il meccanismo d'azione e le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche di nuovi farmaci antitumorali, con meccanismo d'azione innovativo in grado di agire direttamente sul tumore o sulla sua interazione con l'ospite
- iv. Studiare i meccanismi alla base della resistenza ai farmaci antitumorali e possibili strategie per superarla
- v. Studiare nuove formulazioni basate sulle più innovative nanotecnologie e/o combinazioni di farmaci o del loro impiego "off-label", sia in modelli sperimentali che in clinica
- vi. Ottimizzare l'utilizzo di farmaci e strategie terapeutiche al fine di migliorare la normale pratica clinica
- vii. Affrontare i problemi metodologici sulla scelta del disegno più appropriato ed efficiente per la valutazione dell'attività clinica dei nuovi farmaci con meccanismi d'azione differenti dai chemioterapici tradizionali

### Principali ricadute di ricerca

Uno degli ambiti di eccellenza dell'istituto è la ricerca sul carcinoma ovarico, un tumore poco diffuso, ma altamente aggressivo e resistente alle terapie, sia attraverso studi preclinici che studi clinici sulle pazienti.

Gli studi preclinici hanno un'impronta tipicamente traslazionale e riguardano sia la comprensione delle caratteristiche biologiche di aggressività del tumore che lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici. Per questi scopi l'Istituto mantiene una biobanca di campioni biologici di pazienti con adenocarcinoma ovarico e una biobanca di modelli sperimentali derivati direttamente da paziente (PDX) che crescono in vivo in animali immunodeficienti. Alcuni studi hanno lo scopo di valutare nuove terapie che stanno mostrando dati promettenti negli studi clinici e ove possibile di integrare le informazioni molecolari (disponibili grazie alle tecnologie

omiche), con i parametri clinici per identificare determinanti molecolari con valore prognostico, predittivo e diagnostico, al fine di migliorare la terapia per le pazienti. Nello specifico, si stanno attivamente studiando dei marcatori in grado di predire la risposta ai composti del platino e agli inibitori della poli-ADP ribosio polimerasi (inibitori di PARP), farmaci di prima linea nel trattamento del carcinoma ovarico. L'identificazione di biomarcatori predittivi permetterebbe una stratificazione migliore dei pazienti evitando di trattare quelle pazienti con scarse probabilità di rispondere alla terapia e quindi di esporle al rischio di effetti collaterali senza beneficio terapeutico.

L'Istituto è promotore del gruppo cooperativo Mario Negri Gynecologic Oncology Group (MaNGO), che coordina vari centri ospedalieri per alcuni trial clinici sull'adenocarcinoma ovarico e altri tumori ginecologici.

In questo contesto, nel 2024 il dipartimento di oncologia clinica ha attivamente promosso e condotto uno studio clinico, denominato AtTEnd i cui risultati sono stati pubblicati su Lancet Oncology a Luglio del 2024. Lo studio ha ottenuto importanti risultati nel carcinoma endometriale avanzato o ricorrente somministrando il farmaco immunoterapico atezolizumab in combinazione alla chemioterapia (carboplatino e paclitaxel). La sperimentazione ha incluso 551 pazienti e gli esiti confermano il grande beneficio dell'aggiunta di atezolizumab alla chemioterapia standard nelle pazienti con carcinoma dell'endometrio metastatico e ricorrente, soprattutto in quelli in cui il tumore presenta una specifica caratteristica (il deficit del MMR, mismatch repair). I dati indicano che questa strategia migliora la sopravvivenza libera da progressione di malattia (ovvero il tempo che intercorre tra l'inizio del trattamento e il momento in cui la neoplasia si ripresenta). Nel 2025 saranno disponibili i risultati in termini di sopravvivenza globale. Lo studio AtTEnd è uno studio accademico internazionale, di fase III, in doppio cieco, randomizzato, che ha coinvolto 89 centri sperimentali in 10 nazioni. Lo sponsor di questo studio è il MaNGO (Mario Negri Gynecologic Oncology group. <http://www.mango-group.it>) e l'investigatore principale è la Prof.ssa Colombo dell'Istituto Europeo di Oncologia di Milano.

- **Tumore dell'ovaio**

- i. Il dipartimento collabora attivamente nella conduzione di un importante studio sul carcinoma ovarico sieroso di basso grado avanzato (LGSCO). Si tratta di una forma rara di tumore ovarico che è noto dalla letteratura rispondere poco alla chemioterapia ma che ha una elevata espressione dei recettori per estrogeni e progesterone. In questo setting si hanno dati promettenti da casistiche osservazionali per farmaci come il Letrozolo, il quale inibisce la produzione di estrogeni dal tessuto adiposo nelle donne in postmenopausa. Su queste basi il dipartimento in collaborazione con l'E.O. Ospedali Galliera di Genova ha ideato e attivato uno studio clinico di fase III (studio LEPRE) volto a confrontare la superiorità, in termini di sopravvivenza libera da progressione, di una terapia ormonale con Letrozolo, rispetto alla chemioterapia standard, nel trattamento in prima linea o adiuvante, in pazienti con carcinoma ovarico sieroso di basso grado avanzato (LGSCO) positivo per i recettori estrogeni (ER) e/o progesterone (PgR), che hanno effettuato un intervento di chirurgia citoriduttiva. Lo studio LEPRE nel corso del

2024 ha proseguito il reclutamento delle pazienti, sono state incluse circa 40 pazienti delle 130 previste. La fine dello studio è prevista per 2027.

- ii. Un altro importante contributo del dipartimento nell'ambito del tumore dell'ovaio è stata l'ideazione e attivazione dello studio IOLANTHE, uno studio italiano multicentrico di fase IV, volto a descrivere le caratteristiche cliniche e molecolari che potrebbero indirizzare le pazienti con diagnosi di carcinoma epiteliale avanzato dell'ovaio, delle tube di Falloppio o peritoneale primario di alto grado e positive al test HRD (Homologous Recombination Deficiency), a ricevere olaparib più bevacizumab come mantenimento in prima linea e per 86 confermare l'efficacia clinica e la sicurezza di olaparib quando somministrato in associazione con bevacizumab. Promotore dello studio è il gruppo YMaGiNe (Young MaNGO Gynecologic Network). Lo studio include due importanti due progetti di ricerca traslazionale. Il primo relativo all'analisi del DNA tumorale circolante (ctDNA) derivante dai campioni di plasma raccolti a differenti tempistiche (biopsia liquida) con l'obiettivo di valutare e monitorare, attraverso metodiche di Next Generation Sequencing, l'evoluzione della malattia e i cambiamenti dello stato mutazionale dei geni correlati al meccanismo di ricombinazione omologa (HR) che potrebbero portare ad una differente sensibilità ai PARP inibitori. Il secondo relativo alla generazione di modelli organotipici che includano cellule staminali tumorali. L'obiettivo sarà quello di valutare se questo approccio sarà in grado di predire la risposta al PARP inibitore nelle pazienti con carcinoma ovarico. Nel corso del 2024 è stata completata l'attivazione dei centri sperimentali ed è iniziata l'inclusione delle pazienti in studio. La fine dello studio è prevista per 2027.

- **Tumore dell'endometrio**

- i. L'Istituto coordina la conduzione e raccolta dati nell'ambito di uno studio osservazionale retrospettivo/prospettico, multicentrico, volto a valutare gli esiti clinici e la sicurezza della combinazione pembrolizumab-lenvatinib in pazienti con diagnosi di carcinoma endometriale avanzato in un contesto real life (Studio REALITY). Si tratta di una raccolta dati che coinvolge oltre 30 centri ospedalieri di ginecologia oncologica in Italia e che ha l'obiettivo di valutare l'efficacia della combinazione pembrolizumab-lenvatinib, in termini di sopravvivenza libera da progressione (PSF), il profilo di sicurezza della combinazione, in termini di tasso di riduzioni/interruzioni della dose, nelle pazienti con diagnosi di carcinoma endometriale avanzato trattate nella pratica clinica. Lo studio è già attivo in 15 centri ospedalieri e 36 pazienti sono già state incluse.
- ii. L'Istituto coordina la creazione di un registro internazionale sulle neoplasie ginecologiche rare, con l'obiettivo di raccogliere e condividere le conoscenze su queste neoplasie. Attualmente in Europa non esistono banche dati che si occupino di tumori ginecologici rari e la necessità di disporre di database multicentrici è supportata dai risultati ottenuti sia con studi retrospettivi che prospettici. Molti studi retrospettivi pubblicati da gruppi di collaborazione nazionali e internazionali hanno portato a cambiamenti significativi in alcune delle linee guida disponibili. Gli obiettivi specifici del

progetto, realizzato in collaborazione con il gruppo YMaGiNe (Young MaNGO Gynecologic Network) sono:

- a. Creare un registro retrospettivo/prospettico al fine di raccogliere retrospettivamente e prospettivamente dati epidemiologici, patologici e clinici su tumori ginecologici rari utilizzando una modalità condivisa per standardizzare questa raccolta tra le diverse banche dati nazionali esistenti;
- b. Descrivere le principali modalità di diagnosi e trattamento di questi tumori nei centri di riferimento europei;
- c. Diffondere le conoscenze sui tumori rari;
- d. Promuovere la collaborazione e il confronto tra i centri coinvolti nel trattamento di questi tumori

Sono attualmente attivi 12 centri clinici in Italia, con la registrazione nel database di circa 200 casi.

- iii. Partendo da PDX stabilizzati in topi immunodeficienti e molto responsivi a platino e olaparib (inibitore della poli-ADP-ribosio polimerasi) si sono ottenuti dei modelli PDXs resistenti a questi farmaci attraverso cicli ripetuti di trattamento in vivo. La caratterizzazione di questi modelli ci ha permesso di capire come una modificazione del **metabolismo tumorale** sia associata allo sviluppo della resistenza al platino e ci ha permesso di contrastare la resistenza interferendo con il metabolismo con la metformina, uno tra i più prescritti farmaci antidiabetici orali. Questi dati sono importanti perché potenzialmente associati ad una rapida trasferibilità clinica, considerato che la metformina è un farmaco approvato per l'uso clinico. Inoltre, questi dati hanno aperto la strada a nuovi studi in cui si andranno a testare combinazioni di diversi regimi dietetici con o senza metformina in associazione alla chemioterapia.
- iv. Sempre nell'ambito dello studio sul metabolismo, le ricerche svolte nel dipartimento hanno portato altre importanti informazioni sul ruolo dei mitocondri nel carcinoma ovarico e sull'opportunità di colpire questi organelli cellulari con farmaci ad hoc per contrastare la crescita tumorale. Negli ultimi anni si è infatti capito che il mitocondrio può rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico, e numerosi inibitori dell'attività dei mitocondri sono in fase di sviluppo. Abbiamo individuato due biomarcatori (PGC-1 $\alpha$  e PGC-1 $\beta$ ) che consentono di distinguere i tumori ovarici altamente dipendenti dal metabolismo mitocondriale e per questo sensibili all'azione di un inibitore della fosforilazione ossidativa, un processo svolto selettivamente nel mitocondrio.
- v. Stiamo inoltre studiando, sia mediante studi di combinazioni farmacologiche in vitro che in modelli preclinici in vivo, se interferire con i mitocondri possa migliorare anche l'efficacia di altri farmaci, inclusi gli inibitori di PARP, gettando le basi per estendere l'utilizzo di questa terapia innovativa ad un più ampia pletera di pazienti.
- vi. Studi analoghi su tumori resi resistenti a olaparib ci hanno permesso di capire come il ripristino della capacità di riparo nei **tumori resistenti** sia in parte responsabile dell'acquisizione della resistenza e sono in corso studi di combinazione con inibitori della

riparazione del DNA (inibitori di ATR e inibitori di PolQ) per rallentare e/o superare la resistenza a olaparib.

- vii. Un gruppo di **tumori ovarici** particolarmente raro (**di tipo mucinoso**) è attivamente studiato a livello preclinico, caratterizzando nuovi modelli cellulari e PDX che ricapitolino le caratteristiche cliniche di questo sottotipo particolarmente aggressivo e per il quale non esistono terapie mirate.
- viii. Tra le terapie in sviluppo clinico, il Dipartimento ha indagato l'attività di un nuovo inibitore di PARP di seconda generazione, che è risultato essere più efficace e meno tossico dei farmaci di prima generazione. Abbiamo dimostrato che il nuovo farmaco è efficace anche sui tumori resistenti ad olaparib e può essere somministrato in combinazione con la chemioterapia riducendo sia la crescita del tumore primario che la formazione di metastasi addominali.

- **Tumori rari**

- i. Le ricerche dell'Istituto Mario Negri sui tumori rari sono sempre focalizzate allo sviluppo di nuovi modelli preclinici che aiutino a definire le caratteristiche biologiche di questi tumori e all'integrazione degli aspetti farmacodinamici con quelli farmacocinetici dei farmaci antitumorali, un aspetto che viene spesso trascurato negli studi sperimentali. L'efficacia nell'inibire la crescita tumorale viene considerata non solo in relazione alla dose ma anche alla concentrazione nel sangue e nei tessuti del farmaco. Questo è un aspetto importante per programmare meglio la terapia in clinica. A questo scopo, vengono effettuati esperimenti in vivo di attività antitumorale e di valutazione della distribuzione del farmaco (sia nell'intero organismo tramite tecniche analitiche quantitative sia nello stesso tumore tramite metodiche di imaging). Gli studi in vitro permettono di comprendere i meccanismi molecolari alla base dell'efficacia antitumorale che si riscontra in vivo con i modelli sperimentali appropriati.
- ii. Ci occupiamo di particolari tipi di sarcomi, i liposarcomi mixoidi e leiomiomasarcomi, tumori rari caratterizzati da prognosi infausta se diagnosticati in fase avanzata. Si indagano i meccanismi molecolari e cellulari responsabili dell'aggressività di questi tumori. Per questo è necessario disporre di modelli adeguati agli studi di ricerca preclinica. La nostra ricerca si focalizza sullo sviluppo di nuove linee cellulari, che possono essere mantenute in coltura in vitro per specifici studi molecolari e di modelli murini che permettono di indagare l'azione del farmaco sull'organismo. Tali modelli riproducono le caratteristiche biologiche e cliniche dei tumori umani in termini di caratteristiche fenotipiche e genotipiche.
- iii. Tra i tumori toracici si stanno attivamente studiando timoma e mesotelioma, tumori rari per cui ci sono poche terapie disponibili e per i quali scarseggiano anche i modelli preclinici. In laboratorio sono stati generati modelli PDX sia di timomi che di mesoteliomi che ricapitolano le caratteristiche dei tumori originati nel paziente e che saranno fondamentali per scoprire nuovi potenziali target per lo sviluppo di farmaci. Inoltre, si stanno valutando alcune proteine coinvolte nella riparazione del DNA come biomarcatori di risposta al cisplatino nel mesotelioma. Inoltre, nell'ambito del carcinoma del polmone non a piccole cellule ci si è focalizzati sulla generazione di sistemi cellulari con specifiche mutazioni che si ritrovano nei tumori umani. Sono disponibili

modelli transgenici che sviluppano tumori al polmone con mutazioni caratteristiche nonché PDX ed organoidi che rappresentano un ulteriore step tra i modelli cellulari in coltura e i tumori umani. I diversi gradi di complessità di questi sistemi sono fondamentali per validare i risultati ottenuti in sistemi semplici e per accelerare la trasferibilità clinica.

Nel 2024 i nostri ricercatori hanno attivamente partecipato alla stesura del report di fine studio e dell'articolo scientifico sui risultati dello studio clinico RELEVENT pubblicati sulla rivista *Annals of Oncology*. Lo studio RELEVENT ha ottenuto importanti risultati nel carcinoma timico, tumore raro e aggressivo, ponendo le basi per supportare la scelta di una terapia di combinazione come prima linea di trattamento. I dati hanno evidenziato una percentuale di risposte superiore alle attese, ottenuta con l'aggiunta di un farmaco anti-angiogenico (ramucirumab) alla chemioterapia standard (carboplatino e paclitaxel). Lo studio Relevent è uno studio nazionale di fase II a cui hanno partecipato 52 pazienti con diagnosi di carcinoma timico avanzato, recidivo o metastatico o con diagnosi di timoma B3 con aree di carcinoma, afferenti a 6 centri sperimentali dislocati su tutto il territorio italiano. Lo studio Relevent ha coinvolto l'Istituto Mario Negri in collaborazione con la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano, capofila del Progetto.

- **Tumori del polmone**

Un altro importante tumore toracico sul quale i nostri ricercatori concentrano da anni le proprie attenzioni è il tumore al polmone non a piccole cellule (NSCLC), il tipo di tumore polmonare con più alta incidenza. Nel 2024 è stato messo a punto, in collaborazione con la Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano uno studio clinico di fase II volto a esplorare il profilo di sicurezza e di efficacia di una re-irradiazione toracica seguita da un trattamento sistemico a base di immunoterapia in pazienti con recidiva toracica +/- oligometastasi a seguito di una terapia precedente che includeva un trattamento chemo-radioterapico concomitante o sequenziale seguito da una terapia di mantenimento con durvalumab. Questo studio, denominato AUSTRAL, è promosso dall'Istituto Mario Negri e prevede di coinvolgere 9 Ospedali in Italia e in Svizzera. Lo studio è attualmente in attesa di ricevere le approvazioni necessarie da parte del Comitato Etico Nazionale e delle Autorità Competenti e l'inclusione del primo paziente in studio è prevista per la prima metà del 2025.

- **Organoidi per lo studio di Tumori del polmone e dell'ovaio**

Creazione di nuovi modelli cellulari complessi, definiti organoidi, che rappresentano un ottimo intermedio tra i sistemi cellulari classici che crescono in 2D e i modelli animali. Questi organoidi, attualmente studiati per il tumore del polmone e per il tumore ovarico, crescono in 3 dimensioni e contengono, oltre alle cellule tumorali, anche cellule normali, come si ha nei tumori umani. Gli organoidi selezionati mantengono le stesse caratteristiche sia del tumore originario del paziente sia del tumore cresciuto in animali immunodeficienti, rappresentando quindi una utile alternativa ai modelli animali, almeno per alcuni studi di "high-throughput".

- **Tumore del colon**

Un altro campo di interesse è il tumore al colon. L'Istituto è coinvolto in tale ambito come Partner nel Progetto LIBImAb, finanziato dal Bando 2018 per la Ricerca Indipendente approvato da AIFA. In particolare il progetto verte sullo studio del tumore del colon-retto (CRC), secondo tumore più comunemente diagnosticato al mondo, responsabile di circa il 12% dei decessi in

ambito oncologico. La determinazione delle mutazioni RAS e BRAF costituisce un passo importante nel trattamento personalizzato del CRC. Nonostante la risposta iniziale al trattamento, la malattia progredisce inevitabilmente. L'eterogeneità dei diversi sottocloni e la differenza tra tumore primario e metastatico rappresentano alcune delle possibili cause del fallimento terapeutico. La presenza di tracce tumorali nel flusso sanguigno di un paziente è stata identificata come potenziale biomarcatore individuale con importanza prognostica. Con questo studio si vuole identificare il miglior trattamento a base di anticorpi monoclonali nel CRC metastatico RAS/BRAF wild type sul tessuto tumorale e la mutazione RAS/BRAF sulla biopsia liquida. Inoltre si vuole valutare se la biopsia liquida possa essere utilizzata nella pratica clinica come analisi integrata nella valutazione del tessuto mutazionale, per identificare le mutazioni RAS e BRAF non rilevate sui tessuti. Lo studio è attualmente in corso e coinvolge circa 110 ospedali italiani nel reclutamento di pazienti considerati eleggibili. A dicembre 2024 circa 420 pazienti sono stati sottoposti a screening per l'inclusione in questo studio clinico.

- **Microambiente tumorale**

L'istituto si occupa da tempo del microambiente tumorale, l'insieme di cellule non tumorali e di molecole che sono presenti nel tumore solido e che ne favoriscono la crescita, la resistenza alla risposta immunitaria, la formazione di metastasi a distanza e la resistenza alle terapie. Gli studi sono in particolare rivolti alle strutture vascolari ai fibroblasti e alle componenti della matrice extracellulare, che forniscono un supporto strutturale e funzionale ai tumori e si focalizzano principalmente su 4 aspetti:

i) la formazione di metastasi, per comprendere i pathways e meccanismi molecolari che regolano l'interazione tumore/microambiente sia nella sede primaria che negli organi sede di metastasi anche utilizzando tecniche di "omica". Ci focalizziamo in particolare su metastasi di carcinoma della mammella alle ossa e al polmone, e metastasi di carcinoma del pancreas al fegato. In particolare sono state sviluppate varianti di carcinoma duttale del pancreas che differiscono per la capacità di metastatizzare al fegato

ii) il fenomeno della dormienza delle metastasi, la capacità di cellule tumorali metastatiche di entrare in uno stato di quiescenza per poi risvegliarsi, anche dopo anni, a dar luogo a metastasi. Per questi studi è stato messo a punto un modello per identificare le cellule dormienti anche in vivo, che permettono di studiare i meccanismi che regolano questo processo nella sua complessità.

iii) la risposta ai farmaci, con lo scopo di capire come l'interazione tumore-microambiente altera la risposta o resistenza dei tumori alla chemioterapia ma anche per identificare nuovi bersagli e per disegnare approcci terapeutici volti a modificare il microambiente dei tumori per renderlo sfavorevole alla crescita del tumore e potenziare l'attività dei farmaci antineoplastici.

iv) l'identificazione e la validazione di marcatori di diagnosi e di risposta alle terapie derivati dallo stroma.

- Una importante attività è quella di identificare nuovi farmaci e/o trattamenti di combinazione mediante l'utilizzo di tecniche di "high-throughput" che permettono di studiare in maniera massiva l'effetto di farmaci su un sistema cellulare (mediante utilizzo di librerie con più di 2000 farmaci già approvati per tutte le patologie per utilizzo clinico). Inoltre, queste moderne tecniche permettono di identificare nuovi bersagli terapeutici grazie all'utilizzo di **librerie di siRNA e di librerie di CRISPR**, che

permettono di regolare negativamente o di eliminare la funzione di un singolo gene nella cellula. Questi studi sono fondamentali, ad esempio, per il **riposizionamento di farmaci** approvati per una patologia ma potenzialmente efficaci da soli o in combinazione anche nelle patologie oncologiche.

- L'eterogeneità dei tessuti tumorali e della distribuzione del farmaco rappresenta una delle cause che limitano l'efficacia dei trattamenti chemioterapici. L'Istituto Mario Negri si è focalizzato sullo studio quantitativo della distribuzione bi- e tri-dimensionale dei farmaci nei **sarcomi e mesoteliomi, tumori rari** con scarse opzioni terapeutiche. Abbiamo messo a punto tecniche di imaging basate sulla spettrometria di massa (Mass Spectrometry Imaging, MSI) e tecniche ad elevata sensibilità e specificità, grazie alla nuova strumentazione Orbitrap disponibile presso il Dip. Ambiente e Salute. Queste metodiche permettono di studiare in modelli di xenotrapianti l'efficacia di trattamenti che potrebbero migliorare la distribuzione del farmaco nei tessuti.

- L'istituto svolge anche attività sperimentale mirata a valutare il possibile utilizzo dell'acido retinoico nell'ambito del trattamento personalizzato della **leucemia acuta mieloide e del carcinoma mammario** e dei retinoidi per il trattamento dei liposarcomi mixoidi. L'acido retinoico è un farmaco antileucemico ed antitumorale fortemente innovativo in quanto è caratterizzato da un meccanismo d'azione molto diverso da quello dei comuni chemioterapici, non essendo un agente cito-tossico diretto, ma il primo esempio di agente cito-differenziante. Infatti, l'azione antitumorale dell'acido retinoico è legata alla sua capacità di indurre la differenziazione della cellula neoplastica verso una cellula che presenta caratteristiche molto più simili a quelle di una cellula normale. Visti i risultati preclinici incoraggianti ottenuti negli anni scorsi nell'ambito del trattamento personalizzato della leucemia acuta mieloide e del carcinoma mammario con l'acido retinoico, abbiamo deciso di allargare le nostre linee di ricerca al carcinoma gastrico, un tumore fortemente eterogeneo per il quale mancano strategie terapeutiche al di là della resezione chirurgica. In particolare, sono in corso studi mirati a valutare il potenziale antiproliferativo dell'acido retinoico sia su un largo pannello di linee cellulari derivate da pazienti affetti da carcinoma gastrico che su colture tissutali di tumore dello stomaco provenienti da campioni chirurgici. Questi approcci sperimentali sono utilizzati anche per mettere a punto modelli di espressione genica, basati su studi di "RNA-sequencing" a livello genomico, in grado di predire la responsività dei pazienti a trattamenti con acido retinoico. L'istituto svolge anche attività sperimentale mirata a valutare il possibile utilizzo dell'acido retinoico.

- Il laboratorio di Trasduzione del Segnale studia il coinvolgimento della proteina ERO1A nei tumori. Particolare attenzione è rivolta ai tumori al seno di tipo Triplo Negativo che risultano particolarmente resistenti ai trattamenti chemioterapici (Zito E et al Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2024). I nostri studi su modelli murini mirano a determinare il ruolo di ERO1A nel tumore e nel sistema immunitario, che rappresenta una difesa essenziale contro lo sviluppo tumorale. Inoltre, stiamo sviluppando inibitori di ERO1A in un'ottica di una terapia target antineoplastica.

- Un ruolo importante è infine quello di promuovere e coordinare studi clinici, principalmente farmacologici, di fase II e di fase III, in collaborazione con gruppi di ricerca nazionali ed internazionali.

L'obiettivo principale di questi studi è la valutazione dell'efficacia di medicinali sperimentali rispetto a terapie considerate standard per una determinata patologia.

- In aggiunta, e di estrema rilevanza ed importanza per i pazienti, sono gli **studi di monitoraggio terapeutico di farmaci in campo emato-oncologico** in favore di pazienti pediatrici ed in età adulta. Un altro fondamentale momento di ricerca si basa sul riconoscimento che la caratterizzazione genomica dei singoli tumori può ora giocare un ruolo potenzialmente molto rilevante nello sviluppo dei farmaci e nell'individualizzazione dei trattamenti. C'è inoltre molta incertezza intorno al ruolo dei biomarcatori nello sviluppo dei farmaci e l'implementazione delle tecnologie genomiche negli studi clinici ed è necessario riuscire a migliorare la metodologia e ad anticipare la valutazione dei biomarcatori già nelle fasi precoci di ricerca così da permettere che la ricerca traslazionale passi da una semplice ricerca di correlazioni alla produzione di conoscenze sul ruolo predittivo dell'attività clinica dei trattamenti in studio. Sempre nel campo della ricerca valutativa all'interno del Dipartimento vi sono attività di ricerca e di formazione nell'ambito del: dolore cronico (con particolare attenzione all'uso dei farmaci oppioidi); fattori predittivi di sopravvivenza in malati in fase avanzata di malattia tumorale; e programmi formativi e valutativi in relazione all'appropriatezza prescrittiva e terapeutica nei malati a fine vita.

- L'Istituto, infine, coordina e supporta metodologicamente il Servizio Sanitario Nazionale e diverse Società o Associazioni Medico-Scientifiche nazionali e internazionali nella produzione di linee guida, dalla formulazione del quesito clinico alla pubblicazione delle raccomandazioni. Questa attività viene svolta adottando il metodo GRADE (Grading of Recommendations Assessment, Development and Evaluation): una metodologia trasparente, analitica e condivisa dai principali enti internazionali preposti alla produzione di linee guida (WHO, NICE, ecc.). Il metodo consente di produrre raccomandazioni ex-novo, di adottare o fare l'Adolpment di Linee Guida già esistenti di elevato standard metodologico.

- Dopo l'entrata in vigore della Legge Bianco/Gelli e dopo l'istituzione del Nuovo Sistema Nazionale Linee Guida (SNLG) dell'Istituto Superiore di Sanità, ha contribuito alla pubblicazione sul SNLG di più di 20 Linee Guida, attualmente riconosciute da Ministero della Salute come riferimento nazionale per la pratica clinica.

Il Responsabile e alcuni collaboratori sono membri del GRADE Working Group Internazionale con sede alla MacMaster University, Hamilton, Canada; membri di Cochrane Italia, con sede presso l'IRCCS Istituto delle Scienze Neurologiche di Bologna.

L'organico del Laboratorio è composto da statistici/metodologi, epidemiologi clinici, bibliometristi, psicologi, medici di medicina generale e medici oncologi.

Fanno parte delle attività core progetti di revisione sistematica e meta-analisi della letteratura medico-scientifica, oltre a lavori metodologici sui principali strumenti per la valutazione delle evidenze scientifiche.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO MALATTIE AMBIENTALI

Studi di **predizione della tossicità e dell'esposizione agli inquinanti mediante metodologie in silico**. Questa linea di ricerca ha permesso di ottenere dei riconoscimenti internazionali e ha favorito la partecipazione a progetti e reti a livello europeo. Sono stati sviluppati ~~diversi~~ numerosi modelli in silico per predire la tossicità di sostanze chimiche, ~~sostanze~~ anche di origine naturale presenti nei cosmetici e contaminanti alimentari. Si sono indagate inoltre proprietà ambientali ed ecotossicità di farmaci e fitofarmaci. Si sono studiate tramite simulazioni al computer le proprietà di distribuzione delle sostanze chimiche sia nell'ambiente sia all'interno del corpo umano per migliorare la stima dell'esposizione al fine di migliorare la gestione del rischio. I **modelli sviluppati** tramite metodologia QSAR o read-across sono **disponibili gratuitamente sul sito VEGA ([www.vegahub.eu](http://www.vegahub.eu))**.

Più nel dettaglio su questa tematica nel 2024:

- i. il progetto **ALTERNATIVE** si è occupato di sviluppare modelli basati su intelligenza artificiale e machine learning per descrivere l'interazione di composti cardiotossici con alcuni dei target principali coinvolti in questo processo sia per i farmaci (modellando per esempio l'inibizione del canale hERG) o dei contaminanti ambientali, valutando lo stress ossidativo
- ii. i progetti **PARC** ed **ED-SCREEN** si sono occupati di *interferenti endocrini*, ossia composti che alternano il normale funzionamento del sistema endocrino con gli obiettivi di: i) di sviluppare un sistema di **screening** virtuale che consenta di prioritizzare i composti potenzialmente più problematici, ii) mappare i metodi in silico a supporto della delle strategie di testing per i composti interferenti con l'omeostasi dell'asse **tiroideo**
- iii. Nel progetto **PARC** si è stilato un elenco di software che possono essere utilizzati per valutare le proprietà tossicologiche e di esposizione per informare sull'utilizzo di sostanze alternative più sicure secondo il principio del **Safe and Sustainable by Design**
- iv. In due progetti finanziati da **EFSA** si sono sviluppati modelli relativi agli effetti ecotossicità dei fitofarmaci lavorando su specie solitamente meno considerate quali gli **anfibi** (nel contesto del progetto relativo al database **OpenFoodTox**) e modelli per predire le proprietà **tossicocinetiche** e ADME per le sostanze di rilevanza alimentare nel progetto **ADME4GNRA**
- v. Nel progetto **ONTOX** si sono sviluppati modelli per valutare l'interazione con i principali target molecolari coinvolti nello sviluppo di patologie quali steatosi, colestasi, ritardo nello sviluppo cognitivo, necrosi tubulare nel rene
- vi. Nel progetto PREMIER si sono studiati gli effetti dei farmaci sull'ambiente, costruendo un database di tali effetti.

- **Analisi dei residui metabolici nei reflui urbani per stimare l'esposizione della popolazione a xenobiotici ambientali e valutare i rischi per la salute umana.**

Questa metodologia rappresenta un punto di eccellenza dell'Istituto. Inizialmente sviluppata per stimare il consumo di droghe d'abuso, è stata poi proposta come metodo complementare agli studi di biomonitoraggio per valutare l'esposizione umana a contaminanti ambientali e alimentari, potenziali cause di patologie nei soggetti esposti. Un primo esempio è dato dallo sviluppo di un metodo per la stima dell'esposizione della popolazione ai pesticidi, presenti negli alimenti vegetali, a livello europeo ed internazionale. La metodologia è stata successivamente ampliata per studiare l'esposizione ad altri contaminanti dei cibi quali le micotossine e bisfenoli, monitorando la presenza di specifici metaboliti urinari. Lo stesso approccio viene anche applicato per valutare l'aderenza ai trattamenti per farmaci ad uso cronico, è stato recentemente condotto un primo studio pilota a livello nazionale.

- **Progetto PARC**

In questo progetto si è organizzato uno studio europeo per la stima dell'esposizione a differenti contaminanti tra cui parabeni e prodotti industriali. In particolare la nostra attività prevede di stimare l'esposizione ai pesticidi in 15 paesi europei tramite analisi di metaboliti urinari specifici nelle acque reflue.

- **Il progetto Acque Reflue**

Il progetto si occupa di stimare il consumo delle principali droghe d'abuso e di nuove sostanze psicoattive nella popolazione italiana mediante analisi di un network di città in tutto il territorio.

- **Il progetto PNRR**

Il progetto si occupa di stimare il consumo di antibiotici in 20 città italiana mediante analisi dei reflui urbani e di studiare contemporaneamente la presenza di geni di resistenza agli antibiotici mediante tecniche di metagenomica. I dati verranno poi correlati insieme alle informazioni cliniche disponibili.

- **Progetto collaborativo europeo Joint Action on Tobacco Control (JATC 2)**

Con la partecipazione alla seconda edizione di questo progetto l'obiettivo è di garantire la qualità dei controlli degli ingredienti e delle emissioni dei prodotti di tabacco e delle sigarette elettroniche.

- Studi sulla **presenza di inquinanti in atmosfera, nel suolo, nelle acque e nei rifiuti**, e modalità di riduzione del loro impatto, attraverso la valutazione integrata degli effetti, e delle soluzioni tecnologiche atte a sostituire o migliorare i processi con impatto maggiore, ad esempio tramite lo sviluppo di nuovi materiali per freni di autoveicoli, all'interno del progetto nPETS.

- Studi riguardanti l'identificazione di **biomarcatori nutrizionali legati al consumo di cibo**, basata sull'applicazione della metabolomica per lo studio dei "metabotipi" e "nutritipi" in relazione allo stato di salute. La ricerca comprende l'identificazione, mediante spettrometria di massa, di nuovi biomarcatori, sensibili e affidabili, basati sulla loro biodisponibilità e correlati all'assunzione di determinati alimenti e abitudini dietetiche, con particolare riferimento alla relazione con l'invecchiamento in salute e i fenotipi che caratterizzano la fragilità nell'anziano. Tale linea di ricerca si sta sviluppando grazie al supporto del Ministero della Salute RF GR-

2021-12374128 con il progetto “Hippuric acid as a marker of frailty: characterization of the causative role of diet and gut microbiota in Italian older adults longitudinal population”.

- **Valutazione tossicologica del particolato ambientale**

La linea di ricerca è focalizzata sulla valutazione del potenziale tossico del particolato ambientale su cellule di origine umana coltivate in 2D e in 3D. Per esaminare la tossicità generata dal particolato ambientale, abbiamo messo a punto test in vitro di mutagenicità, di vitalità cellulare, e di generazione dei radicali liberi dell'ossigeno. Le cellule esposte alle sostanze tossiche sono state anche caratterizzate dal punto di vista dell'espressione genica e dell'infiammazione. Poiché il polmone è il principale organo bersaglio del particolato ambientale abbiamo simulato in vitro l'unità funzionale del polmone. A tale scopo stiamo sviluppando un sistema di co-coltura in vitro per indagare la tossicità del particolato ambientale in condizioni simili a quelle fisiologiche utilizzando una co-coltura di cellule epiteliali ed endoteliali dell'alveolo polmonare e testando un dispositivo per la nebulizzazione delle particelle direttamente sulle cellule.

- **Nanoparticoli, nanomateriali e salute**

Uno dei principali obiettivi dei laboratori di Patologia Umana in Organismi Modello e di Nanobiologia è lo sviluppo di modelli affidabili per la valutazione del rischio associato all'esposizione di nanomateriali di differente natura e origine. I responsabili dei due laboratori hanno una comprovata esperienza nel campo della nanotossicologia, in particolare nella valutazione del rischio delle nanoparticelle di ossido di grafene, quantum dots e delle micro e nanoplastiche.

Questo ha permesso loro di vincere come coordinatori il progetto europeo POTENTIAL atto a definire protocolli altamente standardizzati per stabilire il rischio sostenibile nel campo della produzione di nanomateriali ad uso industriale che rivestono un grande impatto nella filiera produttiva mondiale (ossidi di grafene, quantum dots, nanopolimeri). La piattaforma metodologica che il gruppo di ricerca sta standardizzando si basa sulla determinazione quantitativa dell'interazione dei nanomateriali, in termini di letalità, tossicità, perturbazione dell'omeostasi, con differenti matrici biologiche quali colture cellulari, animali animali invertebrati (*C. elegans* e *Daphnia Magna*), e in un limitato numero di roditori. Questo approccio permette di comprendere sia le piccole alterazioni intracellulari che le importanti modificazioni sistemiche e multi-organo.

## ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELLA SALUTE PUBBLICA

Il Dipartimento di Ambiente e Salute conduce studi riguardanti l'identificazione di biomarcatori nutrizionali legati al consumo di cibo, basata sull'applicazione della metabolomica per lo studio dei "metabotipi" e "nutritipi" in relazione allo stato di salute. La ricerca comprende l'identificazione, mediante spettrometria di massa, di nuovi biomarcatori, sensibili e affidabili, basati sulla loro biodisponibilità e correlati all'assunzione di determinati alimenti e abitudini dietetiche, con particolare riferimento alla relazione con l'invecchiamento in salute e i fenotipi che caratterizzano la fragilità nell'anziano. Tale linea di ricerca si sta sviluppando grazie al supporto del Ministero della Salute RF GR-2021-12374128 con il progetto "Hippuric acid as a marker of frailty: characterization of the causative role of diet and gut microbiota in Italian older adults longitudinal population".

Inoltre il Dipartimento Ambiente e Salute partecipa nell'ambito del Paternariato Esteso ONFOODS (Research and innovation network on food and nutrition Sustainability, Safety and Security – Working ON Foods) negli spoke 6 e 7, in stretta collaborazione con il laboratorio di Farmacoepidemiologia e Nutrizione Umana (Dipartimento di Politiche per la Salute) coordinante le attività dell'Istituto Mario Negri nell'ambito di ONFOODS. Il Laboratorio di Chimica e Tossicologia dell'Ambiente e quello di Metaboliti e Proteine nella ricerca traslazionale sono coinvolti nello studio della malnutrizione (spoke 6) sia attraverso l'utilizzo di modelli in silico per predire molecole bioattive con effetto benefico/nocivo per lo stato di nutrizione, sia per quanto riguarda l'identificazione di traiettorie metaboliche come sentinelle dello stato di nutrizione in popolazioni fragili. Inoltre, il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello è stato coinvolto nella stesura di una revisione sistematica della letteratura sui metodi più utilizzati ridurre lo spreco alimentare nell'industria del pesce.

Il Dipartimento di Epidemiologia Medica nel corso del 2024, ha portato avanti 3 progetti nell'ambito della salute pubblica.

In particolare, il progetto di Ricerca Finalizzata finanziato dal Ministero della Salute dal titolo: **Transition care between adolescent and adult services for young people with chronic health needs in Italy (RF-2019-12371228)**, coordinato dal Laboratorio per la Salute Materno Infantile (ora Laboratorio di Epidemiologia dell'Età Evolutiva) del Dipartimento di Epidemiologia Medica con due partner: ASST Santi Paolo e Carlo – Ospedale San Paolo, Milano e Azienda USL della Romagna. Si è concluso nel corso del 2024. Questo studio aveva lo scopo di supportare il processo di transizione (transition) dall'adolescenza all'età adulta, attraverso processi di cura integrati e coordinati. Il progetto riguarda nello specifico il passaggio all'età adulta dei giovani con tre patologie indice (diabete, epilessia e ADHD) e si articola in tre fasi: 1) survey rivolta ai servizi sanitari sulle modalità di gestione della transition; 2) studio qualitativo di valutazione di percorsi di transizione con il coinvolgimento di pazienti e operatori sanitari; 3) definizione di raccomandazioni sulla gestione della transition attraverso il consenso di un gruppo multidisciplinare. Alla prima fase del progetto hanno partecipato 204 centri (99 servizi pediatrici e 105 dell'adulto) per le 3 patologie target. Dai risultati è emerso un quadro

frammentato circa le modalità di gestione della transition, evidenziando una grande variabilità del tempo effettivo richiesto per il passaggio e degli approcci per gestire colloqui e trasferimento di informazioni. Carenza di risorse, problemi organizzativi e difficoltà di comunicazione sono limiti percepiti da tutti i servizi, mentre sono emersi alcuni bisogni specifici come p.es. la necessità di un maggiore sostegno psicologico per i pazienti, sottolineato dagli operatori nell'ambito di diabete e epilessia, mentre gli operatori che seguono pazienti con **ADHD** hanno riferito maggiormente la necessità di una maggiore formazione. Alla seconda fase hanno partecipato, rispondendo a un'intervista strutturata o a un questionario, 52 pazienti con diabete; 40 con epilessia e 36 con ADHD e gli operatori che li hanno seguiti nella fase pre e post transizione.

Nell'ultima fase del progetto sono state elaborate, attraverso una Conferenza di Consenso con metodo Delphi, che ha coinvolto gruppi multidisciplinari con professionisti sanitari, familiari e pazienti, alcune raccomandazioni riguardanti la gestione del percorso di transizione da parte degli operatori dei servizi pediatrici e dell'adulto allo scopo di ridurre gli ostacoli e facilitare il passaggio e la presa in carico dei pazienti. I documenti prodotti sono disponibili sul sito del progetto <https://transitioncare.marionegri.it/>

Laboratorio Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità ha coordinato:

- **Progetto Registro Italiano Sclerosi Multipla Patologie Correlate.**

Il progetto è attivo dal 2015 e ha come obiettivo la creazione di una struttura organizzata multicentrica per raccogliere i dati di tutti i pazienti con finalità epidemiologiche, di sanità pubblica e di ricerca volta a migliorare le conoscenze sulle cause e sui trattamenti della malattia. Partecipano attivamente al progetto 136 centri e il data base raccoglie dati su più di 80.000 soggetti unici e univoci. La nuova modalità di raccolta dati via web, sviluppata ad hoc dalla Struttura Tecnico Operativa del Mario Negri in accordo al Comitato di Gestione e Scientifico, permette una raccolta dati ampia (più di 1200 variabili), standardizzata e sicura ([www.registroitalianosm.it](http://www.registroitalianosm.it)). I dati del progetto vengono costantemente monitorati per la loro qualità e sono stati inoltre sviluppati una serie di indicatori che periodicamente vengono condivisi con i centri. Molteplici le prospettive del progetto: analisi della casistica (la più ampia raccolta in un registro) e per progetti di ricerca ad hoc nonché partecipazione a pool di dati in collaborazione con EMA e con altri registri europei. Il progetto è sostenuto da un finanziamento della Fondazione Italiana Sclerosi Multipla.

- **Progetto OSIRIS Open Science To Increase Reproducibility in Science HORIZON-WIDERA-2022-ERA-01-41. <https://osiris4r.eu/about/>**

Il progetto ha durata 4 anni (2023-2027), coinvolge 9 partner internazionali ed è coordinato dall'University Medical Centre di Utrecht. Referente per l'IRMFN è Rita Banzi, Centro Politiche Regolatorie in Sanità.

Il progetto ha l'obiettivo di raccogliere in modo sistematico le conoscenze sui fattori alla base della riproducibilità della ricerca in diverse discipline e di testare soluzioni efficaci per incentivare la riproducibilità rivolte a ricercatori, istituti di ricerca, enti finanziatori e riviste scientifiche.

In particolare, l'Unità è coinvolta nel WP2, che si occupa di 1) indagare conoscenze e significati attribuiti alla riproducibilità della ricerca da parte di ricercatori di diverse discipline, 2) raccogliere

esperienze sul campo, 3) esaminare come i ricercatori si occupano di riproducibilità nella pratica, 4) conoscere fattori incentivanti, facilitazioni e barriere alla riproducibilità. Per fare questo, sono state svolte interviste in profondità e focus group con gruppi di portatori di interesse (ricercatori, editori, giornalisti). Sono pianificati FG con organizzazioni di pazienti. L'analisi dei dati è in corso. il WP2 prevede un audit su linee guida, pratiche in merito dalla riproducibilità della ricerca da parte di enti finanziatori e decisori.

- **Progetto Health Technology Assessment (HTA) su Screening portatore sano Fibrosi Cistica**

Questo progetto ha l'obiettivo di valutare l'introduzione di un programma di screening per il portatore di fibrosi cistica (FC) rivolto alla popolazione generale. In particolare, è mirato a valutare se tale screening sia vantaggioso o svantaggioso dal punto di vista del Servizio Sanitario Nazionale e/o regionale e a livello individuale. Il progetto ha un approccio multidisciplinare e multidimensionale e segue una metodologia consolidata a livello europeo (modello EUnetHTA), che raccomanda di valutare diverse dimensioni: rilevanza della FC, in termini di incidenza e prevalenza, e offerta attuale del test del portatore; descrizione delle procedure di test disponibili e loro caratteristiche; efficacia delle diverse possibili offerte di screening; sicurezza delle diverse possibili offerte di screening; costi di percorso, valutazione economica e impatto sul budget; aspetti etici e di accessibilità; aspetti sociali; aspetti legali; impatto organizzativo. Queste dimensioni sono state analizzate utilizzando differenti approcci: revisione sistematica della letteratura; strumenti di economia sanitaria per la valorizzazione economica dei processi e per l'analisi dell'impatto del budget; approccio qualitativo, tramite questionari e interviste semi-strutturate rivolti a: operatori sanitari; persone con FC e familiari; popolazione target di una eventuale offerta di screening.

Il rapporto finale sul progetto è disponibile al link [https://www.fibrosicisticaricerca.it/wp-content/uploads/2023/09/Report-HTA\\_Progetto-1-su-30\\_FFC-Ricerca.pdf](https://www.fibrosicisticaricerca.it/wp-content/uploads/2023/09/Report-HTA_Progetto-1-su-30_FFC-Ricerca.pdf).

Il progetto, coordinato dal Laboratorio insieme al Centro Politiche Regolatorie in Sanità e finanziato da Fondazione per la Ricerca sulla Fibrosi Cistica-Onlus, è svolto in collaborazione con l'Università Carlo Cattaneo – LIUC di Castellanza (VA) e Centro fibrosi cistica IRCCS Istituto Giannina Gaslini.

- **Progetto REPOSI (REgistro delle POLiterapie SImi)**

Il progetto REPOSI è uno studio collaborativo fra la Società Italiana di Medicina Interna (SIMI), la Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano e l'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS che ha come obiettivo lo studio dei pazienti con età di 65 anni o più ricoverati in ospedale. Il Registro è stato avviato nel 2008 allo scopo di creare una rete distribuita su tutto il territorio nazionale fra i reparti di medicina interna e geriatria.

Gli obiettivi specifici dello studio sono:

- descrivere la prevalenza di malattie e trattamenti (spesso polimorbilità e politerapia) in pazienti anziani ospedalizzati;
- correlare le caratteristiche cliniche dei pazienti con il tipo e il numero di malattie e di trattamenti;
- valutare i principali risultati clinici alla dimissione e al follow-up a 3 e 12 mesi.

Lo studio vede attualmente la partecipazione di oltre 60 reparti di medicina interna e geriatria distribuiti su tutto il territorio nazionale.

Una cartella clinica standardizzata viene compilata su web dai medici per tutti i pazienti arruolati con i dati relativi a caratteristiche socio-demografiche, parametri clinici, diagnosi, comorbidità (Cumulative Illness Rating Scale - CIRS), attività di base della vita quotidiana (Indice di Barthel), deterioramento cognitivo (test breve di Blessed), depressione (Geriatric Depression Scale), farmaci prescritti all'ingresso, durante il ricovero e alla dimissione ed eventi clinici durante il ricovero. Il follow-up telefonico viene eseguito 3-12 mesi dopo la dimissione dall'ospedale e riguarda stato in vita, ri-ospedalizzazioni, principali eventi clinici avversi, disabilità e farmaci.

Il Registro ha raccolto ad oggi una coorte di più di 11.000 pazienti anziani ospedalizzati. E' stato quindi possibile in questi anni pubblicare più di 80 articoli originali (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=REPOSI+and+Nobili>) su diverse tematiche riguardanti l'appropriatezza d'uso dei farmaci, la gestione del paziente anziano ospedalizzato, l'impatto dell'esposizione a politerapie sulle principali patologie croniche di cui questi pazienti sono affetti.

- **Progetto CASE DELLA COMUNITÀ: un'indagine con volontari e volontarie di un'associazione in Lombardia**

Il Dipartimento di Politiche per la Salute dell'Istituto Mario Negri sta coordinando un progetto che ha come obiettivo la descrizione dei modelli organizzativi delle Case della Comunità (CdC) in Lombardia. Delle 195 CdC previste entro il 2026 dal Piano Operativo Regionale approvato con delibera XII/2562 del 17.6.2024, ne sono state identificate come già funzionanti sul territorio 132. I dati sono stati raccolti utilizzando la documentazione fornita dalle 23 ASST che hanno partecipato al progetto ed effettuando visite alle singole strutture. L'indagine ha permesso di fotografare la situazione di 105 CdC, di cui 91 classificate come Hub (struttura centrale dotata di servizi più complessi e specializzati) e 14 come Spoke (strutture periferiche o secondarie per servizi sanitari di base e di primo livello). Si è evidenziato un quadro eterogeneo in termini di organizzazione, qualità dei servizi e risorse umane. Alcune strutture mostrano una discreta capacità di rispondere ai bisogni dei cittadini, mentre altre si trovano ancora in una fase iniziale. Le differenze riscontrate tra le CdC possono essere attribuite a diversi fattori, tra cui: le peculiarità territoriali, la realizzazione delle strutture a partire da servizi già esistenti e diversi nei territori per risorse e organizzazione, i tempi stretti per un'adeguata programmazione a livello locale, la coesistenza di visioni diverse sull'applicazione delle linee guida previste a livello nazionale e regionale. Inoltre, il progetto è stato avviato in un momento di difficoltà per il Servizio Sanitario Nazionale, caratterizzato da una rilevante riduzione del personale, soprattutto a livello territoriale. All'interno del progetto in collaborazione con il Laboratorio di ricerca per il coinvolgimento dei cittadini in sanità ha effettuato un'indagine per raccogliere informazioni su opinioni, aspettative e conoscenze sulle Case della Comunità da parte di cittadini e cittadine residenti in Lombardia e che svolgono attività di volontariato, in modo da evidenziare aspetti utili all'implementazione di queste strutture. L'indagine è un primo e valido tentativo di coinvolgere anche cittadini e comunità locali in questo dibattito così da comprendere meglio le opinioni e le aspettative del territorio al fine di favorire la creazione di servizi percepiti come più utili e una comunicazione più efficace con le Istituzioni. All'indagine hanno risposto più di 1.000 volontari, tutti i risultati al link:

<https://lombardiasociale.it/2023/11/27/case-della-comunita-opinioni-di-cittadini-e-cittadine/#post-22098-footnote-ref-1>.

- **MedicInRete: Formazione e Networking per le Cure Primarie**

Progetto collaborativo promosso dal Dipartimento di Politiche per la Salute, con il sostegno della Fondazione Banca Popolare di Milano, in collaborazione con l'Alleanza per la Riforma delle Cure Primarie e la Campagna PHC Now or Never, rivolto a giovani medici partecipanti al Corso di Formazione Specifica in Medicina Generale (CFSMG) o alla Scuola di Specializzazione in Medicina di Comunità delle Cure Primarie (SSMCCP).

Il progetto ha l'obiettivo di formare e creare una rete di giovani medici per migliorare le cure primarie e contribuire a modelli più efficienti e centrati sul paziente e ha come guida e traccia il Libro Azzurro per la riforma delle Cure Primarie in Italia”.

Il progetto ha coinvolto 116 giovani medici in formazione – futuri Medici di Medicina Generale (MMG) e Medici di Comunità e Cure Primarie (MCCP) - provenienti da diverse regioni italiane, creando una rete nazionale che promuove lo scambio di idee e di pratiche per la riorganizzazione delle cure primarie. Attraverso 13 laboratori territoriali e con il supporto di 22 referenti regionali, i partecipanti hanno mappato 40 esperienze virtuose di Primary Health Care distribuite su tutto il territorio nazionale, evidenziandone potenzialità e criticità. Tra queste figurano sperimentazioni in Medicine di Gruppo e Case della Comunità, percorsi sviluppati in collaborazione con il Terzo settore e iniziative di promozione della salute rivolte a popolazioni marginalizzate. Questi esempi dimostrano che il cambiamento non è solo possibile, ma necessario per garantire un sistema sanitario più equo e sostenibile.

È stata inoltre realizzata una survey nazionale “SurForMed”, che ha coinvolto 347 giovani medici in formazione (301 futuri MMG e 46 futuri MCCP), in cui sono emersi: un forte interesse per la medicina del territorio e preoccupazioni per il sovraccarico lavorativo, la mancanza di tutele contrattuali e il rischio di burnout, pur guardando con fiducia al lavoro nelle Case e Ospedali di Comunità. L'indagine ha evidenziato inoltre un consenso diffuso sulla necessità di trasformare il Corso di formazione specifica in medicina generale in una specializzazione universitaria per migliorare la qualità e il valore del percorso formativo.

- **Iatrogenesi e appropriatezza prescrittiva nei soggetti anziani.**

Gli anziani residenti nelle Residenze Sanitarie Assistenziali (RSA) sono comunemente affetti da numerose patologie croniche e di conseguenza sono trattati con un elevato numero di farmaci. I problemi più rilevanti della politerapia degli anziani in RSA sono l'inappropriatezza prescrittiva (il 40% circa delle prescrizioni farmacologiche risulta inappropriato), l'elevato consumo di farmaci psicotropi, e il rischio di interazioni farmacologiche e di reazioni avverse da farmaci. La disponibilità di dati nazionali relativi alle classi farmacologiche maggiormente impiegate nelle RSA consente di evidenziare situazioni di potenziale rischio iatrogeno e di scarsa appropriatezza prescrittiva su cui promuovere specifici interventi di formazione del personale sanitario. Il progetto Korian, un lavoro in collaborazione tra il nostro Istituto e Segesta 2000 Srl, società afferente a Korian Italia, è stato avviato con lo scopo di valutare l'appropriatezza prescrittiva nei pazienti residenti presso le strutture residenziali di Korian Italia. Uno studio condotto per valutare le differenze nell'appropriatezza prescrittiva di farmaci psicotropi (antipsicotici, antidepressivi e ansiolitici/ipnotici) dei residenti in RSA secondo tre diversi criteri di appropriatezza (criteri

di Beers, Screening Tool of Older Persons' Prescriptions (STOPP) and Fit fOR The Aged (FOR TA) ha osservato che 1908 residenti (74,7% del totale) sono stati trattati con psicofarmaci: 186 (7,3% del totale) sono stati esposti ad almeno uno psicotropo potenzialmente inappropriato secondo i criteri FORTA, 1616 residenti (63,2% del totale) hanno ricevuto almeno uno psicotropo potenzialmente inappropriato secondo i criteri di Beers, 1451 residenti (56,8% del totale) sono stati prescritti psicotropi potenzialmente inappropriati secondo i criteri STOPP. Non è stata trovata correlazione tra l'uso potenzialmente inappropriato di psicofarmaci e la mortalità, né nell'analisi univariata né in un modello multivariato aggiustato per età, sesso e indice di comorbilità. I criteri per la prescrizione di farmaci appropriati identificano percentuali diverse di pazienti in RSA esposti a psicotropi potenzialmente inappropriati. I criteri Beers e STOPP/START identificano una percentuale maggiore di pazienti esposti rispetto a FORTA (Azab et al., 2024).

La relazione tra il FORTA score—un sistema per classificare l'appropriatezza dei farmaci negli anziani—e vari esiti negativi, inclusi declino cognitivo, stato funzionale, eventi clinici avversi e mortalità generale a 3, 6 e 12 mesi è stata valutata su una coorte di soggetti anziani dimessi da una rete di reparti italiani di medicina interna o geriatrie. Utilizzando i dati della coorte ELICA DHE, sono stati inclusi pazienti di età pari o superiore a 75 anni. Di 506 pazienti, 171 avevano punteggi FORTA completi. L'analisi non ha rilevato associazioni significative tra punteggi FORTA elevati e deterioramento cognitivo, funzionale o mortalità, né una chiara relazione con eventi avversi o mortalità. Solo l'età è risultata un fattore significativo per mortalità ed eventi clinici avversi. Sono necessari ulteriori studi per definire soglie FORTA score più specifiche e ampliare i criteri per migliorare la valutazione dei farmaci in questa popolazione. (Azab et al., 2024). Infine, uno studio in collaborazione con le RSA del Gruppo Coopselios sul tema della promozione dell'appropriatezza prescrittiva. Più nello specifico la collaborazione con il Gruppo Coopselios è stata volta a migliorare l'uso degli inibitori della pompa protonica (PPI) attraverso specifici interventi formativi/informativi cercando di ridurre l'impiego nei soggetti che non necessitano il trattamento e valutando gli effetti della de-prescrizione sull'uso di farmaci prescritti come effetto di una cascata prescrittiva, come i farmaci antianemici. Lo studio ha rilevato una significativa riduzione nell'uso di PPI a seguito di un semplice intervento educativo per il personale sanitario. Sebbene sia stata osservata una riduzione nella percentuale di residenti che ricevevano PPI anche nel gruppo di controllo, la riduzione è stata più pronunciata nel gruppo di intervento e costantemente maggiore durante il periodo di studio. Inoltre, è stato osservato un aumento significativo nella percentuale di residenti trattati in modo appropriato con PPI nel gruppo di intervento. Il nostro studio ha rivelato un tasso notevole di inappropriatezza dei PPI, che è di minuito nel tempo. Questo abuso è stato principalmente associato al numero di farmaci. Anche l'uso di anticoagulanti è risultato essere un predittore di trattamento inappropriato con PPI (Elli et al, 2024).

- **Farmacovigilanza e analisi delle segnalazioni delle sospette reazioni avverse.**

La Farmacovigilanza ha lo scopo di assicurare che un farmaco venga utilizzato per indicazioni in cui i benefici sono superiori ai rischi. Fra gli strumenti che ha a disposizione, la segnalazione spontanea ha il vantaggio di essere poco costoso e di consentire la sorveglianza di tutti i medicinali, inclusi i vaccini, disponibili in commercio. La segnalazione spontanea consiste nella

compilazione di una scheda ogni qualvolta viene osservato un evento indesiderato e/o nocivo che si sospetta essere correlato alla terapia con un farmaco o alla profilassi con un vaccino. L'obiettivo principale è l'identificazione precoce di nuove reazioni avverse. La segnalazione può essere fatta dai medici, dagli operatori sanitari e anche dai cittadini che sospettano una reazione avversa ad un farmaco, lo scopo non è segnalare quelle reazioni avverse ben note, ma piuttosto un sospetto di correlazione per eventi avversi meno noti. L'inserimento delle segnalazioni nei database di farmacovigilanza internazionali permette di avere una grande numerosità di sospette reazioni avverse e poter valutare un nesso di causalità tra i farmaci e gli eventi avversi. Il nesso di causalità, descritto come ROR (Reporting Odds Ratio), è un parametro che tiene conto del totale delle segnalazioni dell'evento avverso-farmaco considerato e il totale delle segnalazioni relative sia all'evento avverso sia al farmaco in questione. Quando  $ROR > 1$  allora l'evento avverso è probabilmente una reazione avversa al farmaco. Il database di farmacovigilanza FAERS (US Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System) contiene segnalazioni spontanee di reazioni avverse raccolte da FDA, in esse vengono riportati i farmaci coinvolti e potenzialmente correlati. Analizzando i dati è possibile ottenere i valori di ROR (Reporting Odds Ratio) che descrive il nesso di causalità tra il farmaco, o classe di farmaci, in esame e la reazione avversa considerata, nel nostro studio la sindrome serotoninergica. Essa è dovuta ad un'aumentata attività serotoninergica, solitamente farmaco-correlata, a livello del sistema nervoso centrale. È un evento avverso raro, ma noto per alcune classi di farmaci, come i precursori della serotonina (triptofano), i farmaci che aumentano il rilascio di serotonina o ne inibiscono la ricaptazione (SSRI, SNRI, MAO inibitori, linezolid, antidepressivi triciclici ed alcuni oppioidi sintetici), mentre per altre classi di farmaci la correlazione è più dibattuta (antiemetici e antinausea antagonisti di 5-HT<sub>3</sub> e triptani). Dal 2004 al 2022 sono riportate 8997 segnalazioni di sindrome serotoninergica, la classe con il numero di segnalazioni più alto è quella degli antidepressivi SSRI (n. 4548), seguita dagli oppioidi (n. 3159). I MAO inibitori sono la classe con ROR più alto (45.99), seguiti dagli SSRI e SNRI (32.66 e 24.14). Il nesso di causalità (ROR) è risultato maggiore negli over 65 per tutte le classi di farmaci, confermando il rischio maggiore di reazione avversa negli anziani (Elli et al., 2024).

- **Prevalenza e utilizzo dei servizi nei soggetti centenari residenti in regione Lombardia**

All'interno del progetto EPIFARM, finanziato da Regione Lombardia, è stata valutata la prevalenza e l'utilizzo dei servizi nella popolazione di soggetti centenari, in confronto con soggetti di relativamente più "giovani" (80 e 90 anni). Dal 2010 al 2020 queste popolazioni anziane hanno visto un incremento del 28%, del 37% e dell'8% a partire dai soggetti più "giovani", ma l'incremento nei centenari è falsato dalla presenza di una grossa riduzione dovuta alla Prima guerra mondiale e alla successiva pandemia "spagnola": da dati ISTAT risulta chiaro che, dopo il 2020, i centenari aumentano in misura molto maggiore rispetto a popolazioni più "giovani". L'utilizzo dei servizi sociosanitari considerati mostra che il ricorso alla residenza sanitarie assistenziali aumenta in maniera importantissima al crescere dell'età, passando dall'interessare il 2,4% dei soggetti di 80 anni, al 13,6% dei novantenni, al 32,3% degli ultracentenari nell'anno 2011, riducendosi leggermente nel 2020 rispettivamente a 1,7%,

10,9% e 31,4%. In vista del continuo aumento del numero di soggetti molto anziani, questi numeri suggeriscono una particolare attenzione ai posti disponibili nelle case di riposo e alle ragioni che portano i soggetti ad essere istituzionalizzati. Per quanto riguarda l'accesso all'ospedale i valori sono relativamente simili negli 80-90enni, mentre diminuiscono in maniera importante nei centenari. La prevalenza di esami di laboratorio tende a scendere con l'aumentare dell'età, mentre l'utilizzo di altri tipi di prestazioni ambulatoriali (visite specialistiche, diagnostica per immagini, ecc.) cala molto più vistosamente, con dimezzamento dagli ottantenni ai centenari. Costante invece è il numero di soggetti che assumono almeno un farmaco, e relativamente stabile è anche il numero di classi ATC con cui i soggetti sono stati in cura.

- Sin dal 2007 il Dipartimento di Medicina Renale collabora con l'Institute of Health Metrics and Evaluation (IHME) dell'Università di Washington a Seattle nell'ambito del progetto Global Burden of Diseases and Injuries (GBD) nel definire la stima di diversi parametri epidemiologici delle malattie renali e genitourinarie a livello globale. Più recentemente, questa collaborazione si è estesa in generale ad ambiti di salute pubblica relativi a diverse altre malattie non comunicabili e comunicabili e loro fattori di rischio che hanno in qualche modo relazione con le malattie renali nelle diverse fasce d'età. Il focus di questi studi è la stima dell'incidenza e prevalenza delle varie malattie e della mortalità associata a livello globale, regionale, nazionale e in alcuni casi subnazionali in tutto il mondo. Parametri tipici degli studi GBD sono: i) gli anni di vita persi per morte precoce rispetto all'attesa per una data fascia di età (YLL); ii) gli anni vissuti con disabilità legata a ciascuna malattia (YLD); e iii) l'insieme di YLL e YLD definite con DALYS (attesa di vita corretta per disabilità), oltre che iv) l'aspettativa di vita totale e quella di buona salute. Le stime vengono definite attraverso complessi modelli matematici periodicamente aggiornati con nuovi input di dati che permettono di valutare eventuali cambiamenti intercorsi tra il 1990 e il 2021, e offrire ai sistemi di salute nazionale o internazionale strumenti e informazioni per disegnare/aggiornare politiche sanitarie in grado di migliorare e contrastare le disuguaglianze. Nel 2023, il contributo del Dipartimento di Medicina Renale alle attività GBD è riconosciuto nella pubblicazione di 4 lavori sulle riviste internazionali Lancet, Lancet Global Health, Lancet Haematology e Journal of American College of Cardiology. Inoltre, il Dipartimento partecipa da anni alle attività del gruppo GBD Italia che per il 2023 si è tradotto in 1 pubblicazione sull'impatto dell'inquinamento atmosferico sulla mortalità e incidenza di malattie comunicabili e non-comunicabili in Italia nel periodo 1990-2019 (Int. J Public Health).

- **Progetto LIVELY**

La prevalenza dell'**obesità infantile** è aumentata di 10 volte negli ultimi 40 anni, costituendo una delle problematiche più rilevanti per la salute pubblica, poiché rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo, in età adulta, di malattie come quelle cardiovascolari, diabete e disturbi psicologici e sociali.

Lo studio LIVELY si propone di identificare i determinanti dell'obesità infantile e valutare la fattibilità di strategie educative multidimensionali per promuovere e migliorare gli stili di vita, con l'obiettivo finale di prevenire sovrappeso e obesità nei bambini di età compresa tra 5 e 11 anni. La scuola, dove gli studenti trascorrono la maggior parte del loro tempo, rappresenta il contesto

ideale per implementare strategie di prevenzione, promuovendo stili di vita più sani e sostenibili e migliorando le attitudini comportamentali. Lo studio LIVERLY viene svolto nella scuola-Istituto Comprensivo "Luigi Cadorna"- di Milano. Durante l'anno scolastico, ogni classe viene coinvolta in interventi educativi multidimensionali che affrontano i temi della nutrizione sana e sostenibile. Gli interventi educativi comprendono lezioni frontali, giochi e attività di disegno per stimolare e massimizzare l'apprendimento e il coinvolgimento dei bambini. Lo studio si è concluso a ottobre 2024 e ha coinvolto 227 bambini di età compresa tra 6 e 12 anni, frequentanti la scuola elementare Luigi Cadorna di Milano. Gli interventi educativi sono stati suddivisi in sei moduli che trattavano argomenti come macronutrienti, micronutrienti, sistema digerente, piramide alimentare, piatto sano e stile di vita sano. Le lezioni sono state integrate con attività ludiche per consolidare le conoscenze acquisite. Lo studio LIVERLY ha dimostrato che interventi educativi multidimensionali possono promuovere stili di vita più sani tra i bambini delle scuole primarie. Tuttavia, sono necessari ulteriori approfondimenti per valutare la sostenibilità e l'efficacia a lungo termine di tali interventi. Il progetto ha ricevuto un alto livello di gradimento da parte di bambini, genitori e insegnanti, suggerendo che potrebbe essere riproposto e ampliato in futuro. Il protocollo dello Studio LIVERLY è stato oggetto di una pubblicazione sulla rivista JMIR Res Protoc. 2024.

- **Joint Action ImpleMENTAL**

All'interno Joint Action europea ImpleMENTAL, il Laboratorio di Valutazione della Qualità delle Cure e dei Servizi si occupa di supportare con formazioni mirate l'implementazione di attività volte a rafforzare o avviare la costruzione di servizi di salute mentale basati sulla comunità e in alternativa a soluzioni di carattere istituzionale. Sono stati condotte oltre 20 sessioni di formazione in undici paesi della Unione Europea su strategie, modelli organizzativi e interventi psicosociali da implementare per caratterizzare in modo più chiaro i servizi di salute mentale com servizi di comunità. E' stato sviluppato un manuale per l'implementazione di buone pratiche di salute mentale di comunità (Vandoni M, D'Avanzo B, Barbato A. A training kit on community-based mental health services: training and capacity building for transforming mental health systems).

- **Studio di monitoraggio del Piano Urbano**

Si sono conclusi i tre anni di monitoraggio degli esiti del Piano Urbano, che dal 2022 segue una popolazione di 130 persone inviate da tutti i servizi di salute mentale di Milano al progetto che fornisce cure personalizzate volte al miglioramento dell'inclusione sociale e della rete relazionale di persone giovani con malattie mentali gravi. Mentre sulla Scala di Valutazione del Funzionamento Personale e Sociale si sono osservati miglioramenti molto esigui, la valutazione multidimensionale della HoNOS ha riportato miglioramenti nelle attività quotidiane e relazionali e sull'umore depresso.

- **Studio di fattibilità sulla pianificazione condivisa delle cure nelle persone con declino cognitivo lieve e demenza agli stadi iniziali**

È stato concluso lo studio di fattibilità sulla pianificazione condivisa delle cure nelle persone con declino cognitivo lieve e demenza agli stadi iniziali supportato dalla Associazione Alzheimer. Gli studi qualitativi condotti con operatori sanitari e sociali e volontari con diverse competenze e poi con persone anziane, con e senza declino cognitivo o demenza, e con

caregiver ha messo in evidenza l'importanza di potersi esprimere sulle proprie preferenze, con delle riserve rispetto all'applicabilità delle volontà e delle preferenze in un momento successivo. Sono inoltre emerse le difficoltà di operatori e caregiver ad affrontare un tema dal grande impatto emotivo e la tendenza delle persone anziane ad affidarsi alla famiglia. Lo studio di fattibilità condotto su un totale di 78 persone eleggibili secondo criteri definiti, 27 (34.6%) hanno concluso la pianificazione anticipata delle cure a cui erano stati invitati, suggerendo un interesse moderato da parte delle persone invitate, contrastato tuttavia da problemi logistici e di distanza e dalla difficoltà a concentrarsi sui temi proposti. I medici conducono una selezione a priori delle persone da invitare, indipendente da criteri di eleggibilità condivisi.

- **Valutazione del “Bando Salute, effetto comune”**

La Fondazione Compagnia di San Paolo finanzia progetti di prevenzione dei disturbi mentali attraverso il coinvolgimento e la facilitazione del protagonismo degli utenti con 14 progetti radicati nel territorio piemontese. La valutazione di tali effetti viene condotta con una breve batteria di strumenti che consentono di misurare il benessere dei beneficiari (giovani e familiari) dei progetti con un disegno pre-post usando la Warwick-Edinburgh Mental Wellbeing Scale, l'aderenza dell'effettuazione dei progetti ai protocolli, le ricadute organizzative nei consorzi del terzo settore che conducono i progetti e sul territorio in termini di offerta di salute mentale e di inclusione per i giovani. Attraverso incontri con i progetti sono stati predisposti l'apparato valutativo e la piattaforma per la gestione dei dati, sviluppata ad hoc.

- **2016–2021 Mental Health Trends in Adolescents and Young Adults: Gender Differences in Treatment Access and Medication Use**

Lo studio ha analizzato le tendenze nella salute mentale tra adolescenti e giovani adulti (14-25 anni) in Lombardia dal 2016 al 2021, concentrandosi su differenze di genere nell'accesso ai servizi e nell'uso di farmaci psicotropi. Utilizzando dati di Electronic Health Records (EHR) della Regione Lombardia, sono stati calcolati tassi di prevalenza annuali e mensili per ospedalizzazioni, visite al pronto soccorso (ED), contatti ambulatoriali e prescrizioni di farmaci psicotropi. L'analisi ha confrontato il periodo pre-pandemia (2016–2019) con il periodo pandemico (2020–2021), stratificando i dati per genere e gruppi di età.

I risultati hanno mostrato tra il periodo pre-pandemia (2016–2019) e il periodo pandemico (2020–2021) un aumento complessivo del 15,5% nella prevalenza di utilizzo dei servizi di salute mentale. Le donne hanno registrato tassi più alti in tutti gli indicatori rispetto agli uomini, con un incremento significativo nell'uso di farmaci (+42,3%) durante la pandemia. Gli uomini hanno mostrato una riduzione della prevalenza osservata rispetto a quella attesa. La maggior crescita di accesso alle cure si è osservata nel gruppo di età 14-17 anni.

- **2001–2021 Comparative Persistence of Oral Antipsychotics in Patients Initiating Treatment: Superiority of Clozapine in Time-to-Treatment Discontinuation (Pharmacopsychiatry)**

Lo studio ha analizzato la persistenza in trattamento con antipsicotici orali di prima (FGA) e seconda generazione (SGA) tra il 2001 e il 2021, utilizzando dati da quattro province italiane derivati dai EHR della Regione Lombardia. La durata della terapia prima dell'interruzione (Time-to-Treatment Discontinuation, TTD) è stata considerata una misura di efficacia e tollerabilità. Sono stati coinvolti 42.434 pazienti, con risultati che hanno mostrato una maggiore persistenza

per gli SGA rispetto ai FGA (HR: 0,76; IC 95%: 0,73–0,79). Tra gli SGA, la clozapina ha dimostrato la persistenza più elevata, superando olanzapina e risperidone. Ne deriva l'importanza di strategie per ottimizzare la gestione degli effetti collaterali della clozapina e il suo utilizzo in regime di politerapia.

- **ParlaMI-VA:**

Il progetto ha sviluppato e erogato interventi psicoeducativi rivolti agli adolescenti. Gli interventi sono stati testati su due gruppi: uno in un liceo di Varese e uno presso il Centro Giovani Ponti di Milano, in cui vengono seguiti ragazzi con disturbi psichici. L'obiettivo è promuovere il benessere psichico attraverso attività dedicate a educazione fisica, igiene del sonno, alimentazione e benessere digitale. Gli incontri sono stati interattivi e partecipati, coinvolgendo attivamente i ragazzi e le loro famiglie. Alla fine del progetto, è stata condotta una survey sugli stili di vita che ha raccolto quasi 500 risposte da studenti delle scuole superiori di Milano e Varese per un totale di 744 partecipanti tra Varese e Milano. Il punteggio medio di benessere percepito secondo la scala Cantril è di 6/10, con valori superiori nei maschi rispetto alle femmine. Circa 2 partecipanti su 5 camminano meno di un'ora al giorno secondo il DAB-Q, 3 su 4 ritengono migliorabile questa abitudine. Oltre la metà usa la tecnologia per evitare sforzi. Circa 1 partecipante su 2 soffre di insonnia lieve o moderata, il 3% di insonnia grave (Insomnia Severity Index). Internet è usato principalmente per motivi sociali da più di metà dei partecipanti (Internet Motives Questionnaire) e 1 su 2 è disposto a migliorare la propria alimentazione (Healthy Lifestyle Beliefs Scale).

- **Drug repurposing**

Il “drug repurposing” mira a trovare nuovi usi per i farmaci esistenti per trattare condizioni con esigenze mediche insoddisfatte. Questo campo in via di sviluppo ha il potenziale per essere meno costoso e significativamente più rapido rispetto al processo tradizionale di “drug discovery”. Si tratta quindi di una strategia valida e attraente, specialmente per le patologie rare e trascurate, per il cancro o per le minacce emergenti per la salute pubblica come il COVID-19. Tuttavia, numerose barriere - economiche, normative, politiche - e inefficienze - ecosistema frammentato, conoscenze limitate sul percorso completo di riproposizione, carenze di finanziamento - frenano ancora il “repurposing” dei farmaci. Il gruppo di Farmacogenomica partecipa a un grosso progetto sostenuto dall'Unione Europea (REMEDI4ALL) che si propone di sviluppare una piattaforma completa, accessibile e standardizzata che fornisca le competenze, gli strumenti e le risorse necessarie in tutte le fasi del percorso di repurposing. Il nostro gruppo, oltre a partecipare ai gruppi che si occupano di sviluppare i vari progetti di ricerca nell'ambito della piattaforma, sta contribuendo alla creazione di un catalogo di risorse in silico per il repurposing dei farmaci ed utilizza numerosi strumenti computazionali per l'analisi dei dati genomici, biochimici e clinici. Una particolare attenzione è dedicata ad un progetto che propone l'utilizzo di valproato e simvastatina, due farmaci rispettivamente sviluppati come antiepilettico e per l'abbassamento del colesterolo, in combinazione con la chemioterapia standard, nel tumore metastatico del pancreas. In questo ambito, abbiamo studiato le potenziali interazioni tra i bersagli dei due farmaci, che possano spiegare la loro azione sinergica. Stiamo inoltre analizzando una serie di dati di trascrittomico con lo scopo di studiare l'azione sinergica a livello

di regolazione della trascrizione di mRNA e miRNA e di identificare possibili marker di resistenza.

- **Principi FAIR e riproducibilità, condivisione e riutilizzo dei dati**

Il progresso della conoscenza nella medicina traslazionale è sempre più legato all'utilizzo di grandi moli di dati di diversa natura (multiomici, da diagnostica per immagini, clinici, amministrativi, dati del mondo reale - "real world data"). Perché questi dati siano utilizzabili, devono rispondere ad un insieme di criteri che sono stati riassunti nell'acronimo FAIR (Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable). Un altro criterio fondamentale è la riproducibilità, che viene migliorata condividendo i dati e rendendo trasparenti i metodi di ricerca, che garantisce che i risultati degli studi possano essere verificati in modo indipendente. Infine, l'effettivo riutilizzo dei dati può massimizzare l'utilità di queste risorse, evitando inutili duplicazioni di sforzi e costi, consentire l'accesso a una gamma di dati più ampia di quella che potrebbe essere generata dai singoli gruppi di ricercatori, aiutare a convalidare e riprodurre i risultati precedenti, generare nuove ipotesi che non erano state inizialmente esplorate nello studio originale. L'Unità di Farmacogenomica è molto attiva all'interno della comunità dei ricercatori che si occupano di dati (Data Scientists) attraverso la partecipazione a progetti europei (PERMIT – PERSONALIZED medicine Trials, EOSC-Life -European Open Science Cloud for Life Sciences). All'interno di questo filone di ricerca si colloca il lavoro pubblicato quest'anno, che riporta raccomandazioni per una ricerca preclinica robusta e riproducibile e per l'implementazione dei principi FAIR nella gestione dei dati nelle scienze della vita.

Il Centro Politiche Regolatorie in Sanità collabora con l'Organizzazione Mondiale della Sanità per la conduzione di revisioni sistematiche nell'ambito dell'obesità infantile, base per la definizione di linee guida mondiali. I protocolli delle revisioni sono registrati e disponibili sulla piattaforma PROSPERO (CRD42023438469; CRD42023433123), gli elaborati finali sono in fase di valutazione per la pubblicazione su riviste scientifiche internazionali. Il Centro ha inoltre partecipato a un progetto relativo all'individuazione dei bisogni di ricerca di salute pubblica in Europa con lo scopo di individuare le maggiori aree critiche su cui investire (Pistollato F et al What public health challenges and unmet medical needs would benefit from interdisciplinary collaboration in the EU? A survey and multi-stakeholder debate. *Front Public Health*. 2024; 22; **12:1417684**).

- **Principi FAIR e riproducibilità, condivisione e riutilizzo dei dati**

Il Centro Politiche Regolatorie in Sanità è partner del progetto OSIRIS (Open Science to Increase Reproducibility in Science, <https://osiris4r.eu/>) per lo sviluppo e la valutazione di interventi mirati a migliorare la riproducibilità della ricerca. In particolare, sta sviluppando e testando una checklist per la valutazione della riproducibilità nella ricerca (<https://osf.io/8nyke/>).

Collabora inoltre con l'Unità di Farmacogenomica del Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello per il progetto EATRIS CONNECT (<https://eatris.eu/projects/eatris-connect/>) per la trasformazione digitale nella medicina traslazionale.

## **ATTIVITA' DI RICERCA NELL'AMBITO DELL' EPIDEMIOLOGIA MEDICA**

All'interno del Laboratorio di Epidemiologia Clinica è presente il coordinamento del gruppo collaborativo Tiresia (Gruppo italiano per la ricerca clinica in medicina riabilitativa), il quale promuove uno studio sulla valutazione continua dei percorsi riabilitativi nelle cerebrolesioni acute acquisite: Valutazione della qualità dell'assistenza nelle Unità per Gravi Cerebrolesioni Acquisite.

Il progetto vuole provare a valutare in modo scientificamente rigoroso la portata delle diverse strategie e dei diversi percorsi di cura riabilitativa per i pazienti colpiti da gravi cerebrolesioni quali il trauma cranico, l'ictus ischemico e l'emorragia cerebrale, con il fine ultimo di migliorare la qualità dell'assistenza.

All'interno del Laboratorio di Epidemiologia Clinica è presente anche il coordinamento del gruppo collaborativo Fenice (Gruppo italiano per la ricerca clinica in Medicina d'Urgenza) che promuove e realizza progetti di ricerca indipendenti in Pronto Soccorso (PS) e Medicina d'Urgenza. Qui di seguito gli studi promossi:

- **Valutazione della qualità dell'assistenza in Pronto Soccorso**

Fenice ha sviluppato una proposta per monitorare la qualità dell'assistenza in PS. La prima lista di indicatori è stata elaborata grazie al contributo di professionisti nell'ambito della Medicina d'Emergenza e Urgenza da tutta Italia attraverso una discussione dedicata al Meeting annuale del gruppo Fenice nel 2022 e, successivamente, nel corso del 2023, attraverso il confronto con rappresentanti della Federazione Italiana Aziende Sanitarie e Ospedaliere (FIASO). Il risultato di questi confronti è stato portato al tavolo tecnico predisposto dalla collaborazione con Azienda Zero del Piemonte, il quale ha rivisto gli indicatori di qualità che dovranno essere costantemente monitorati. L'obiettivo generale di questa iniziativa è quello di costruire un sistema di monitoraggio per la qualità dell'assistenza nei PS che consenta l'individuazione e la promozione di interventi migliorativi. Uno degli indicatori considerati per il monitoraggio è quello della proporzione di ricoveri da Pronto Soccorso appropriati. L'algoritmo, rifinito nel corso del 2024, è in corso di validazione. Un altro indicatore fondamentale per l'attività di PS riguarda l'affollamento, su cui si sono focalizzate altre analisi nell'ambito di questo progetto. Tali analisi hanno portato allo sviluppo di un nuovo indicatore di affollamento per il PS (Signorini F, Nattino G, Rossi C, Ageno W, Catania F, Cortellaro F, Costantino G, Duca A, Ghilardi GI, Paglia S, Pausilli P, Perani C, Sechi G, Bertolini G. Measuring the crowding of Emergency Departments: an assessment of the NEDOCS in Lombardy, Italy, and the development of a new objective indicator based on the waiting time for the first clinical assessment. BMC Emerg Med 24(1): 196; 2024).

- **La qualità della cura nelle unità di Terapia Semintensiva**

L'obiettivo principale del progetto, promosso dal Gruppo Fenice e coordinato dal Laboratorio di Epidemiologia Clinica, è realizzare un sistema di valutazione continua della qualità dell'assistenza nelle Terapie Semintensive, orientato al miglioramento delle cure. Nel 2022 è stata avviata una raccolta dati in questi reparti che, nel corso del 2024, ha portato alla prima pubblicazione del gruppo (Porta G, Signorini F, Converso M, Cavalot G, Caramello V, Rossi C, Aprà F, Beltrame A, Boccuzzi A, Boverio R, Calci M, Castaldo E, Covella M, Cuppini P, Ghilardi GI, Mirante E, Noto P, Pierpaoli L, Pinna P, Pargaglia P, Ricchiardi A, Zanetti M, Zatelli D, Nattino

G, Bertolini G. The Fenice project to evaluate and improve the quality of healthcare in high-dependency care units: results after the first year. Intern Emerg Med 2024 May 18. doi: 10.1007/s11739-024-03640-5). Si tratta della prima e più vasta descrizione dei pazienti ammessi nei reparti di Terapia Semintensiva italiani nella letteratura scientifica.

- **eCREAM** (enabling Clinical Research in Emergency and Acute care Medicine through automated data extraction)

Nasce dal finanziamento della Commissione Europea con la vincita del Bando HORIZON EUROPE. Il CoViD-19 ha dimostrato l'importanza dei dipartimenti di emergenza-urgenza di alta qualità per assicurare le migliori cure ai pazienti. La prima valutazione clinica che viene fatta in Pronto Soccorso (PS) è essenziale nel decidere circa la necessità di ospedalizzare il paziente e nello stabilire i trattamenti più adeguati. Questo pone due grandi sfide: quella della ricerca clinica innovativa da un lato, quella della ricerca valutativa sulla qualità dell'assistenza (clinica e organizzativa) dall'altro. Ciò, tuttavia, si scontra con la grande difficoltà di condurre progetti di ricerca di qualsiasi tipo in PS, per l'insostenibilità di raccolte dati sistematiche. L'unico modo per colmare il divario fra il bisogno di ricerca e la possibilità di realizzarla è quello di estrarre i dati utili direttamente dagli applicativi di PS. Uno degli obiettivi principali di eCREAM è proprio lo sviluppo di nuove soluzioni per ricavare informazioni cliniche accurate e affidabili da diversi tipi di fonti, strutturate e non. Gli obiettivi principali di eCREAM sono l'estrazione di informazioni cliniche affidabili da dati strutturati e non strutturati e la FAIRificazione dei database clinici. In particolare, nel corso del 2024, il gruppo di lavoro dello studio focalizzato su questo secondo obiettivo ha realizzato una pubblicazione scientifica sui metodi allo stato dell'arte per la condivisione di dati clinici sensibili (Rujano MA et al Sharing sensitive data in life sciences: an overview of centralized and federated approaches. Brief Bioinform 25(4): bbae262; 2024). Questi approcci verranno approfonditi e applicati nell'ambito dello studio eCREAM.

- **Impatto del mancato riconoscimento della sepsi nel paziente adulto in PS**

Il progetto è stato portato avanti nel corso del 2023 dal Laboratorio di Epidemiologia Clinica ed è stato realizzato grazie ad un contributo di Menuccia Grosso Onlus. Come obiettivo ha avuto quello di quantificare l'impatto legato al ritardato riconoscimento della sepsi in PS, in termini di mortalità e costi. Inoltre, si è voluto studiare il fenomeno del ritardato riconoscimento delle sepsi, tramite l'analisi di dati di accesso ai PS di Regione Lombardia dal 2015 al 2022. Le analisi effettuate sono state pubblicate effettuate nel corso del 2024 (Bosetti C, Santucci C, Signorini F, Cortellaro F, Villa G, Rossi C, Nattino G, Bertolini G. Diagnosis of sepsis in the emergency department: a real-world analysis from Lombardy, Italy. Intern Emerg Med 2024 ; 19 : 313-320).

- **SOPAPP (Orientamento del bisogno di cura non urgente: dal sistema dell'emergenza-urgenza verso i servizi della rete territoriale)**

Lo studio ha inizio nel 2023 grazie ad un finanziamento di AREU (Agenzia Regionale di Emergenza-Urgenza). Per far fronte all'epidemia da SARS-CoV-2, AREU ha messo a punto un servizio di triage telefonico chiamato SOPAPP (Sala Operativa di Approfondimento), per garantire la presa in carico territoriale e il follow-up dei pazienti con CoViD-19 sospetto o accertato, senza insufficienza respiratoria, ottenendo risultati estremamente positivi. AREU ha avviato ora un programma per estendere l'attività della SOPAPP ad altre problematiche non urgenti, non più legate solamente a CoViD-19, denominato SOPAPP avanzata.

L'obiettivo di questo progetto di ricerca, portato avanti dal Laboratorio di Epidemiologia Clinica, è quello di valutare l'efficacia e la sicurezza del programma di SOPAPP avanzata. In particolare, l'efficacia del programma è misurata valutando la riduzione nell'utilizzo, per pazienti con problematiche non urgenti, di risorse destinate all'emergenza-urgenza; la sicurezza si riferirà alla capacità del programma di garantire ai pazienti le stesse opportunità di diagnosi e cura che avrebbero avuto con il regime attuale.

- **Progetto Muse**

Le Enterobacteriaceae sono tra le cause più comuni di infezioni associate a pratiche sanitarie (HAI). L'emergere di ceppi (per lo più *Klebsiella pneumoniae* - Kp) resistenti ai carbapenemi è diventato un grave problema in tutto il mondo. Le Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE), infatti, sono difficili da trattare e causano infezioni gravate da elevata morbilità e mortalità, aumentando i costi associati all'assistenza sanitaria. Questo onere è particolarmente elevato nelle Terapie Intensive (TI), dove il tasso di HAI è particolarmente elevato. L'Italia, in particolare, è uno dei paesi in cui le CRE sono diventate endemiche, con tassi di Kp (CRKp) resistenti ai carbapenemi superiori al 30% tra gli isolati di Kp. In questo contesto nasce il progetto MUSE (understanding the Mechanisms Underlying the Selection and spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in intensive care units. A multicenter clinical-epidemiological study coupled with molecular characterization - RF-2016-02364584), che ha l'obiettivo di migliorare la comprensione dei meccanismi e dei percorsi di disseminazione delle Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi (CRE). Lo studio, osservazionale e prospettico, ha coinvolto 30 TI prevedendo la raccolta dei dati clinici e dei tamponi effettuati ai pazienti reclutati nel progetto.

Nel corso del 2024 si sono concluse le analisi fenotipiche e genotipiche dei ceppi isolati e quelle relative allo sviluppo dell'indicatore di trasmissione di CRE. Sono state inoltre effettuate le analisi qualitative volte ad individuare i fattori che hanno influito sulla diffusione dei germi nei reparti di Terapia Intensiva coinvolti. Infine, al fine di divulgare i risultati raggiunti è stato organizzato un meeting durante il quale sono stati condivisi e presentati i dati ottenuti.

- **Studi di ricerca epidemiologica osservazionale**

Nel corso del 2024 il Laboratorio di Epidemiologia Clinica è inoltre stato coinvolto nel disegno, conduzione e analisi statistica di in una serie di studi di ricerca epidemiologica osservazionale di interesse ospedaliero:

- i. presso il Policlinico S.Orsola-Malpighi ha sede il Centro di riferimento regionale per la diagnosi e il trattamento medico-chirurgico delle **Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (MICI)**. Tale Centro, altamente specializzato, assiste più di 10000 pazienti, provenienti da tutta Italia e con quadri di grande complessità. Il Centro svolge inoltre una importante attività di ricerca per la quale richiede la disponibilità di dati clinici dei pazienti in carico sempre aggiornati e accurati. Nel 2024 è terminata la prima fase di un ambizioso progetto (svolto in collaborazione fra Policlinico S.Orsola-Malpighi e laboratorio di epidemiologia clinica dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS), il cui obiettivo è quello di mettere a disposizione del Centro una cartella clinica elettronica che possa coniugare l'ottimale gestione clinica alle esigenze di ricerca. La progettazione di questa cartella clinica è terminata e ora i sistemi informativi del

Policlinico di Bologna stanno lavorando alla sua realizzazione. La collaborazione fra i due enti riprenderà una volta completata la fase di sviluppo informatico.

- ii. Il laboratorio collabora stabilmente con il Dipartimento di Malattie Infettive del Policlinico di Milano, contribuendo alla progettazione e alle analisi statistiche dei dati raccolti in diversi studi osservazionali focalizzati sulle infezioni nosocomiali. Nel 2024 si è conclusa la raccolta dati relativa ad uno studio prospettico multicentrico, il cui obiettivo primario è di esplorare l'associazione tra variazioni nella composizione del microbiota polmonare e l'insorgenza di Polmonite Associata a Ventilazione Meccanica (VAP). Lo studio (definito nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzata - GR-2018-12365988 – Studio PULMIVAP), ha incluso dal 2020 al 2024, tutti i pazienti ventilati meccanicamente (VM), per motivi diversi dall'insufficienza polmonare, con una necessità prevista di VM superiore alle 48 ore e somministrazione antibiotici per non più di 72 ore pre-intubazione. I pazienti sono arruolati sono stati seguiti per un massimo di 15 giorni di VM. Nel corso del 2023 sono stati pubblicati alcuni risultati preliminari (DOI: [10.1016/j.jhin.2023.07.023](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2023.07.023); DOI: [10.1186/s40635-023-00496-5](https://doi.org/10.1186/s40635-023-00496-5)) mentre la casistica complessiva sarà oggetto di pubblicazione del prossimo anno (2025).
- iii. Il laboratorio ha inoltre collaborato nel corso del 2024 con l'ONG EMERGENCY, partecipando all'analisi e pubblicazione dei dati di una coorte retrospettiva comprende tutti gli oltre 7000 pazienti ricoverati per un intervento associato ad una cardiopatia reumatica presso il Centro Salam (Khartoum, Sudan), da aprile 2007 a dicembre 2021 (DOI: [10.1016/j.jacc.2024.09.1232](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2024.09.1232)).

Nell'ambito di ricerca epidemiologica si colloca il Laboratorio di Clinical Data Science, che dal 1991 coordina un gruppo di ricerca noto come **GiViTI – Gruppo Italiano per la Valutazione degli Interventi in Terapia Intensiva**. Da più di 30 anni il GiViTI, che coinvolge circa 200 reparti di Terapia Intensiva, promuove e attua progetti di ricerca indipendenti, orientati alla valutazione e al miglioramento della qualità dell'assistenza nelle TI aderenti rappresentando uno dei più vasti e attivi gruppi di ricerca al mondo in area critica. Nel 2021 il GiViTI si è costituito in Associazione, garantendo al gruppo un'entità giuridicamente riconosciuta.

Nel corso del 2024, il Laboratorio di Clinical Data Science ha ampliato il suo impegno divulgativo, con un focus particolare sulla diffusione dei progetti di ricerca svolti all'interno della rete. Questo sforzo si traduce in nuove collaborazioni e nella creazione di un sito web più accessibile, che mira a coinvolgere non solo istituzioni accademiche e sanitarie, ma anche un pubblico più ampio interessato alle tematiche trattate.

All'interno di un contesto collaborativo, il GiViTI è entrato a far parte della rete LOGIC, una piattaforma internazionale di registri di Terapia Intensiva che mira al confronto e al miglioramento della qualità dell'assistenza.

Una collaborazione significativa è stata avviata anche con il Dipartimento di Scienze della Sanità Pubblica e Pediatriche dell'Università degli Studi di Torino. Questo progetto confronta i

dati di prevalenza ed incidenza delle infezioni correlate all'assistenza raccolti nelle Terapie Intensive del gruppo GiViTI con le stime di incidenza misurate attraverso il terzo Piano per la Salute italiano (PPS).

Nel corso del 2024, è stata inoltre avviata una collaborazione continuativa con l'Ospedale Sacco di Milano nel merito della sorveglianza delle infezioni. In questo contesto sono attivi diversi progetti tra cui bloodicu con l'obiettivo di stimare l'incidenza delle infezioni del sangue (BSI) acquisite in terapia intensiva ed il progetto VAP che mira invece a stimare l'incidenza della polmonite associata a ventilazione (VAP) nei diversi reparti aderenti.

Qui di seguito gli studi promossi.

- **Progetto MargheritaPROSAFE**

Fulcro degli studi clinici promossi dal gruppo è il Progetto MargheritaPROSAFE, una linea di ricerca orientata a valutare e migliorare l'appropriatezza dell'assistenza fornita dalle Terapie Intensive (TI) italiane. Si tratta di un progetto di valutazione continua della qualità dell'assistenza, basato su un software di raccolta dati prodotto e sviluppato all'interno del Laboratorio e distribuito gratuitamente a tutte le TI iscritte. Il software è stato realizzato con una struttura modulare, che permette di integrare facilmente la raccolta dati di base (il "core" della Margherita) con raccolte dati relative a progetti di ricerca specifici (i "petali" della Margherita). Il progetto è nato in Italia, ma da gennaio 2011, è diventato internazionale. Grazie ad un finanziamento della Unione Europea è stato infatti possibile coinvolgere Cipro, Grecia, Israele, Slovenia e Ungheria. Per supportare al meglio gli studi futuri e quelli in corso, nel 2024 è stato sviluppato un ulteriore sviluppo del software che migliorerà l'interazione tra utente ed applicativo. Inoltre, sono state implementate nuove funzionalità che consentono l'inserimento automatico dei dati provenienti dalle Cartelle Cliniche Elettroniche e dai sistemi informativi di gestione dei ricoveri già presenti negli ospedali, in questo modo sarà possibile diminuire il carico di lavoro da parte dei clinici. Nell'anno 2024 le raccolte dati attive hanno riguardato la sorveglianza delle infezioni e colonizzazioni, i traumi, i trapianti di fegato, l'ambito cardiocirurgico, quello pediatrico ed una particolare attenzione è stata posta alla creazione di raccolte dati specifiche relative alle patologie neurochirurgiche. In particolare, in merito a quest'ultima tematica di grande importanza ed interesse si è lavorato in collaborazione con gli Ospedali Civili di Brescia ad un progetto relativo al follow-up del paziente ricoverato in Terapia Intensiva, coinvolgendo un grande numero di reparti lombardi.

- **Progetto CCM**

Negli ultimi anni, il Laboratorio ha inoltre attivato diverse collaborazioni a livello istituzionale. A partire dal 2020, è stato avviato un progetto CCM sulla sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza, con il coinvolgimento dell'Istituto Superiore di Sanità come capofila, nell'ambito del quale forniamo i dati sulla sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza all'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).

- **Progetto europeo United4Surveillance**

Sempre nell'ambito della sorveglianza delle infezioni, il Laboratorio di Clinical Data Science collabora con l'Istituto Superiore di Sanità, il Ministero della Salute e l'Agenzia Regionale di Sanità Toscana (ARS) all'interno del progetto europeo United4Surveillance. L'obiettivo di questa collaborazione è creare un collegamento tra i dati clinici raccolti attraverso i software di raccolta dati presenti nei reparti di Terapia Intensiva e i dati microbiologici disponibili presso l'ARS, al fine di sviluppare un sistema di sorveglianza e segnalazione degli eventi in tempo reale e di attuare interventi preventivi nel controllo della diffusione delle infezioni correlate all'assistenza.

- **Rete TIPNET**

In ambito pediatrico invece, i dati raccolti hanno permesso di proseguire la collaborazione con la rete TIPNET, un registro multicentrico permanente che coinvolge 24 unità di Terapia Intensiva pediatrica presenti sul territorio nazionale.

- **Studio StART**

È poi proseguito lo studio StART (Studio sull'Appropriatezza dei Ricoveri in Terapia intensiva), attivato nelle regioni Toscana e Piemonte. Lo studio ha come obiettivo quello di valutare l'appropriatezza d'uso dei letti di Terapia Intensiva attraverso il confronto tra il livello di assistenza richiesto dai pazienti ricoverati e il livello di assistenza erogabile con la dotazione disponibile. Relativamente al progetto MargheritaPROSAFE, in Piemonte e Toscana è attiva una convenzione tra Regione e Laboratorio Clinical Data Science. L'accordo prevede l'elaborazione di diversi indicatori attraverso i quali le TI possono monitorare diversi aspetti della loro attività clinica. Gli indicatori consentono un'analisi della gestione delle risorse e della programmazione delle attività e possono essere utili alle TI che raccolgono i dati, alle amministrazioni, ai reparti ospedalieri con i quali le TI collaborano e ai laboratori ospedalieri. Nel contesto delle convenzioni regionali, continuano gli sviluppi per l'integrazione delle cartelle cliniche elettroniche con il software Prosafe. Questo lavoro ha portato alla creazione di una collaborazione significativa con la Fondazione Monasterio di Pisa, con la quale si sta lavorando allo sviluppo di un connettore che permetta l'interfacciamento tra diverse cartelle cliniche elettroniche e il database MargheritaProsafe.

- **Cartella clinica intelligente per la Terapia Intensiva**

Prosegue lo studio per la realizzazione di una cartella clinica intelligente per la Terapia Intensiva. L'obiettivo principale di quest'ambito di ricerca è il continuo sviluppo di un software "verticale" di cartella clinica distribuito ai reparti di Terapia Intensiva e che consente la valutazione delle performance dei reparti utilizzando indicatori di processo. Per raggiungere l'obiettivo, il progetto poggia su un gruppo di studio multidisciplinare con competenze mediche, infermieristiche, epidemiologiche, statistiche ed informatiche. Attualmente circa 80 reparti di Terapia Intensiva hanno adottato la cartella clinica elettronica denominata MargheritaTre.

Nel corso del 2024 in collaborazione con la software house mediaclinics italia srl, si è lavorato alla riscrittura della cartella clinica elettronica MargheritaTre come web application e dispositivo medico certificato in classe IIa.

creare un database anonimizzato da rendere accessibile all'intera comunità scientifica, negli scorsi anni si è lavorato alla creazione del dataset che ha dato vita al primo Critical Care Datathon basato su dati multicentrici italiani. Si tratta di un evento innovativo in cui i partecipanti si sfidano analizzando i dati provenienti dalla cartella clinica elettronica MargheritaTre, rispondendo a quesiti clinici di particolare rilevanza nel campo della terapia intensiva. L'evento datathon è stato organizzato in collaborazione con il Politecnico di Milano – Polo territoriale di Lecco. In preparazione a questo evento, è stata condotta una collaborazione con il Laboratorio di Ricerca per il Coinvolgimento dei Cittadini in Sanità dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS. In questo contesto, è stata creata e diffusa una survey volta a raccogliere l'opinione dei cittadini in merito alla condivisione dei dati clinici.

Una delle domande cliniche proposte durante l'evento Datathon riguardava i modelli di previsione e sistemi di supporto alla decisione nel contesto dell'insufficienza renale acuta. In merito a questa tematica, si è creata una collaborazione con il Rotary Club di Lecco. Da questa preziosa cooperazione nasce il progetto AKI che si propone l'obiettivo di migliorare l'assistenza ai pazienti critici e ottimizzare l'uso corretto e coerente delle risorse sviluppando algoritmi di intelligenza artificiale per prevedere l'insorgenza di AKI in terapia intensiva. Questa frequente complicanza è associata a un'elevata mortalità e al rischio di esiti cronici che richiedono trattamenti lunghi e costosi (ad esempio, la dialisi) per i servizi sanitari regionali. In uno studio retrospettivo multicentrico, GiViTI e IRFMN, in collaborazione con il Politecnico di Torino, hanno già contribuito a sviluppare e testare un modello predittivo per l'AKI, grazie ai dati raccolti attraverso MargheritaTre. Sempre utilizzando i dati raccolti tramite la Cartella Clinica stiamo inoltre lavorando ad un progetto che utilizza una nuova strategia di analisi chiamata emulated target trial, mirata a studiare gli effetti di uno o più trattamenti clinici mediante la simulazione dell'evoluzione della storia clinica di un insieme di pazienti reali.

- **Studio AbioKin**

è uno studio osservazionale multicentrico prospettico con l'obiettivo di studiare la farmacocinetica di alcuni antibiotici fra i più utilizzati in Terapia Intensiva. Lo studio è realizzato nei centri che adottano la cartella clinica elettronica MargheritaTre. La prima fase del progetto consiste nella raccolta di campioni di plasma in pazienti critici sottoposti a terapia antibiotica, con almeno una delle molecole considerate. Nella seconda fase, si svilupperanno modelli di farmacocinetica che permettano di descrivere l'evoluzione delle concentrazioni plasmatiche (dosate nei campioni raccolti) in funzione delle condizioni cliniche dei pazienti (ricavate da MargheritaTre). La terza fase prevede, la realizzazione di un simulatore da inserire in MargheritaTre, che permetta il calcolo e la previsione delle concentrazioni plasmatiche di antibiotico in funzione delle condizioni dei pazienti, in modo da supportare i clinici nella scelta di terapie personalizzate che raggiungano i target terapeutici ottimali. Al progetto partecipano 10 centri e sono stati reclutati circa 1200 pazienti. Al momento si stanno dosando le concentrazioni di antibiotici nei campioni di plasma e si stanno analizzando i dati clinici dei pazienti coinvolti. Per accelerare le tempistiche del processo di analisi dei campioni, è stato coinvolto nello studio il laboratorio di Farmacodinamica e Farmacocinetica del Dott. Marco

Gobbi, Dipartimento di Biochimica e farmacologia Molecolare dell'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" IRCCS di Milano. E' inoltre iniziato lo sviluppo del primo modello di farmacocinetica per l'antibiotico Piperacillina/Tazobactam. Lo studio AbioKin ha previsto la costituzione di una biobanca sfruttabile per studi futuri sulle infezioni in Terapia Intensiva. Pertanto, i campioni saranno utilizzati per un nuovo studio osservazionale che ha lo scopo di misurare la risposta al trattamento antibiotico attraverso l'analisi delle variazioni dei livelli plasmatici di alcuni biomarcatori di infezione e sepsi.

Il Laboratorio di Epidemiologia degli Stili di Vita nel corso del 2024 ha portato avanti:

- **Studi sui nuovi prodotti di tabacco e contenenti nicotina**

Gli studi inerenti riguardano le sigarette elettroniche, i prodotti a tabacco riscaldato (come IQOS e Glo), e i sacchetti di sali di nicotina. In particolare, il Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita si occupa di studiare la conoscenza e la diffusione di questi prodotti sia tra i giovani che tra gli adulti italiani ed europei, e di identificarne i pattern di consumo (Scala et al, J Epidemiol 2025, Campagni et al, Ann Ist Super Sanita 2024). È stato infatti analizzato l'uso esclusivo e/o combinato delle sigarette tradizionali e dei nuovi prodotti contenenti nicotina, così da valutarne l'impatto in termini di salute pubblica e controllo del tabagismo. È stato avviato un progetto in collaborazione con la Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori (LILT) per valutare la conoscenza e diffusione dei nuovi prodotti tra gli studenti italiani. È stato inoltre svolto presso l'Istituto lo studio osservazionale AHIQOS (Acute Health Impact of IQOS) in collaborazione con il National Institute for Public Health and the Environment (RIVM, Paesi Bassi), volto ad analizzare gli effetti a breve termine derivanti dall'uso dei prodotti a tabacco riscaldato, contribuendo a chiarire i potenziali rischi per la salute associati a questi prodotti. Con la conclusione della seconda edizione del progetto collaborativo europeo Joint Action on Tobacco Control (JATC 2) il Laboratorio ha potuto contribuire a garantire la qualità dei controlli degli ingredienti e delle emissioni dei prodotti di tabacco e delle sigarette elettroniche.

- **Studi fumo e fumo passivo**

Il Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita ha condotto studi sull'impatto del fumo attivo e passivo sulla salute pubblica e sui costi sanitari associati. In collaborazione con l'ATS di Monza Brianza, è stato completato uno studio che ha quantificato i costi delle ospedalizzazioni attribuibili al fumo in Italia, evidenziando l'importante peso economico delle patologie correlate al consumo di tabacco (Possenti et al, Tob Induc Dis 2024). Tramite la partecipazione attiva al progetto JATC 2, il Laboratorio ha contribuito alla divulgazione di una serie di articoli scientifici e report finalizzati a promuovere l'espansione e il miglioramento delle politiche per garantire ambienti liberi da fumo e da aerosol passivo in Europa (Possenti et al, Tob Prev Cessat 2024, Carnicer-Pont et al, Tob Prev Cessat 2024). Inoltre, il Laboratorio ha analizzato il supporto a una serie di proposte legislative volte a ridurre la prevalenza di fumo e esposizione a fumo passivo in Italia, confermando un'ampia adesione della popolazione a politiche di controllo del tabacco (Scala et al, Lancet Reg Health Eur 2024).

- **Meta-analisi sull'associazione tra fumo e fumo passivo e il rischio di tumore**

Revisioni sistematiche e meta-analisi tramite le quali viene fornita una quantificazione aggiornata e precisa dell'associazione tra fumo di sigaretta ed esposizione al fumo passivo e rischio di tumore. Nello specifico, nel corso dell'anno sono state pubblicate due meta-analisi

sull'associazione tra fumo passivo e tumore della mammella (Possenti I et al, Br J Cancer 2024) e del polmone (Possenti I et al, Eur Respir Rev 2024), e due meta-analisi sull'associazione tra fumo attivo e tumore dello stomaco (Rota et al, Gastric Cancer) e del rinofaringe (Possenti I et al, Rhinology 2024). Sono state inoltre condotte le analisi relative alle associazioni fra fumo attivo e leucemia, tumore dell'esofago e tumore del cavo orale e della faringe.

- **Il progetto Gastroscreening**

Progetto in collaborazione con l'associazione RicerChiAmo Brescia con l'obiettivo di creare uno strumento di screening che permetta, tramite una serie di determinanti, di identificare individui ad alto rischio di tumore gastrico e indirizzarli a una gastroscopia. I principali determinanti del tumore gastrico sono stati selezionati tramite una revisione ad ombrello e integrati in un questionario destinato alla popolazione. I rischi relativi estratti dalla revisione sono stati utilizzati per creare un algoritmo in grado di calcolare il rischio individuale di sviluppare questa neoplasia.

- **Studi sull'Acufene**

Da diversi anni il Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita dell'Istituto Mario Negri di Milano si occupa di epidemiologia dell'acufene, ossia la percezione di un rumore (come un ronzio, un fischio, un fruscio o un sibilo) avvertito nelle orecchie o nella testa in assenza di uno stimolo acustico esterno. In particolare, gli studi condotti dal Laboratorio si sono occupati di quanto questo disturbo sia frequente nella popolazione e quale sia la sua distribuzione a seconda del genere e della classe di età, conducendo sia indagini trasversali sulla popolazione generale italiana ed europea, che revisioni sistematiche e meta-analisi. Tramite la conduzione e analisi di studi caso-controllo e di coorte vengono identificati i potenziali fattori di rischio legati all'insorgenza e alla severità dell'acufene, tra cui, ad esempio, la dieta e altri fattori nutrizionali, l'utilizzo di telefoni e altri apparecchi, e l'esposizione al sole. Il Laboratorio ha inoltre quantificato i costi sanitari e sociali legati alla gestione dell'acufene per coloro che soffrono di questo disturbo (Jarach CM et al, J Epidemiol 2024) e sta conducendo una revisione sistematica per identificare i trattamenti e le terapie efficaci per la cura dell'acufene. Il Laboratorio ha inoltre partecipato come partner a due progetti europei, il progetto UNITI e il progetto TIGER, all'interno dei quali sono state consolidate le collaborazioni con ricercatori internazionali che si occupano dello studio dell'acufene.

- **Ricerca clinica, processi decisionali e formazione in chirurgia**

Il Centro Politiche Regolatorie in Sanità ha collaborato con il Laboratorio di Metodologia della Ricerca clinica alla conduzione di due studi clinici randomizzati sull'uso della chemioterapia intraperitoneale in ambito oncologico (Pubblicazioni dei protocolli: Di Giorgio A, Gerardi C, Abatini C, Melotti G, Bonavina L, Torri V, Santullo F, Garattini S, De Luca M, Rulli E, Rulli E, Pacelli F; GOETH Investigators. Prophylactic surgery plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy (HIPEC CO2) versus standard surgery for gastric carcinoma at high risk of peritoneal carcinomatosis: short and long-term outcomes (GOETH STUDY)-a collaborative randomized controlled trial by ACOI, FONDAZIONE AIOM, SIC, SICE, and SICO. *Trials*. 2022;1;23(1):969 e Pacelli F, Gerardi C, Rulli E, Abatini C, Rotolo S, Garattini S, Melotti G, Torri V, Galli F, Rulli E, Di Giorgio A, CHECK Investigators. Prophylactic surgery plus hyperthermic

intraperitoneal chemotherapy (HIPEC CO2) versus standard surgery in colorectal carcinoma at high risk of peritoneal carcinomatosis: short-term and long-term outcomes from the CHECK study - protocol for a randomised, multicentre, phase 3 trial. *BMJ Open*. 2022;1;12(8):e051324).

Ha inoltre collaborato alla preparazione di revisioni sistematiche e rapporti di valutazione sanitaria su dispositivi medici per la chirurgia della tiroide (Montori G, Botteri E, Ortenzi M, Gerardi C, Allocati E, Giordano A, Vettoretto N, Arezzo A, Huo B, Bergamini C, Podda M, Agresta F. Systematic review and meta-analysis of the use of high-energy devices for thyroid surgery. *Langenbecks Arch Surg*. 2024;17;409(1):217) e su traccianti per biopsie nel tumore al seno (Pinelli M, Gerardi C, Lettieri E, Maioru M, Marone L, Bertoldi L, Navaneri G, Costantini M, Botti C, Pellini F. Comparison of Indocyanine Green with conventional tracers for sentinel lymph node biopsy in breast cancer: A multidisciplinary evaluation of clinical effectiveness, safety, organizational and economic impact. *PLoS One*. 2024;29;19(8):e0309336).

Nel 2024 si è inoltre conclusa la prima edizione del corso di metodologia della ricerca applicata all'ambito chirurgico che ha visto la partecipazione di 19 chirurghi italiani. (<https://www.marionegri.it/opportunita-formative/metodologia-della-ricerca-clinica-applicata-allambito-chirurgico>).

## ATTIVITA' IN AMBITO COVID

### Presso il Dipartimento di Neuroscienze.

Il nostro Istituto collabora al registro europeo delle manifestazioni neurologiche in corso di e post-COVID-19 (ENERGY) e conduce studi di revisione sistematica sul post-COVID in collaborazioni con la European Academy of Neurology e con la world federation of Neurology. In questo ambito sono stati pubblicati uno studio sui predittori di manifestazioni neurologiche post-COVID e una revisione sistematica sulla frequenza di condizioni neurologiche nel post-COVID (Giussani et al 2024, PMID: 38272015) Inoltre, nel 2024 abbiamo completato uno studio caso-controllo in soggetti italiani che mirava a verificare se vi fosse un incremento di nuove diagnosi per malattie neurologiche post vaccinazione contro SARS-COV-2. Il manoscritto è stato sottomesso e accettato dalla rivista.

### Presso il Dipartimento di Politiche per la salute.

Nell'ambito degli studi sui determinanti clinici, sulla prognosi e sugli effetti a lungo termine della malattia da **COVID-19**, il laboratorio di Prevenzione Cardiovascolare è impegnato nelle seguenti ricerche:

- analisi sul ruolo dei farmaci anti-iperglicemici (con azione antinfiammatoria, oltre a quella ipoglicemizzante) sulla prognosi dei pazienti COVID-19 in Lombardia. In merito a questo argomento sono stati pubblicati degli articoli e recentemente un articolo sull'associazione tra DPP-4i, GLP-1 RA, SGLT-2i e le complicanze da COVID-19, sulla rivista scientifica Clinical Therapeutics. Queste analisi rientrano nell'ambito della convenzione stipulata tra Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri IRCCS e la Regione Lombardia, relativa alle analisi da condurre utilizzando il DB-COVID della regione.
- Analisi dell'impatto della malattia da COVID-19 sul rischio di eventi cardiovascolari a medio-lungo termine (Long Covid), in una popolazione non selezionata (ospedalizzati e non) tenendo conto delle diverse ondate della pandemia da COVID-19. Le analisi sono state condotte sia utilizzando i dati del DB della regione Lombardia sia i dati delle cartelle cliniche dei Medici di Medicina Generale. Lo studio rientra nell'ambito di un progetto all'interno della Rete Cardiologica in collaborazione con gli IRCCS (Manifestazioni cardiovascolari in Long Covid), che si è concluso a dicembre 2022. L'articolo è stato pubblicato sulla rivista scientifica Frontiers in Cardiovascular Medicine.
- Studio sulla persistenza dei sintomi correlati all'infezione da COVID-19 dopo la fase acuta della malattia (Long Covid) nei pazienti di Medicina Generale. Lo studio si basa su un'indagine, ovvero un questionario, compilato direttamente dai pazienti che sono stati affetti da Covid-19. L'indagine si è conclusa a dicembre 2022. Sono state completate le analisi e i risultati pubblicati sulla rivista scientifica Journal of Primary Care and Community Health.
- L'acido ursodesossicolico (UDCA), utilizzato per trattare le malattie del fegato, si è dimostrato, negli esperimenti *in vitro*, efficace nel bloccare l'ingresso del virus di SARS-COV-2 nelle cellule. Tuttavia, i dati *in vivo* sono scarsi. E' stata analizzata l'associazione tra l'uso di UDCA e la prevenzione dell'infezione da SARS-COV-2 e del suo impatto sulla

gravità della malattia nei soggetti infettati. Le analisi sono state condotte utilizzando i dati del DB della regione Lombardia partendo dai soggetti con una storia pregressa di malattie epatiche e che di conseguenza possono essere stati esposti all'UDCA. L'analisi ha incluso pazienti delle prime e seconde ondate della pandemia, infettati e non. Sono state completate le analisi e i risultati pubblicati sulla rivista scientifica Journal Internal of Medicine.

- All'interno della convenzione con la Regione Lombardia è inoltre prevista l'analisi del DB COVID-19 finalizzata allo studio degli effetti a lungo termine da COVID-19, con particolare focus sull'associazione tra l'infezione virale e le complicanze cardiovascolari, in termini di ospedalizzazioni, accessi al pronto soccorso e ricorso alle prestazioni e visite ambulatoriali.
- Il Dipartimento di Epidemiologia Medica nell'ambito del progetto **EPIFARM** (Epidemiologia del Farmaco) finanziato in parte dalla Regione Lombardia si occupa della valutazione del profilo prescrittivo dei farmaci in età pediatrica. In ambito le attività di ricerca condotte nel corso del 2023 hanno riguardato in particolare il monitoraggio della qualità della prescrizione degli antibiotici da parte dei pediatri di libera scelta, l'accesso alle cure per disturbi psichiatrici da parte degli adolescenti prima e dopo la pandemia COVID-19 e l'analisi del profilo dei farmaci prescritti a bambini con disturbi dello spettro autistico.
- Un ulteriore studio è stato condotto confrontando i dati provenienti dai database amministrativi di Regione Lombardia e Israele, mostrando che interventi tempestivi di sanità pubblica e di vaccinazione hanno un effetto importante sull'incidenza di malattia e mortalità

### **Presso il Dipartimento Ambiente e Salute, Laboratorio di Indicatori Epidemiologici Ambientali:**

È stata avviata una **sorveglianza della presenza di Sars-CoV-2 nei reflui urbani**. Il Laboratorio ha inizialmente messo a punto un metodo per rilevare SARS-CoV-2 nei reflui urbani e creato una rete di sorveglianza nella popolazione lombarda ed ha in seguito aderito alla rete di monitoraggio SARI coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità che effettua un monitoraggio a livello nazionale in accordo con le direttive della comunità europea. Questo approccio, che è un'applicazione dell'epidemiologia delle acque reflue", si basa sulla misurazione dei virus nei reflui urbani e permette di rilevare la reale diffusione di un virus nella popolazione poiché include l'escrezione sia di soggetti sintomatici che asintomatici. È in grado, inoltre di fungere da sistema di allerta precoce poiché i risultati, disponibili in tempi rapidissimi, possono identificare l'insorgenza di nuovi picchi epidemici anticipando di un paio di settimane gli indicatori clinici. In collaborazione con il laboratorio di Epidemiologia Clinica, questo studio applicato alla città di Milano ha permesso di identificare l'effetto benefico del vaccino anti-Covid sull'incidenza di infezioni gravi e ricoveri ospedalieri.

### **Presso l'Unità Operativa Complessa Malattie Renali:**

COVID-19 è caratterizzato dalla comparsa di numerosi sintomi con un ampio spettro di gravità, i quali richiedono diverse modalità di cura in base ai differenti gradi in cui si manifesta la

malattia. L'intervento terapeutico all'inizio di sintomi lievi/moderati di COVID-19 a domicilio potrebbe rappresentare un'opportunità per **prevenire la progressione verso forme più severe della malattia e di complicanze a lungo termine**. Poiché i sintomi iniziali di COVID-19 in generale riflettono un'eccessiva risposta infiammatoria all'infezione virale. In un articolo di revisione della letteratura abbiamo evidenziato come l'uso di farmaci anti-infiammatori, in particolare farmaci anti-infiammatori non-steroidi (NSAIDS), in pazienti a domicilio con sintomatologia terapeutica. Per questi pazienti, alcuni studi osservazionali hanno valutato l'uso di farmaci NSAID, in pazienti a domicilio con sintomatologia iniziale lieve/moderata possa rappresentare una valida strategia terapeutica. Per questi pazienti, alcuni studi osservazionali hanno valutato l'uso di farmaci NSAID in particolare inibitori relativamente selettivi dell'enzima ciclossigenasi 2-cox2), spesso parte di un protocollo multifarmacologico applicato secondo un algoritmo sequenziale. Gli studi hanno dimostrato l'efficacia di queste strategie, in quanto il controllo dei sintomi iniziali ha protetto i soggetti dalla progressione della malattia verso forme più severe che da ultimo richiedono il ricovero in ospedale riducendo così in modo importante la pressione sul sistema ospedaliero nel corso della pandemia (Perico N et al., *Lancet Infect Dis.*, 2023).

#### **Presso il Dipartimento di Bioingegneria:**

Il Laboratorio di Medical Imaging si è occupato dello studio degli effetti di COVID-19 a livello cerebrale e polmonare a breve e lungo termine, mediante l'utilizzo di tecniche di imaging.

- **Imaging toracico nella patologia COVID-19**

In ambito toracico, il Laboratorio di Medical Imaging, in collaborazione con la Pneumologia e la Radiologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII, sta effettuando studi volti a caratterizzare il danno polmonare strutturale e funzionale causato dal COVID-19, sia in fase acuta che a lungo termine. Sono state in particolare studiate le anomalie a livello di scambio gassoso nei pazienti COVID-19, mediante l'utilizzo di test che permettono di esaminare lo scambio dei gas tra gli alveoli e i capillari polmonari (DLNO and DLCO), in 33 pazienti sopravvissuti a COVID-19 severo con sintomi respiratori persistenti ad un anno dall'infezione. I risultati dello studio hanno mostrato che le anomalie a livello di scambio gassoso sono determinate prevalentemente dalla compromissione della componente vascolare piuttosto che dalla ridotta funzionalità della membrana alveolare (Imeri et al., *Multidiscip. Respir. Med.*, 2024). È stata inoltre messa a punto una tecnica sofisticata che consente di valutare in modo oggettivo il danno polmonare strutturale su immagini TAC a livello di tipo ed entità delle alterazioni parenchimali, così come di alterazioni del sistema vascolare e delle vie aeree. Questa tecnica consentirà di studiare in dettaglio il danno strutturale polmonare e la relativa evoluzione nel tempo nei pazienti sopravvissuti alla patologia COVID-19, e di studiare la relazione tra il danno strutturale e funzionale polmonare.

- **Imaging cerebrale nella patologia COVID-19**

In ambito cerebrale, il Laboratorio di Medical Imaging, in collaborazione con la Neuroradiologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII, è coinvolto nell'elaborazione di diversi tipi di immagini a risonanza magnetica, con l'obiettivo di valutare i danni cerebrali conseguenti all'infezione e studiarne l'evoluzione nel tempo.

Un primo studio, effettuato mediante l'uso di una tecnica di Risonanza Magnetica sensibile alla diffusione nei tessuti biologici, chiamata Diffusion Weighted Imaging (DWI), in 215 pazienti COVID-19 con manifestazioni neurologiche e 36 controlli normali, ha mostrato un incremento significativo del "coefficiente di diffusione apparente" (ADC), un indicatore di infiammazione, nella materia bianca e in diverse regioni della materia grigia del cervello dei pazienti COVID. Un secondo studio ha utilizzato un'altra tecnica di Risonanza Magnetica sensibile alla diffusione nei tessuti, chiamata Diffusion Tensor Imaging (DTI), che offre un livello di dettaglio maggiore, in quanto è sensibile anche alla direzione del movimento. La materia bianca del cervello è costituita da lunghe fibre nervose che connettono le diverse aree cerebrali e ne permettono la comunicazione. Elaborando le immagini DTI con tecniche informatiche avanzate è possibile tracciare tali fibre e studiare quindi le connessioni tra le aree del cervello. Lo studio ha rivelato che nei pazienti COVID-19 con sintomi neurologici alcune aree del cervello presentano una ridotta connettività strutturale, che si traduce in una diminuzione della comunicazione tra determinate aree cerebrali, probabilmente causata da meccanismi neuro-infiammatori e danno tissutale. In altre regioni, al contrario, si è osservato un aumento della connettività, spiegato dalla plasticità cerebrale, che è la straordinaria capacità del cervello di adattarsi, in questo caso per compensare le modifiche cerebrali causate dalla patologia (Arrigoni et al., Neuroimage Clin., 2024)

In un altro studio ci si è focalizzati sulle alterazioni del sistema olfattivo in pazienti con COVID-19 e sintomi neurologici. È noto, infatti, che le più comuni complicanze neurologiche in COVID-19 riguardano la perdita o riduzione del senso dell'olfatto, che si verificano soprattutto nelle fasi iniziali della malattia. Lo studio ha mostrato che i pazienti COVID-19 (n=196) presentavano una significativa atrofia dei bulbi olfattivi rispetto a quelli di un gruppo di controllo (n=39). Sullo stesso gruppo di pazienti è stata inoltre studiata, tramite tecniche di Risonanza Magnetica, l'integrità della materia grigia, un altro importante indicatore dello stato di salute cerebrale poiché la materia grigia è coinvolta nelle funzioni principali del cervello, quali il pensiero, la memoria e il controllo motorio e sensoriale. Lo studio ha evidenziato che i pazienti Covid-19 con complicanze neurologiche presentavano una diminuzione significativa nel volume della materia grigia e nello spessore della corteccia rispetto ai soggetti che alla data dell'esame non avevano mai contratto il Covid-19. I pazienti con disturbi cognitivi legati al Covid-19 hanno mostrato una perdita di materia grigia più marcata ed estesa, rispetto a coloro che hanno manifestato solamente perdita di gusto e/o olfatto. Le regioni cerebrali maggiormente colpite da atrofia sono tutte coinvolte nei processi di memoria e attenzione (Capelli et al., Ann. Clin. Transl. Neurol., 2024).

- **Studio dell'associazione tra danno polmonare e danno cerebrale nella patologia COVID-19**

In collaborazione con la Neuroradiologia, la Radiologia, la Pneumologia e l'Infettivologia dell'ASST Papa Giovanni XXIII, il Laboratorio di Medical Imaging sta infine portando avanti uno studio multidisciplinare che si propone di studiare possibili associazioni tra le complicazioni polmonari e cerebrali del COVID-19 in pazienti sopravvissuti al COVID che hanno sviluppato sintomi neurologici. Lo studio è attualmente in corso.

### **Presso il Dipartimento di Medicina Molecolare:**

Il Laboratorio di Biologia Cellulare e Medicina Rigenerativa si è occupato di chiarire i meccanismi con cui l'infezione da SARS-CoV-2 induce danno endoteliale e trombosi nei pazienti con COVID-19 severo. Recentemente abbiamo valutato il potenziale terapeutico del medium condizionato (CM) derivato da cellule stromali mesenchimali del cordone ombelicale umano (UC-MSCs). Grazie alle proprietà anti-infiammatorie, immunomodulatorie e rigenerative delle UC-MSCs, il CM ha attenuato il danno polmonare, riducendo edema e fibrosi. Questo effetto è stato associato a un miglioramento della funzionalità vascolare, con il ripristino dei livelli di trombomodulina e una riduzione dell'espressione del fattore pro-trombotico von Willebrand (vWF). Questi risultati evidenziano il potenziale terapeutico del CM da UC-MSCs come strategia per mitigare le complicanze polmonari severe associate all'infezione da SARS-CoV-2 (Perico et al., Trends Microbiol., 2024).

- Attraverso un progetto finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito BANDO RICERCA FINALIZZATA (Giovani Ricercatori) questo modello *in vivo* sarà utilizzato per testare diversi possibili interventi terapeutici, quali ad esempio il trattamento con medium condizionato di cellule mesenchimali staminali, per ridurre l'infiammazione indotta dalla proteina S1 di SARS-CoV-2 ed indentificare composti efficaci e sicuri per i pazienti con forme severe di COVID-19.

- Infine, i laboratori di Biologia Cellulare e Medicina Rigenerativa e di Immunologia del Trapianto sono coinvolti nel progetto INF-ACT, un progetto finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca nell'ambito del bando PNRR Partenariati Estesi (tematica Malattie Infettive Emergenti). Lo studio vuole chiarire le basi immunologiche che predispongono allo sviluppo di forme severe di COVID-19. In questo contesto, si svilupperanno nuove terapie di precisione che, mediante l'uso di nanoparticelle, permetteranno di modulare in modo estremamente selettivo un particolare tipo di cellule dell'immunità innata al fine di favorire la risposta antivirale.

- La condivisione di dati ed esperienze tra medici e ricercatori è fondamentale per aumentare adeguatamente la conoscenza degli effetti a lungo termine del COVID. In questa direzione, Fondazione CARIPLO finanzia il progetto di rete "Lombardia Long COVID Network" (LLC) mirante a raccogliere i dati disponibili relativi al COVID disponibili in diversi archivi provenienti da ospedali, reti di medici di medicina generale e database amministrativi e sviluppare una piattaforma web (proof-of-concept) dove tutti questi dati possano essere uniti e interrogati per rispondere alle domande elaborate da un panel di medici esperti nella gestione del COVID a lungo termine. La piattaforma di prova consentirà un reciproco scambio di dati, con consulenza in tempo reale sugli adeguamenti suggeriti delle migliori pratiche basati sulle prove disponibili. Inoltre, la piattaforma proof-of-concept fornirà materiale didattico per gli operatori sanitari e il pubblico in generale e modelli per procedure operative standard che potrebbero essere ampiamente implementate tra gli operatori sanitari.

Per il progetto LLC sono state condotte diverse analisi utilizzando i database amministrativi. Obiettivo di un'analisi è stato quello di valutare i predittori associati al rischio di essere riospedalizzati per COVID successivamente ad un primo ricovero sempre per causa COVID.

I risultati di questa analisi (manuscript) sono stati sottomessi alla rivista *Infectious Diseases and Therapy* (accepted).

- Durante la pandemia da COVID-19, tre laboratori del Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare (il Laboratorio di Farmacodinamica e Farmacocinetica, il Laboratorio di Nanobiologia e il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello) hanno unito le loro competenze in ambito farmacologico, biochimico, biofisico e computazionale per sviluppare una piattaforma per la ricerca di nuovi farmaci in grado di combattere l'infezione da SARS-CoV-2. La piattaforma consiste di cinque fasi sperimentali interconnesse per identificare nuove molecole in grado di impedire l'accesso del virus nelle cellule. Queste fasi sono state ottimizzate e validate attraverso lo screening di una grande varietà di peptidi e molecole che abbiamo identificato come potenzialmente utili per contrastare l'infezione. Nonostante la fase di emergenza del COVID-19 sia conclusa, il gruppo di ricerca vuole fare tesoro dell'esperienza negativa pregressa che ha trovato il mondo scientifico impreparato ad affrontare infezioni inaspettate. Nuovi studi sono in corso per trasformare questa piattaforma in uno strumento permanente in grado di studiare rapidamente nuove varianti di SARS-CoV-2 o di altri patogeni.

- L'associazione tra COVID-19 e malattie neurologiche è stata oggetto di studio sotto forma di revisioni sistematiche della letteratura (Biagianti et al. 2022), sondaggi sulla tipologia dei disturbi, valutazione critica degli studi pubblicati, e creazione di modelli adeguati ad una raccolta dati armonica e funzionale ad un confronto tra popolazioni demograficamente diverse. Questa attività ha preso le mosse all'inizio della pandemia e ha condotto alla creazione di un registro europeo (ENERGY - Ean NEuro-covid ReGistry) per la raccolta di dati sulle manifestazioni neurologiche di COVID-19 e del loro impatto sulla gravità e sul decorso della malattia. Su richiesta dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, il nostro Istituto partecipa ad un Global Forum che ha condotto allo sviluppo di una serie di moduli di raccolta dati nelle diverse fasi della malattia (acuta, post-acuta e di follow-up). Dagli studi fin qui effettuati sono emersi, pur nella diversità delle stime prodotte, alcuni risultati di rilievo. La presenza di disturbi neurologici associati ai sintomi dell'infezione comporta una maggior gravità di malattia, come risulta dalla maggior durata dell'ospedalizzazione, dal più elevato rischio di ricovero in terapia intensiva, dalla presenza di sequele e dalla più elevata mortalità intraospedaliera.

### **Presso il Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare:**

Durante la pandemia da COVID-19, tre laboratori del Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare (il Laboratorio di Farmacodinamica e Farmacocinetica, il Laboratorio di Nanobiologia e il Laboratorio di Patologia Umana in Organismi Modello) hanno unito le loro competenze in ambito farmacologico, biochimico, biofisico e computazionale per sviluppare una piattaforma per la ricerca di nuovi farmaci in grado di combattere l'infezione da SARS-CoV-2. La piattaforma consiste di cinque fasi sperimentali interconnesse per identificare nuove molecole in grado di impedire l'accesso del virus nelle cellule. Queste fasi sono state ottimizzate e validate attraverso lo screening di una grande varietà di peptidi e molecole che abbiamo identificato come potenzialmente utili per contrastare l'infezione. Nonostante la fase di emergenza del COVID-19 sia conclusa, il gruppo di ricerca vuole fare tesoro dell'esperienza negativa pregressa che ha trovato il mondo scientifico impreparato ad affrontare infezioni

inaspettate. Nuovi studi sono in corso per trasformare questa piattaforma in uno strumento permanente in grado di studiare rapidamente nuove varianti di SARS-CoV-2 o di altri patogeni.

I Laboratori di Farmacodinamica e Farmacocinetica, di Nanobiologia e di Patologia Umana in Organismi Modello sono stati coinvolti in diversi progetti:

- **progetto INF-ACT (Spoke 1)**

un progetto finanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca nell'ambito del bando PNRR Partenariati Estesi (tematica Malattie Infettive Emergenti). Lo studio vuole chiarire le basi immunologiche che predispongono allo sviluppo di forme severe di COVID-19. In questo contesto, si identificheranno nuovi bersagli molecolari e valuterà l'effetto di molecole innovative o già esistenti ma utilizzate in clinica per altri scopi. Nell'ambito di questo progetto sono stati pubblicati x nuovi lavori scientifici.

- **progetto PACECOR** (Pre-targeting ACE2-binding of CORonavirus), sviluppato in collaborazione con l'Istituto Romagnolo per lo Studio dei Tumori "Dino Amadori", l'Università di Ferrara, il CNR, l'Università di Parma e quella di Padova, che mira all'implementazione di una strategia anti-virale contro i coronavirus il cui ingresso nelle cellule sia mediato dal recettore ACE2, come il SARS-CoV-1/2.

### **Presso Dipartimento di Epidemiologia Medica:**

Sono stati promossi diversi studi riguardanti la pandemia COVID:

- **Progetto Epifarm**

Nell'ambito del progetto, finanziato da Regione Lombardia, sono state condotte analisi sul ricorso al servizio sanitario (specialista in neuropsichiatria infantile, pronto soccorso, ricovero ospedaliero, prescrizione di psicofarmaci) per disturbi psichiatrici da parte di adolescenti di età 12-17 anni prima e durante la pandemia COVID-19.

Queste analisi hanno confermato, anche nella popolazione residente in Lombardia, un aumento nel 2021 e 2022 dell'utilizzo delle risorse sanitarie nelle ragazze adolescenti, ma non nei coetanei di sesso maschile. L'aumento ha riguardato in particolare la prescrizione di psicofarmaci e l'accesso al Pronto Soccorso per disturbi del comportamento alimentare, autolesionismo e disturbi dell'umore.

- **Studio Tsunami**

In Lombardia durante la pandemia è emersa immediatamente la difficoltà di quei Pronto Soccorso (PS) che si sono trovati al centro o in prossimità dei focolai nel gestire i flussi ingenti di pazienti. In aggiunta all'incremento del volume di arrivi (input), l'epidemia ha impattato drammaticamente sulla capacità di dimissione o ricovero del PS (output), a causa della saturazione dei reparti di degenza e di terapia intensiva in tutta la Regione. Inoltre, i PS si sono trovati nella necessità di modificare o adattare innumerevoli elementi di gestione dei pazienti (throughput), ad esempio per garantire l'isolamento dei pazienti infetti. In sintesi, l'epidemia ha influenzato tutti gli elementi del modello concettuale che è classicamente usato per descrivere l'affollamento dei PS. Risulta di grande importanza analizzare in profondità quanto è accaduto nella fase florida dell'epidemia, in modo da poterne ricavare conoscenze utili alla gestione delle successive riprese. Lo studio **Tsunami (Descrizione e previsione**

**dell'impatto dell'epidemia COVID-19 sui Pronto Soccorso in Regione Lombardia)** ha avuto come obiettivo: descrivere quantitativamente l'impatto che l'epidemia di COVID-19 ha avuto sull'organizzazione e il funzionamento del sistema dell'emergenza-urgenza lombardo, in termini di input (chiamate al 118, accessi in PS e casistica osservata), throughput (tempi di attesa e di presa in carico dei pazienti in PS) e output (numero di ricoveri e dimissioni da PS); Costruire modelli statistici in grado di prevedere il numero di pazienti afferenti ai PS durante l'epidemia e la loro destinazione una volta completata la presa in carico (dimissione, ricovero ordinario, ricovero in semintensiva, ricovero in terapia intensiva, decesso); Valutare quantitativamente l'impatto che tutto ciò ha avuto sia sui pazienti COVID, sia sui pazienti non-COVID, in termini di possibilità di accesso alle cure ospedaliere, nonché di esito su indicatori di salute.

La raccolta dati è terminata nel 2021 e il database risultante ha portato a diverse pubblicazioni negli anni successivi. In particolare, nel 2024, sono stati finalizzati due lavori. Innanzitutto, è stata descritta l'esperienza di sviluppo di un modello statistico capace di prevedere le richieste di soccorso sanitario dal territorio (Andreella A, Mira A, Balafas S, Wit E C, Ruggeri F, Nattino G, Ghilardi G, Bertolini G. A predictive model for planning emergency events rescue during COVID-19 in Lombardy, Italy. [Stat Methods Appt 2024 ; 33 : 635-659](#)). Tale modello è stato fornito ad AREU, l'agenzia lombarda responsabile della gestione di tali richieste e della risposta con i mezzi di soccorso, per facilitare la pianificazione delle risorse. In secondo luogo, è stata studiata l'eterogeneità dell'eccesso di mortalità all'interno della regione Lombardia durante le prime due ondate del 2020 (Paganuzzi M, Nattino G, Ghilardi GI, Costantino G, Rossi C, Cortellaro F, Cosentini R, Paglia S, Migliori M, Mira A, Bertolini G, Fenice network. Assessing the heterogeneity of the impact of COVID-19 incidence on all-cause excess mortality among healthcare districts in Lombardy, Italy, to evaluate the local response to the pandemic: an ecological study. *BMJ Open* 2024 ; 14 : e077476). I risultati di questo studio hanno dimostrato come, al netto della diffusione del virus, l'eccesso di mortalità sia stato omogeneo tra i diversi distretti lombardi. Questo ha suggerito che, nonostante le condizioni senza precedenti, le reazioni pandemiche non hanno comportato disparità sanitarie nella regione.

- **Studio Lost**

Durante il 2020, il Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita, in collaborazione con svariati centri di ricerca e università italiane, ha attivato due progetti volti a valutare l'effetto della pandemia da COVID-19 sugli stili di vita e sulla salute mentale della popolazione italiana (progetto **Lost in Italy**) e anziana ( $\geq 65$  anni) lombarda (progetto **Lost in Lombardia**). Per quanto riguarda lo studio sulla popolazione generale italiana, è stato valutato come la pandemia abbia modificato alcune abitudini e dipendenze, quali il fumo di tabacco, l'utilizzo di sigarette elettroniche e dispositivi a tabacco riscaldato, il gioco d'azzardo, il consumo di alcolici, e l'attività sessuale, e sulla salute mentale. Inoltre, grazie al progetto **Lost in Toscana**, è stato possibile proseguire il follow-up per alcuni dei soggetti intervistati, e valutare l'impatto a medio termine della pandemia su diversi fattori. Nel corso del 2024 i gruppi di ricerca si sono occupati di studiare l'impatto della pandemia sul consumo di bevande alcoliche (Cerrai S et al, *J Epidemiol* 2024), sull'utilizzo di prodotti contenenti nicotina (Zeduri M et al, *Ann Ist Super Sanita* 2024), sul poliuso di sostanze quali tabacco, tabacco riscaldato, sigarette elettroniche, alcolici, cannabis e

psicofarmaci (Campagni C et al, Ann Ist Super Sanita 2024), e sul peso e sull'attività fisica (Stival C et al, Ann Ist Super Sanita 2024).

- **Studio COSMO-IT**

Lo studio ha analizzato l'associazione tra fumo di sigaretta, utilizzo di sigarette elettroniche e prodotti a tabacco riscaldato e esposizione al fumo passivo, e severità di COVID-19 tra più di 1800 pazienti ospedalizzati nel 2020-2021 per COVID-19 (Gallus S et al, J Epidemiol 2023). I risultati sull'associazione tra fumo di sigaretta sono stati interpretati anche nel contesto di una revisione sistematica e meta-analisi sull'argomento condotta dal Laboratorio di Ricerca sugli Stili di Vita (Gallus S et al, Eur Respir Rev 2023).

## SELEZIONE PUBBLICAZIONI SCIENTIFICHE 2024

Vacchini A, Chancellor A, Yang Q, Colombo R, Spagnuolo J, Berlofffa G, Joss D, Øyås O, Lecchi C, De Simone G, Beshirova A, Nosi V, Loureiro JP, Morabito A, De Gregorio C, Pfeffer M, Schaefer V, Prota G, Zippelius A, Stelling J, Häussinger D, Brunelli L, Villalta P, Lepore M, Davoli E, Balbo S, Mori L, De Libero G.

### **Nucleobase adducts bind MR1 and stimulate MR1-restricted T cells**

Sci Immunol. 2024 May 10;9(95):

IF:19.1

Soldani C, De Simone G, Polidoro MA, Morabito A, Franceschini B, Colombo FS, Anselmo A, Milana F, Lleo A, Torzilli G, Pastorelli R, Donadon M, Brunelli L.

### **Riboflavin-LSD1 axis participates in the in vivo tumor-associated macrophage morphology in human colorectal liver metastases**

Cancer Immunol Immunother. 2024 Mar 2;73(4):63

IF:5.4

Chancellor A, Constantin D, Giuliano Berlofffa, Yang Q, Nosi V, Loureiro JP, Colombo R, Jakob RP, Joss D, Pfeffer M, De Simone G, Morabito A, Schaefer V, Vacchini A, Brunelli L, Montagna D, Heim M, Zippelius A, Davoli E, Häussinger D, Maier T, Mori L, De Libero G.

### **The carbonyl nucleobase adduct M3Ade is a potent antigen for adaptive polyclonal MR1-restricted T cells.**

Immunity. 2024 Dec 11:S1074-7613(24)

IF: 25

Lanno A, Stefano S, Ghironi S, Torrelli M, Passoni A, Bagnati R, Roncaglioni A, Davoli E, Fattore E

### **Health risk assessment for dietary exposure to 3-monochloropropane-1,2--diol, 2-monochloropropane-1,2-diol, and glycidol for Italian consumers**

Chemosphere 2024; 365: 143339

IF: 8.1

Viganò E L, Ballabio D, Roncaglioni

**Artificial intelligence and machine learning methods to evaluate cardiotoxicity following the adverse outcome pathway frameworks**

Toxics 2024; 12: 87

IF: 3.9

Tariq F, Ahrens L, Alygizakis N, Audouze K, Benfenati E, Carvalho P N, Chelcea I, Karakitsios S, Karakoltzidis A, Kumar Vikas, Mora Lagares L, Sarigiannis D, Selvestrel G, Taboureau O, Vorkamp K, Andersson P L

**Computational tools to facilitate early warning of new emerging risk chemicals**

Toxics 2024; 12:736

IF: 3.9

Iovine N, Toropova A P, Toropov A A, Roncaglioni A, Benfenati E

**Models for the No-Observed-Effect Concentration (NOEC) and maximal half-effective concentration (EC50)**

Toxics 2024; 12:425

IF: 3.9

Ollitrault G, Marzo M, Roncaglioni A, Benfenati E, Mombelli E, Taboureau O

**Prediction of endocrine-disrupting chemicals related to estrogen, androgen, and Thyroid Hormone (EAT) modalities using transcriptomics data and machine learning**

Toxics 2024; 12:541

IF: 3.9

Vidaurre R, Bramke I, Puhlmann N, Owen S F, Angst D, Moermond C T A, Venhuis B, Lombardo A, Kummerer K, Sikanen T, Ryan J, Haner A, Janer G, Roggo S, Perkins A N

**Design of greener drugs: aligning parameters in pharmaceutical R&D and drivers for environmental impact**

Drug Discov Today 2024; 29:104022

IF: 6.5

Gadaleta D, Serrano-Candelas E, Ortega-Vallbona R, Colombo E, Garcia de Lomana M, Biava G, Aparicio-Sánchez P, Roncaglioni A, Gozalbes R, Benfenati E.

**Comprehensive benchmarking of computational tools for predicting toxicokinetic and physicochemical properties of chemicals**

Journal of Cheminformatics, (2024) 16, 145

IF 7.1

Gadaleta D, Garcia de Lomana M, Serrano Candelas E, Ortega Vallbona R, Gozalbes R, Roncaglioni A, Benfenati

**Quantitative structure-activity relationships of chemical bioactivity toward proteins associated with molecular initiating events of organ-specific toxicity**

J Cheminform 2024; 16:122

IF: 7.1

Colombo Erika, Viganò E L, Raitano G, Lombardo A, Manganaro A, Sommovigo A, Benfenati E

**The VERA software: implementation of the acute fish toxicity endpoint and its application to pharmaceutical compounds**

Chemosphere 2024; 358:142232

IF: 8.1

Turina A, Passoni A, Gallus S, Lugo A, Klerx W, Talhout R, Fayokun R, Vardavas C, Davoli E

**On the extension of the use of a standard operating procedure for nicotine, glycerol and propylene glycol analysis in e-liquids using mass spectrometry**

Tob Induc Dis 2024; 22:157

IF: 2.2

L Siciliano A M, Moro F, De Simone G, Pischutta F, Morabito A, Pastorelli R, Brunelli L, Zanier E R, Davoli E

**Mapping small metabolite changes after traumatic brain injury using AP-MALDI MSI**

Anal Bioanal Chem 2024; 416:4941-4949

IF: 3.8

Castiglioni L, Gelosa P, Muluhie M, Mercuriali B, Rzemieniec J, Gotti M, Fiordaliso F, Busca G, Sironi L

**Fenofibrate reduces cardiac remodeling by mitochondrial dynamics preservation in a renovascular model of cardiac hypertrophy**

Eur J Pharmacol 2024; 978:176767

IF 4.2

Hristozov D, Badetti E, Bigini P, Brunelli A, Dekkers S, Diomede L, Doak S H, Fransman W, Gajewicz-Skretna A, Giubilato E, Gomez-Cuadrado L, Grafström R, Gutleb A C, Halappanavar S, Hischier R, Hunt N, Katsumiti A, Kermanizadeh A, Marcomini A, Moschini E, Oomen A, Pizzol L, Rumbo C, Schmid O, Shandilya N, Stone V, Stoycheva S, Stoeger T, Suarez Merino B, et al

**Next generation risk assessment approaches for advanced nanomaterials: current status and future perspectives**

NanoImpact 2024; 35:100523

IF 4.7

Conz A, Davoli E, Franchi C, Diomede L

**Seafood loss prevention and waste reduction**

Food Qual Saf 2024; 8:fyae017

IF 3

Dudda L, Kozula M, Ross-Hellauer T, Kormann E, Spijker R, DeVito N, Gopalakrishna G, Van den Eynden V, Onghena P, Naudet F, Banzi R, Fratelli M, Varga M, Gelsleichter Y A, Stegeman I, Leeflang M M

**Scoping review and evidence mapping of interventions aimed at improving reproducible and replicable science: Protocol**

Open Res Eur 2024; 3:179

Beeg M, Baroni S, Piotti A, Porta Alessia, De Luigi A, Cagnotto A, Gobbi M, Diomede L, Salmona M

**A comprehensive technology platform for the rapid discovery of peptide inhibitors against SARS-CoV-2 pseudovirus infection**

Int J Mol Sci 2023; 24:12146

IF 4.9

Fongaro B, Campara B, Moscatiello G Y, De Luigi A, Panzeri D, Sironi L, Bigini P, Carretta G, Miolo G, Pasut G, Polverino De Laureto P

**Assessing the physicochemical stability and intracellular trafficking of mRNA-based COVID-19 vaccines**

Int J Pharm 2023; 64 :123319

IF 3.061

Bernardotto S, Frasson I, Favarelli S, Morelli A, Schiavon E, Moscatiello G Y, Violatto M B, Pinnola A, Canciani A, Mattarei A, Rossi G, Brini M, Pasetto L, Bonetto V, Bigini P, Forneris F, Richter S, Morpurgo M

**Efficient SARS-CoV-2 infection antagonization by rhACE2 ectodomain multimerized onto the Avidin Nucleic-Acid NanoAssembly**

Biomaterials 2023; 303:122394

IF 12.8

Baroni S, Carletti T, Donalisio M, Arduino I, Cazzaniga I, Giorgino T, Esposito F, Porta A, Diomede L, De Luigi A, Gobbi M, Lembo D, Marcello A, Tramontano E, Milani M, Mastrangelo E

**The antipsychotic drug lurasidone inhibits coronaviruses by affecting multiple targets**

Front Cell Infect Microbiol 2024 ; 14 : 1487604

IF 4.6

Perico L, Remuzzi G, Benigni A

**Sirtuins in kidney health and disease**

Nat Rev Nephrol 2024; 20:313-329

IF 28,6

Perico L, Benigni A, Remuzzi G

**SARS-CoV-2 and the spike protein in endotheliopathy**

Trends Microbiol 2024; 32:53-67

IF 14

Perico L, Casiraghi F, Sonogo F, Todeschini M, Corna D, Cerullo D, Pezzotta A, Isnard-Petit P, Faravelli S, Forneris F, Thiam K, Benigni A, Remuzzi G

**Bi-specific autoantigen-T cell engagers as targeted immunotherapy for autoreactive B cell depletion in autoimmune diseases**

Front Immunol 2024; 15:1335998

IF 5,7

Aiello S, Gastoldi S, Bresin E, Galbusera M, Mele C, Daina E, Santarsiero D, Comai G, La Manna G, Martinatto C, Benigni A, Remuzzi G, Noris M

**Exuberant endothelial C5b-9 formation in recurrent and de novo post transplant thrombotic microangiopathy**

Kidney Int Rep 2024; 9:3318-3323

IF 5,7

Tschongov T, Konwar S, Busch A, Sievert C, Hartmann A, Noris M, Gastoldi S, Aiello S, Schaaf A, Panse J, Zipfel P F, Dabrowska-Schlepp P, Haffner K

**Moss-produced human complement factor H with modified glycans has an extended half-life and improved biological activity**

Front Immunol 2024; 15:1383123

IF 5.7

Monaco S, Bussola N, Buttò S, Sona D, Giobergia F, Jurman G, Xinaris C, Apiletti D

**AI models for automated segmentation of engineered polycystic kidney tubules**

Sci Rep 2024; 14:2847

IF 3,8

Aiello S, Benigni A, Remuzzi G

**Tissue-resident macrophages in solid organ transplantation: harmful or protective?**

J Immunol 2024; 212:1051-1061

IF 3,6

Zanchi C, Locatelli M, Cerullo D, Aumiller V, Corna D, Rottoli D, Schubert S, Noris M, Tomasoni S, Remuzzi G, Zoja C, Benigni A

**Efficacy of GalNAc C3 siRNAs in factor H-deficient mice with C3 glomerulopathy**

Mol Immunol 2024; 168:10-16

IF 3,2

Buelli S, Imberti B, Morigi M

**The Complement C3a and C5a Signaling in Renal Diseases: A Bridge between Acute and Chronic Inflammation**

Nephron 2024; 148: 712-723

IF 2,3

Imberti B, Benigni A

**Renal Endowment in Men and Women: Start from the Beginning**

Nephron. 2024;148(10):712-723

IF 2,3

Ebert N, Schaeffner E, Seegmiller J C, Van Londen M, Bokenkamp A, Cavalier E, Delanaye P, Derain-Dubourg L, Eriksen B O, Indridason O S, Palsson R, Shafi T, Christensson A, Bevc S, Carrara F, Courbebaisse M, Dalton R N, van der Giet M, Melsom T, Methven S, Nordin G, Pottel H, Rule A D, Trillini M, White C A, European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Task Group on Chronic Kidney Disease (EFLM TG-CKD)

**Iohexol plasma clearance measurement protocol standardization for adults: a consensus paper of the European Kidney Function Consortium**

Kidney Int 2024 ; 106 : 583-596

IF: 14.8

Nester C M, Feldman D L, Burwick R, Cataland S, Chaturvedi S, Cook H T , Cuker A, Dixon B P, Fakhouri F, Hingorani S R, Java A, Van de Kar N C A J, Kavanagh D, Leung N, Licht C, Noris M, O'Shaughnessy M M, Parikh S V, Peyandi F, Remuzzi G, Smith R J H, Sperati C J, Waldman M, Walker P, Vivarelli M

**An expert discussion on the atypical hemolytic uremic syndrome nomenclature-identifying a road map to precision: a report of a National Kidney Foundation Working Group**

Kidney Int 2024; 106:326-336

IF: 14.8

Kavanagh D, Ardissino G, Brocklebank V, Bouwmeester R N , Bagga A, ter Heine R, Johnson S, Licht C, Ma A L T, Noris M, Praga M, Rondeau E, Sinha A, Smith R J H, Sheerin N S, Trimarchi H, Wetzels J F M, Vivarelli M, Van de Kar N C A J, Greenbaum L A, Forum Participants

**Outcomes from the International Society of Nephrology Haemolytic Uraemic Syndromes International Forum**

Kidney Int 2024; 106:1038-1050

IF: 14.8

Baldassarre D, Iacoviello L, Baetta R, Roncaglioni MC, Condorelli G, Remuzzi G, Gensini G, Frati L, Ricciardi W, Conaldi PG, Uccelli A, Blandini F, Bosari S, Scambia G, Fini M, Di Malta A, Amato M, Veglia F, Bonomi A, Klersy C, Colazzo F, Pengo M, Gorini F, Auteri L, Ferrante G, Baviera M, Ambrosio G, Catapano A, Gialluisi A, Malavazos AE, Castelvechio S, Corsi-Romanelli MM, Cardani R, La Rovere MT, Agnese V, Pane B, Prati D, Spinardi L, Liuzzo G, Arbustini E, Volterrani M, Visconti M, Werba JP, Genovese S, Bilo G, Invitti C, Di Blasio A, Lombardi C, Faini A, Rosa D, Ojeda-Fernández L, Foresta A, De Curtis A, Di Castelnuovo A, Scavini S, Pierobon A, Gorini A, Valenti L, Luzi L, Racca A, Bandi M, Tremoli E, Menicanti L, Parati G, Pompilio G; CV-PREVITAL Study Group

**Rationale and design of the CV-PREVITAL study: an Italian multiple cohort randomised controlled trial investigating innovative digital strategies in primary cardiovascular prevention.**

BMJ Open. 2023; 13(7):e072040

IF 2.9

Noris M, Remuzzi G

**Looking into the cholesterol crystal ball: is complement the answer?**

Kidney Int 2024; 106:787-789

IF: 14.8

Vivarelli M, Barratt J, Beck L H Jr, Fakhouri F, Gale D P, Goicoechea de Jorge E, Mosca Marta, Noris M, Pickering M C, Susztak K, Thurman J M, Cheung M, King J M, Jadoul M, Winkelmayr W C, Smith R J H, Remuzzi G, et al

**The role of complement in kidney disease: conclusions from a kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) controversies conference**

Kidney Int 2024; 106:369-391

IF: 14.8

Podestà M A, Trillini M, Portalupi V, Gennarini A, Tomatis F, Villa A, Perna A, Rubis N, Remuzzi G, Ruggenenti P

**Ofatumumab in rituximab-resistant and rituximab-intolerant patients with primary membranous nephropathy**

Am J Kidney Dis 2024; 83:340-349.e1

IF: 9.4

Ruggenenti P, Reinhard L, Ruggiero B, Perna A, Perico L, Peracchi T, Fidone D, Gennarini A, Benigni A, Cortinovis M, Hoxha E, Remuzzi G

**Anti-phospholipase A2 receptor 1 and anti-cysteine rich antibodies, domain recognition and rituximab efficacy in membranous nephropathy: A prospective cohort study**

Am J Kidney Dis 2024; 83:588-600.e1

IF: 9.4

Barbieri M, Chiodini P, Di Gennaro P, Hafez G, Liabeuf S, Malyszko J, Mani L Y, Mattace-Raso F, Pepin M, Perico N, Simeoni M, Zoccali C, Tortorella G, Capuano A, Remuzzi G, Capasso G, Paolisso G, CONNECT Action (Cognitive Decline in Nephro-Neurology European Cooperative Target)

**Efficacy of erythropoietin as a neuroprotective agent in CKD-associated cognitive dysfunction: a literature systematic review**

Pharmacol Res 2024; 203:107146

IF: 9.1

Nester C, Decker D A, Meier M, Aslam S, Bomback A S, Caravaca-Fontan F, Cook T H, Feldman D L, Fremeaux-Bacchi V, Gale D P, Gooch A, Johnson S, Licht C, Mathur M, Pickering M C, Praga M, Remuzzi G, Selvarajah V, Smith R J, Tabriziani H, Van de Kar N, Wang Y, Wong E, Mistry K, Lim M, Portillo C, Balogun S, Trachtman H, Thompson A

**Developing therapies for C3G: report of the kidney health initiative C3G trial endpoints work group**

Clin J Am Soc Nephrol 2024; 19:1201-1208

IF: 8.5

Mori F, Pascali G, Berra S, Lazzarotti A, Panetta D, Rocchiccioli S, Ceccherini E, Norelli F, Morlando A, Donadelli R, Clivio A, Farina C, Noris M, Salvadori P A, Remuzzi G

**Proof of concept of a new plasma complement Factor H from waste plasma fraction**

Front Immunol 2024; 15:1334151

IF: 5.7

Capelli S, Arrigoni A, Napolitano A, Pezzetti G, Remuzzi A, Zangari R, Lorini F L, Sessa M, Caroli A, Gerevini S

MRI evidence of gray matter loss in COVID-19 patients with cognitive and olfactory disorders

Ann Clin Transl Neurol 2024; 11:2457-2472

IF: 4.4

Capelli S, Arrigoni A, Napolitano A, Pezzetti G, Remuzzi A, Zangari R, Lorini F L, Sessa M, Caroli A, Gerevini S

**MRI evidence of gray matter loss in COVID-19 patients with cognitive and olfactory disorders**

Ann Clin Transl Neurol 2024; 11:2457-2472

IF: 4.4

Arrigoni A, Previtali M, Bosticardo S, Pezzetti G, Poloni S, Capelli S, Napolitano A, Remuzzi A, Zangari R, Lorini F L, Sessa M, Daducci A, Caroli A, Gerevini S

**Brain microstructure and connectivity in COVID-19 patients with olfactory or cognitive impairment**

Neuroimage Clin 2024; 43:103631

IF: 3.4

Soliveri L, Poloni S, Caroli A, Brambilla P, Remuzzi A, Bozzetto M, Valen-sendstad K

**High Frequency Vessel Wall Vibrations Associate with Stenosis Formation and Arteriovenous Fistula Failure: A Case Report**

Kidney Medicine

IF: 3.2

Soliveri L, Bruneau D, Ring J, Bozzetto M, Remuzzi A, Valen-Sendstad K

**Toward a physiological model of vascular wall vibrations in the arteriovenous fistula**

Biomechan Model Mechanobiol 2024; 23:1741-1755

IF: 3

Poloni S, Soliveri L, Caroli A, Remuzzi A, Bozzetto M

**The potential of sound analysis to reveal hemodynamic conditions of arteriovenous fistulae for hemodialysis**

Ann Biomed Eng 2024; E-pub

IF: 3

Klinkhammer B M, Ay I, Caravan P, Caroli A, Boor P

**Advances in molecular imaging of kidney diseases**

Nephron 2024; E-pub

IF: 2.3

Imeri G, Conti C, Caroli A, Arrigoni A, Bonaffini P, Sironi S, Novelli L, Raimondi F, Chiodini G, Vargiu S, Di Marco F

**Gas exchange abnormalities in long covid are driven by the alteration of the vascular component**

Multidiscip Respir Med 2024; 19:938

IF: 2

Carrara E, Soliveri L, Poloni S, Bozzetto M, Campiglio C E

**Effects of high-frequency mechanical stimuli on flow related vascular cell biology**

Int J Artif Organs 2024; 47:590-601

IF: 1.4

Schena M, Testa F, Bozzetto M, Remuzzi A, Lanterna L A, Lanzarone E

**A CFD-based framework to evaluate surgical alternatives in cerebral aneurysms**

Comput Methods Biomech Biomed Eng Imaging Vis 2024; E-pub

IF: 1.3

Newcombe V, Zanier ER

**Highlights in traumatic brain injury research in 2024**

Lancet Neurol 2025; 24(1):10-11

IF 46,6

Ravizza T, Scheper M, Di Sapia R, Gorter J, Aronica E, Vezzani A

**mTOR and neuroinflammation in epilepsy: implications for disease progression and treatment**

Nat Rev Neurosci 2024; 25(5):334-350

IF 28,2

Lisi I, Moro F, Mazzone E, Marklund N, Pischiutta F, Kobeissy F, Mao X, Corrigan F, Helmy A, Nasrallah F, Di Pietro V, Ngwenya LB, Portela LV, Semple BD, Schneider ALC, Diaz Arrastia R, Menon DK, Smith DH, Wellington C, Loane DJ, Wang K, Zanier ER; InTBIR Fundamental and Translational Working Group

**Exploiting blood-based biomarkers to align preclinical models with human traumatic brain injury**

Brain 2024; 9:awae350

IF 10,6

Lazzaroni F, Meessen JMTA, Sun Y, Lanfranconi S, Scola E, D'Alessandris QG, Tassi L, Carriero MR, Castori M, Marino S, Blanda A, Nicolis EB, Novelli D, Calabrese R, Agnelli NM, Bottazzi B, Leone R, Mazzola S, Besana S, Catozzi C, Nezi L, Lampugnani MG, Malinverno M, Grdseloff N, Rödel CJ, Rezai Jahromi B, Bolli N, Passamonti F, Magnusson PU, Abdelilah-Seyfried S, Dejana E, Latini R

**Circulating biomarkers in familial cerebral cavernous malformation**

EBioMedicine 2024; 99:104914

IF 9,7

Dalmau Gasull A, Glavan M, Samawar SKR, Kapupara K, Kelk J, Rubio M, Fumagalli S, Sorokin L, Vivien D, Prinz M

**The niche matters: origin, function and fate of CNS-associated macrophages during health and disease**

Acta Neuropathol 2024; 147(1):37

IF 9,3

Barilani M, Peli V, Manzini P, Pistoni C, Rusconi F, Pinatel EM, Pischiutta F, Tace D, Iachini MC, Elia N, Tribuzio F, Banfi F, Sessa A, Cherubini A, Dolo V, Bollati V, Fiandra L, Longhi E, Zanier ER, Lazzari L

**Extracellular Vesicles from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit a Unique MicroRNA and CircRNA Signature**

Int J Biol Sci 2024; 20(15):6255-6278

IF 8,2

Samanta RJ, Chiollaz AC, Needham E, Yue JK, Helmy A, Zanier ER, Wang KKW, Kobeissy F, Posti JP, Summers C, Manley GT, Maas AI, Tenovuo O, Sanchez JC, Menon DK; TRACK-TBI investigators and participants; CENTER-TBI investigators and participants

**Parsimonious immune-response endotypes and global outcome in patients with traumatic brain injury**

EBioMedicine 2024; 108:105310

IF 9,7

Mercurio D, Pischiutta F, Seminara S, Tribuzio F, Lisi I, Pasetto L, Bonetto V, De Simoni MG, Schwaeble W, Yaseen S, Dudler T, Zanier ER, Fumagalli S

**Inhibition of mannanbinding lectin associated serine protease (MASP)-2 reduces the cognitive deficits in a mouse model of severe traumatic brain injury**

J Neuroinflammation 2024; 21(1):141

IF 9,3

Kebede V, Ravizza T, Balosso S, Di Sapia R, Canali L, Soldi S, Galletti S, Papazlatani C, Karas PA, Vasileiadis S, Sforzini A, Pasetto L, Bonetto V, Vezzani A, Vesce L

**Early treatment with rifaximin during epileptogenesis reverses gut alterations and reduces seizure duration in a mouse model of acquired epilepsy**

Brain Behav Immun 2024; 119:363-380

IF 8,8

Perego C, Fumagalli F, Motta F, Cerrato M, Micotti E, Olivari D, De Giorgio D, Merigo G, Di Clemente A, Mandelli A, Forloni G, Cervo L, Furlan R, Latini R, Neumar RW, Ristagno G

**Evolution of brain injury and neurological dysfunction after cardiac arrest in the rat - A multimodal and comprehensive model**

J Cereb Blood Flow Metab 2024; 44(11):1316-1329

IF 4,9

Caldi Gomes L, Hänzelmann S, Hausmann F, Khatri R, Oller S, Parvaz M, Tzeplaeff L, Pasetto L, Gebelin M, Ebbing M, Holzapfel C, Columbro SF, Scozzari S, Knöferle J, Cordts I, Demleitner AF, Deschauer M, Dufke C, Sturm M, Zhou Q, Zelina P, Sudria-Lopez E, Haack TB, Streb S, Kuzma-Kozakiewicz M, Edbauer D, Pasterkamp RJ, Laczko E, Rehrauer H, Schlapbach R, Carapito C, Bonetto V, Bonn S, Lingor P.

**Multiomic ALS signatures highlight subclusters and sex differences suggesting the MAPK pathway as therapeutic target.**

Nat Commun. 2024; 15:4893

IF 14.7

Fabbrizio P, Baindoor S, Margotta C, Su J, Morrissey EP, Woods I, Hogg MC, Vianello S, Venø MT, Kjems J, Sorarù G, Bendotti C, Prehn JHM, Nardo G.

**Protective role of Angiogenin in muscle regeneration in amyotrophic lateral sclerosis: Diagnostic and therapeutic implications.**

Brain Pathol. 2024 Dec 28:e13328

IF 5.8

Dacomo L, La Vitola P, Brunelli L, Messa L, Micotti E, Artioli L, Sinopoli E, Cecutti G, Leva S, Gagliardi S, Pansarasa O, Carelli S, Guaita A, Pastorelli R, Forloni G, Cereda C, Balducci C.

**Transcriptomic and metabolomic changes might predict frailty in SAMP8 mice**

Aging Cell. 2024; 23:e14263

IF 8

Orsini F, Pascente R, Martucci A, Palacino S, Fraser P, Arancio O, Fioriti L.

**SUMO2 rescues neuronal and glial cells from the toxicity of P301L Tau mutant.**

Front Cell Neurosci. 2024 18:1437995

IF 4.2

Pupillo E, Bianchi E, Bonetto V, Pasetto L, Bendotti C, Paganoni S, Mandrioli J, Mazzini L; RNS60-ALS Study Group.

**Long-term survival of participants in a phase II randomized trial of RNS60 in amyotrophic lateral sclerosis.**

Brain Behav Immun. 2024; 122: 456-462

IF 8.8

Giussani G, Ronzano N, Bianchi E, Banditelli F, Beghi E, Pruna D.

**Prevalence of epilepsy in childhood: An epidemiological study in Sardinia.**

Epilepsy Behav. 2024 Jan;150:109558

IF 2.3

Tapella L, Dematteis G, La Vitola P, Leva S, Tonelli E, Raddi M, Delconti M, Dacomo L, La Macchia A, Murari E, Talmon M, Malecka J, Chrostek G, Grilli M, Colombo L, Salmona M, Forloni G, Genazzani AA, Balducci C, Lim D.

**Genetic deletion of astrocytic calcineurin B1 prevents cognitive impairment and neuropathology development in acute and chronic mouse models of Alzheimer's disease**

Glia. 2024; 72:899-915

IF 5.4

Tortarolo M, Re Cecconi AD, Camporeale L, Margotta C, Nardo G, Pasetto L, Bonetto V, Galbiati M, Crippa V, Poletti A, Piccirillo R, Bendotti C.

**Sunitinib-mediated inhibition of STAT3 in skeletal muscle and spinal cord does not affect the disease in a mouse model of ALS**

Neurobiol Dis. 2024; 199:106576

IF 5.1

Veneruso V, Petillo E, Pizzetti F, Orro A, Comolli D, De Paola M, Verrillo A, Baggiolini A, Votano S, Castiglione F, Sponchioni M, Forloni G, Rossi F, Veglianese P.

**Synergistic Pharmacological Therapy to Modulate Glial Cells in Spinal Cord Injury**

Adv Mater. 2024; 36:e2307747.

IF 27.4

Zerr I, Ladogana A, Mead S, Hermann P, Forloni G, Appleby BS.

Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases.

Nat Rev Dis Primers. 2024; 10: 14

IF 79

De Angelis M, Francescangeli F, Aricò E, Verachi P, Zucchetti M, Matteo C, Petricci E, Pilozi E, Orienti I, Boe A, Eramo A, Rossi R, Corati T, Macchia D, Pacca A M, Zeuner A, Baiocchi M

**A nanoencapsulated oral formulation of fenretinide promotes local and metastatic breast cancer dormancy in HER2/neu transgenic mice**

J Exp Clin Cancer Res 2024; 43:296

IF: 11.4

Ndembe G, Intini I, Moro M, Grasselli C, Panfili A, Panini N, Bleve A, Occhipinti M, Borzi C, Garassino M C, Marabese M, Canesi S, Scanziani E, Sozzi G, Brogini M, Ganzinelli M

**Caloric restriction and metformin selectively improved LKB1-mutated NSCLC tumor response to chemo- and chemo-immunotherapy**

J Exp Clin Cancer Res 2024; 43:6

IF: 11.4

Proto C, Ganzinelli M, Manglaviti S, Imbimbo M, Galli G, Marabese M, Zollo F, Alvisi M F, Perrino M, Cordua N, Borea F, De Vincenzo F, Chella A, Cappelli S, Pardini E, Ballatore Z, Lucarelli A, Ambrosini E, Giuliano M, Pietroluongo E, Mulargiu C, Fabbri A, Prelaj A, Occhipinti M, Brambilla M, Mazzeo L, et al, Rulli E, De Simone I, Torri V

**Efficacy and safety of ramucirumab plus carboplatin and paclitaxel in untreated metastatic thymic carcinoma: RELEVANT phase II trial (NCT03921671)**

Ann Oncol 2024; 35:817-826

IF: 56.7

Cacciatore A, Shinde D, Musumeci C, Sandrini G, Guarrera L, Albino D, Civenni G, Storelli E, Mosole S, Federici E, Fusina A, Iozzo M, Rinaldi Andrea, Pecoraro M, Geiger R, Bolis M, Catapano C V, Carbone G M

**Epigenome-wide impact of MAT2A sustains the androgen-indifferent state and confers synthetic vulnerability in ERG fusion-positive prostate cancer**

Nat Commun 2024; 15:6672

IF: 14.7

Dibitetto D, Liptay M, Vivalda F, Dogan H, Gogola E, Fernandez M G, Duarte A, Schmid J A, Decollogny M, Francica P, Przetocka S, Durant S T, Forment J V, Klebic I, Siffert M, de Bruijn R, Kousholt A N, Marti N A, Dettwiler M, Sorensen C S, Tille J-C, Undurraga M, Labidi-Galy I, Lopes M, Sartori A A, Jonkers J, Rottenberg S

**H2AX promotes replication fork degradation and chemosensitivity in BRCA-deficient tumours**

Nat Commun 2024; 15:4430

IF: 14.7

Craparotta I, Mannarino L, Zadro R, Ballabio S, Marchini S, Pavesi G, Russo Marta, Renne S L, Meroni M, Ponzio M, Bello E, Sanfilippo R, Casali P G, D'Incalci M, Frapolli R

**Mechanism of efficacy of trabectedin against myxoid liposarcoma entails detachment of the FUS-DDIT3 transcription factor from its DNA binding sites**

J Exp Clin Cancer Res 2024; 43:309

IF: 11.4

Chiappa M, Decio A, Guarrera L, Mengoli I, Karki A, Yemane D, Ghilardi C, Scanziani E, Canesi S, Barbera M C, Craparotta I, Bolis M, Fruscio R, Grasselli C, Ceruti T, Zucchetti M, Patterson J C, Lu R A, Yaffe M B, Ridinger M, Damia G, Guffanti F

**Onvansertib treatment overcomes olaparib resistance in high-grade ovarian carcinomas**

Cell Death Dis 2024; 15:521

IF: 8.1

Del Bufalo D, Damia G

**Overview of BH3 mimetics in ovarian cancer**

Cancer Treat Rev 2024; 129:102771

IF: 9.6

Dibitetto D, Widmer C A, Rottenberg S

**PARPi, BRCA, and gaps: controversies and future research**

Trends Cancer 2024; 10:857-869

IF: 14.3

Moregola A, Bonacina F, Vingiani G B, Frapolli R, Turrini R, Norata G D

**Profiling the impact of anti-human CD20 monoclonal antibodies on lymphocyte B cell subsets and their precursors in the bone marrow and in lymphoid tissues in an immunocompromised mouse engrafted with human cells**

Pharmacol Res 2024; 209:107442

IF: 9.1

Guffanti F, Chiappa M, Damia G

**Targeting the DNA damage response in cancer**

MedComm 2024; 5:e788

IF: 10.7

Longhi Elisa, Carminati L, Carlessi E, Belotti D, Taraboletti G

**Thrombospondin-1 in drug activity and tumor response to therapies**

Semin Cell Dev Biol 2024; 155:45-51

IF: 6.2

Anastasia A., Formenti L., Ostano P., Minoli L., Resovi A., Morosi L., Fioravanti C., Micotti E., Matteo C., Scanziani E., Chiorino G., Giavazzi R., Ghilardi C., Belotti D.

**Stroma gene signature predicts responsiveness to chemotherapy in pancreatic ductal adenocarcinoma patient-derived xenograft models**

Molecular Oncology 2025, in press

IF 5

Tiraboschi C., Parenti F. Sangalli F., Resovi A., Belotti D., Lanzarone E.

**Automatic Segmentation of Metastatic Livers by means of U-Net Based Procedures**

Cancers, 2024, 16(24):4159

IF: 4.5

Portella G, **Chatenoud L**, Gatti S, Salvati A C, Asta L, Lentini S, Puntilla J, Masini F, Redaelli S, Mocini A, Abdallah S A, Abdalla Abdalla S H, Erba N, Giovanella E, Raafat Shafiq Saber D, Rocchi D, Badr Saad M, Valgoi L, Malerba P, Rolla L, Pesenti A, Latini R, Parrino P, Miccio R, Langer M, Salam Centre Working Group

**Rheumatic valve surgery in Sudan: Results in 7,449 patients at the Salam Centre for Cardiac Surgery**

J Am Coll Cardiol 2024; Dec 3:S0735-1097(24)10032-0

IF 21.7

Iaffaldano P, Portaccio E, Lucisano G, Simone M, Manni A, Guerra T, Paolicelli D, Betti M, De Meo E, Pastò L, Razzolini L, Rocca M A, Ferrè L, Brescia Morra V, Patti F, Zaffaroni M, Gasperini C, De Luca G, Ferraro D, Granella F, Pozzilli C, Romano S, Gallo P, Bergamaschi R, Coniglio M G, Lus G, Vianello M, Lepore V, et al, Italian Multiple Sclerosis Register

**Multiple sclerosis progression and relapse activity in children**

JAMA Neurol 2024; 81:50-58

IIF 20.4

Scala M, Lugo A, Gallus S

**Support for smoke-free generation strategies in Italy**

Lancet Reg Health Eur 2024; 44:101013

IF 13.6

Li L M, Kodosaki E, Heselgrave A, Zetterberg H, Graham N, Zimmerman K, Soreq E, Parker T, Garbero E, Moro F, Magnoni S, Bertolini G, Loane D, Sharp D J

**High-dimensional proteomic analysis for pathophysiological classification of traumatic brain injury**

Brain 2024; Sep 26:awae305

IF 10.6

Possenti I, Romelli M, Carreras G, Biffi A, Bagnardi V, Specchia C, Gallus S, Lugo A

**Association between second-hand smoke exposure and lung cancer risk in never-smokers: a systematic review and meta-analysis**

Eur Respir Rev 2024; 33:240077

IF 9

Zappalà S, Alfieri F, Ancona A, Taccone F S, Maviglia R, Cauda V, Finazzi S, Dell'Anna A M

Development and external validation of a machine learning model for the prediction of persistent acute kidney injury stage 3 in multi-centric, multi-national intensive care cohorts

Crit Care 2024; 28:189

IF 8.8

Graham N, Zimmerman K, Heslegrave A J, Keshavan A, Moro F, Abed Maillard S, Bernini A, Dunet V, Garbero E, Nattino G, Chierogato A, Fainardi E, Baciuc C, Gradisek P, Magnoni S, Oddo M, **Bertolini G**, Schott J M, Zetterberg H, Sharp D

**Alzheimer's disease marker phospho-tau181 is not elevated in the first year after moderate-to-severe TBI**

J Neurol Neurosurg Psychiatry 2024; 95:356-359

IF 8.7

Nafisi S, Stoer N C, Veierod M B, Randel K R, Hoff G, Lofling L, Bosetti C, Botteri E

**Low-dose aspirin and prevention of colorectal cancer: evidence from a nationwide registry-based cohort in Norway**

Am J Gastroenterol 2024; 119:1402-1411

IF 8

Possenti I, Scala M, Carreras G, Bagnardi V, Bosetti C, Gorini G, Maci C, Malevolti M C, Odone A, Smits L, Specchia C, Gallus S, Lugo A

**Exposure to second-hand smoke and breast cancer risk in non-smoking women: a comprehensive systematic review and meta-analysis**

Br J Cancer 2024; 131:1116-1125

IF 6.4

Roberti E, Clavenna A, Basso E, Bravaccio C, Riccio M P, Pincherle M, Duca M, Giordani C, Scarpellini F, Campi R, Giardino M, Zanetti M, Tessarollo V, Costantino I, TransiDEA group, Bonati M

**Challenges in transitioning from adolescent to Adult Mental Health Services for young adults with ADHD in Italy: an observational study**

Epidemiol Psychiatr Sci 2024; 33 e49

IF 5.9

Baviera M, Zanovello A, Ojeda-Fernández L, Molteni M, Cimminiello C.

**Use of betablockers in post-myocardial infarction patients in a real-world setting.**

Eur J Intern Med. 2024 Dec 9:S0953-6205(24)00501-6. doi: 10.1016/j.ejim.2024.12.005.

IF 5.9

Franchi C, Orsini F, Cantelli F, Ardoino I, Piscitelli P, Shaji S, Ran T, Ainslie N, Graziadio C, Vetrani C, Colao A.

**"Planeterranean" diet: the new proposal for the Mediterranean-based food pyramid for Asia.**

J Transl Med. 2024; 22(1):806

IF 8.45

Garattini L, Nobili A, Remuzzi G

**The Italian health-care crisis-only a matter of funding?**

Lancet 2024; 403: 727-728

IF 98.4

Franchi C, Orsini Francesca, Cantelli F, Ardoino I, Piscitelli P, Shaji S, Ran T, Ainslie N, Graziadio C, Vetrani C, Colao A

**"Planeterranean" diet: the new proposal for the Mediterranean-based food pyramid for Asia**

J Transl Med 2024; 22: 806

IF 6.1

Ostuzzi G, Gastaldon C, Tettamanti M, Cartabia M, Monti I, Aguglia A, Aguglia E, Bartoli F, Callegari C, Canozzi A, Carbone A, CarrÃ G, Caruso R, Cavallotti S, Chiappini S, Colasante F, Compri B, D'Agostino A, De Fazio P, De Filippis R, Gari M, Ielmini M, Ingrosso G, Mammarella S, Martinotti G, et al, D'Avanzo B, VESPA Study Group , Barbato A, Barbui C

**Tolerability of vortioxetine compared to selective serotonin reuptake inhibitors in older adults with major depressive disorder (VESPA): a randomised, assessor-blinded and statistician-blinded, multicentre, superiority trial**

EClinicalMedicine 2024; 69: 102491

IF 9.6

Ojeda-Fernández L, Baviera M, Macaluso G, Schena S, Tettamanti M, Cartabia M, Foresta A, Manucci PM, Nobili A, Remuzzi G, Roncaglioni C.

**UDCA treatment against COVID-19: Do we have enough clinical evidence for drug repurposing?**

J Intern Med. 2024 Jan;295(1):110-112. doi: 10.1111/joim.13711.

IF 9.0

Garattini L, Badinella Martini M, Mazzone A

**Integrated care and lean management in internal medicine: An ideal mix for a functioning health system?**

Eur J Intern Med 2024; E-pub

IF 5.9

Garattini L, Badinella Martini M, Schumacher F, Nobili A

**Medical specialties in Europe: The less the better?**

Eur J Intern Med 2024; 119: 141-143

IF 5.9

Garattini L, Badinella Martini M, Nobili A

**Urgent and emergency care in Europe: Time for a rational network?**

Eur J Intern Med 2024; 120: 1-2

IF 5.9

Elli C, Novella A, Ottomanelli G L, Pasina L

**Improving proton pump inhibitor deprescribing: impact of an educational intervention in Italian nursing homes**

J Am Med Dir Assoc 2024; 25: 105049

IF 4.2

Colombo C, Banzi R, Gerardi C, Allocati E, Mosconi P, Foglia E, Ferrario L, Romano F, Castellani C; Gruppo Multidisciplinare HTA.

**Cystic fibrosis carrier screening: a Health technology assessment**

Recenti Prog Med. 2024;115(1):35-39

IF      NOTA DA VIVI: NON RIPORTATO IN "JOURNAL CITATION REPORT"

Garcia P, Banzi R, Fosse V, Gerardi C, Glaab E, Haro JM, Oldoni E, Porcher R, Subirana-Mirete J, Superchi C, Demotes J.

**The PERMIT guidelines for designing and implementing all stages of personalised medicine research**

Sci Rep. 2024;14(1):27894

IF 3.8

## ATTIVITA' FORMATIVE 2024

NOME CORSO & DURATA	OBIETTIVI	STUDENTI FORMATI E REQUISITI RICHIESTI
<p><b>Corso di Perfezionamento in Scienze Farmacologiche (Dottorato di Ricerca)</b></p> <p>3 anni</p>	<p>L'obiettivo del corso è di formare ricercatori che alla fine del percorso possano avere raggiunto un'indipendenza nel progettare e condurre i progetti di ricerca. Il percorso formativo è caratterizzato da uno stretto rapporto fra la preparazione culturale avanzata e l'esperienza pratica di ricerca sperimentale (o clinica), cui è dato il maggior risalto. Ciascun allievo è inserito in un gruppo di ricerca ed è attivamente coinvolto nei progetti in corso partecipando all'effettuazione degli studi, alla loro pianificazione e alla valutazione critica dei risultati. L'allievo ha la possibilità di utilizzare tutta la tecnologia e la strumentazione più moderna nel campo della biomedicina, acquisendo così un'approfondita conoscenza delle metodiche. Durante i seminari di Istituto e di Dipartimento, l'allievo viene a contatto con temi che normalmente esulano dal suo campo di interesse specifico dando la possibilità di ampliare il proprio bagaglio culturale.</p>	<p><b>3</b></p> <p>Soggetti che sono in possesso di diploma di laurea secondo la legge 341/90 o di laurea specialistica/magistrale secondo i D.D.M.M. 509/99 e 270/04 o di titolo straniero ritenuto equipollente, in discipline scientifiche.</p>

	<p>Infine i corsi monografici hanno lo scopo di fornire all'allievo un aggiornamento su tematiche specifiche. L'ambiente multidisciplinare dell'Istituto permette infine all'allievo di essere a contatto con tematiche e gruppi di ricerca molto eterogenei, confrontandosi con problemi che spaziano dalla biologia molecolare alla sperimentazione clinica e alla epidemiologia. Durante il corso l'allievo partecipa alla redazione di articoli in inglese su riviste scientifiche internazionali e alla preparazione di proposte di ricerca per le organizzazioni pubbliche e private, italiane e internazionali.</p>	
<p><b>Corso PhD</b> 4 anni</p>	<p>Il corso, della durata media di quattro anni, è destinato a laureati con esperienza di ricerca, buona conoscenza della lingua inglese e attitudine al lavoro di gruppo. Gli studenti svolgono la loro attività di specializzazione prevalentemente in un laboratorio dell'Istituto e sono progressivamente inseriti nei programmi di ricerca in corso. Essi sono tenuti a frequentare lezioni, seminari, corsi e convegni e ad utilizzare la biblioteca interna. L'Istituto fornisce a tutti l'accesso alle basi di dati di biomedicina e alle principali riviste scientifiche. Dopo l'ottenimento del</p>	<p><b>5</b> Soggetti che sono in possesso di diploma di laurea secondo la legge 341/90 o di laurea specialistica/magistrale secondo i D.D.M.M. 509/99 e 270/04 o di titolo straniero ritenuto equipollente, in discipline scientifiche.</p>

	titolo, per molti allievi si apre l'opportunità di trascorrere uno o più anni in laboratori all'estero.	
<b>Corsi ECM</b>  1 anno	Il corso consente al personale sanitario l'ottenimento di crediti formativi sia con corsi di formazione residenziali (massimo 30 persone), sia con progetti di ricerca sul campo, sia con eventi congressuali.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- N° degli eventi residenziali presentati all'accreditamento: 0 (dopo Istruttoria Principale, durante il 2024 aggiunti 4 eventi RES)</li> <li>- N° di eventi residenziali accreditati: 4</li> <li>- N° di crediti rilasciati per eventi residenziali: 925,6</li> <li>- N° di eventi residenziali (FAD BLENDED) accreditati: 0</li> <li>- N° di crediti rilasciati per eventi residenziali (FAD BLENDED): 0</li> <li>- N° di partecipanti agli eventi residenziali: 106</li> <li>- N° degli eventi di formazione sul campo attività di ricerca presentati all'accreditamento: 29 (dopo Istruttoria Principale, durante il 2024 tolti 4 eventi ed aggiunti 6 di FSC)</li> <li>- N° di eventi di formazione sul campo (attività di ricerca) accreditati: 31</li> <li>- N° di crediti rilasciati per eventi di formazione sul campo (attività di ricerca): 15.261</li> <li>- N° di partecipanti agli eventi di formazione sul campo: 1.490</li> <li>- Partecipanti 2024: 1.596 → (31 progetti formazione sul campo e 4 eventi residenziali)</li> <li>- N° totale crediti: 16.186,6 → (31 progetti formazione sul campo e 4 eventi residenziali)</li> </ul> <p>Personale sanitario, medico e non medico, dipendente o libero professionista operante nella Sanità, sia privata che pubblica (medici chirurghi, psicologi, farmacisti, infermieri, tecnici sanitari di laboratorio biomedico, biologi, logopedisti,</p>

		fisioterapisti)
<b>Corso per Clinical Monitor</b> 22 mesi	Il programma del corso è strutturato su diversi livelli: lezioni teoriche, attività di monitoraggio in affiancamento ad un Clinical Monitor certificato, attività di monitoraggio autonomo, attività di ricerca di gruppo, seminari di Istituto o di Dipartimento, riunioni di laboratorio e corsi monografici. Ciascuno studente è inserito in un gruppo di ricerca ed è attivamente coinvolto nei progetti in corso, potendo così partecipare alla pianificazione, esecuzione e valutazione critica delle attività svolte.	<b>4</b> Soggetti in possesso di laurea (triennale o quinquennale) in discipline scientifiche (o titolo straniero ritenuto equipollente) e di effettiva conoscenza della lingua inglese (parlata e scritta), come indicato nei bandi di concorso.
<b>Advanced school in computational chemistry addressing benefits and risks in life sciences through computational methods</b> 3 anni	Il corso non prevede una specifica attività didattica, ma una stretta interazione fra la preparazione culturale (acquisita all'università) e l'esperienza pratica (acquisibile in Istituto). Lo studente è inserito in un laboratorio ed è coinvolto (sotto la guida di un docente) nei progetti di ricerca in corso, partecipando attivamente alla pianificazione, esecuzione ed analisi degli esperimenti.	<b>1</b> Il corso è rivolto a laureati (laurea triennale o quinquennale) in discipline scientifiche (o titolo assimilabile) e di effettiva conoscenza della lingua inglese (parlata e scritta).
<b>Corso per Summer Student</b> 7 settimane	L'offerta didattica consiste nella partecipazione a progetti di ricerca sperimentale. Gli studenti durante il corso hanno l'opportunità di essere inseriti in un laboratorio, utilizzando gli strumenti utilizzati comunemente nella	<b>11</b> Il corso è rivolto a giovani interessati alla biomedicina che hanno terminato il quarto anno della scuola media superiore,

	ricerca sperimentale preclinica ed apprendendo i metodi di elaborazione dei dati ottenuti e delle informazioni presenti nella letteratura scientifica. Le principali tematiche affrontate sono: Ambiente e Salute, Biochimica e Farmacologia Molecolare, Neuroscienze, Oncologia, Ricerca Cardiovascolare.	
<b>Alternanza Scuola Lavoro Bergamo</b> 2 settimane	Il corso offre agli studenti la possibilità di vivere l'esperienza del laboratorio osservando l'attività di ricerca quotidiana svolta dai ricercatori e di accedere ad una biblioteca ben aggiornata. Le principali tematiche affrontate sono: Bioingegneria, Medicina Molecolare, Medicina Renale, e Malattie Rare.	<b>11</b> Il corso è rivolto a giovani interessati alla biomedicina che hanno terminato il quarto anno della scuola media superiore.
<b>Alternanza Scuola Lavoro Milano</b> 2 settimane	Il corso offre agli studenti la possibilità di vivere l'esperienza del laboratorio osservando l'attività di ricerca quotidiana svolta dai ricercatori e di accedere ad una biblioteca ben aggiornata. Le principali tematiche affrontate sono: Ambiente e Salute, Biochimica e Farmacologia Molecolare, Neuroscienze e Oncologia.	<b>1</b> Il corso è rivolto a giovani interessati alla biomedicina che hanno terminato il quarto anno della scuola media superiore.