

PRIN: PROGETTI DI RICERCA DI RILEVANTE INTERESSE NAZIONALE

Bando 2022 PNRR

Prot. P2022W7ALA

Illuminating the Glucocorticoid action on the Adipocyte-Brain Axis in humans: novel approaches to the study of the glucocorticoid neuro-metabolic effects

(INTEGRATIONS: IllumiNating thE GlucocoRticoid Action On the Adipocyte-Brain axis in humans)

Breve descrizione dello studio e finalità

I glucocorticoidi (GC) sono ormoni fondamentali nella risposta allo stress, capaci di modulare l'espressione genica attraverso meccanismi genomici e non genomici. Essi influenzano profondamente sia il sistema nervoso centrale sia il tessuto adiposo, che a sua volta agisce come organo endocrino rilasciando fattori bioattivi ed esosomi in grado di modulare la funzione di altri organi, incluso il cervello. Evidenze recenti suggeriscono che gli esosomi derivati dal tessuto adiposo possano avere un impatto diretto sulle cellule neuronali, influenzandone plasticità, funzione e sopravvivenza.

L'esposizione cronica ai GC è associata a disfunzioni sinaptiche, neurodegenerazione e a un aumentato rischio di patologie neurologiche e psichiatriche, soprattutto se avviene durante fasi critiche dello sviluppo, come il periodo fetale. Nonostante il loro ampio impiego clinico per le proprietà antinfiammatorie e immunosoppressive, gli effetti a lungo termine dei GC sulla biologia dei neuroni umani non sono ancora completamente chiariti, anche a causa dei limiti dei modelli animali.

Questo progetto ha mirato a valutare la neurotossicità dei GC e il loro ruolo nell'asse tessuto adiposo–cervello utilizzando modelli umani avanzati. L'ipotesi era che i GC possano alterare la funzione neuronale sia direttamente sia indirettamente attraverso il secretoma adipocitario. Mediante approcci innovativi di cellomica, FRET ed epigenomica, sono stati analizzati i meccanismi molecolari ed epigenetici coinvolti nello sviluppo cerebrale e nella predisposizione a malattie neurodegenerative. I risultati attesi hanno contribuito a chiarire il ruolo dei GC nella morbilità lungo l'arco della vita e a individuare possibili strategie preventive e terapeutiche.

Risultati attesi

Questo progetto ha mirato a fornire un'analisi completa degli effetti dei GC a livello neuronale, con particolare attenzione allo sviluppo del sistema nervoso, al fine di aumentare la consapevolezza della comunità scientifica sulla complessità degli effetti dei GC sulla salute umana. Le evidenze ottenute da sofisticati modelli umani in vitro consentiranno un'analisi approfondita dei meccanismi attraverso cui i GC possono interagire con il sistema neuronale e il tessuto adiposo, potenzialmente predisponendo allo sviluppo di malattie neurodegenerative.

Di conseguenza, lo scopo era di generare informazioni rilevanti sul possibile contributo dei GC alla morbidità iatrogena in età pediatrica e adulta, nonché sul relativo impatto sociale ed economico. Allo

stesso tempo, analizzando i meccanismi molecolari attraverso cui i GC esercitano i loro effetti a livello neuronale, il progetto INTEGRATIONS avrà gettato le basi per l'identificazione di possibili e appropriate strategie di mitigazione.

Risultati raggiunti

La ricerca condotta dall'Unità 3 del presente PRIN, guidata dalla Prof. Claudia Pivonello, mirava a valutare le modificazioni del profilo di microRNA (miRNA) espressi da adipociti bianchi derivati da cellule staminali mesenchimali (hAMSC) umane e da esosomi rilasciati dalle hAMSC in seguito a trattamento con GC. Grazie al sostegno finanziario ricevuto dall'Unione Europea, il gruppo di ricerca della Prof. Claudia Pivonello ha contribuito al progetto valutando le modificazioni dei profili di miRNA espressi da hAMSC differenziate in adipociti bianchi, dopo trattamento acuto con desametasone (DEX).

Al termine del periodo di differenziamento, le hAMSC sono state seminate in piastre da 35 mm (1×10^5 cellule) e trattate o meno con DEX 10^{-7} M per 48 ore. La colorazione Oil Red O (ORO) è stata utilizzata per valutare la lipogenesi, mentre l'espressione dei miRNA cellulari è stata analizzata mediante array RT-qPCR nelle cellule trattate e di controllo.

Poiché gli effetti del DEX sul tessuto adiposo sono tempo e dose dipendenti, le variazioni temporali dell'accumulo lipidico nelle hAMSC sono state valutate a due diversi tempi di esposizione (breve: 48 ore, trattamento acuto; lungo: 8 giorni, trattamento cronico) mediante colorazione ORO. L'analisi quantitativa ha evidenziato un significativo effetto lipolitico del DEX dopo trattamento acuto (48 ore), con una riduzione del 15,64% dell'accumulo lipidico cellulare ($p < 0,0001$) (Figura 1A). Al contrario, il trattamento cronico (8 giorni) ha determinato un aumento significativo dell'accumulo lipidico (38,0%, $p < 0,0001$), in linea con il quadro clinico dell'ipercortisolismo (Figura 1B).

Per verificare che l'aumento dei miRNA cellulari si riflettesse anche nel secretoma, l'espressione di miR-103a-3p, miR-130b-3p e miR-204-5p è stata valutata mediante RT-qPCR negli esosomi rilasciati da hAMSC trattate (Exo DEX) e negli esosomi delle cellule non trattate (Exo). Coerentemente, miR-103a-3p ($p = 0,0002$), miR-130b-3p ($p = 0,0013$) e miR-204-5p ($p < 0,0001$) risultavano sovraregolati negli esosomi Exo DEX rispetto agli esosomi Exo (Figura 2).

Quest'analisi è stata propedeutica per gli studi condotti dall'unità 1 sul sistema nervoso.

Per esplorare le potenziali implicazioni funzionali di questi miRNA, abbiamo eseguito un'analisi di arricchimento GO sui geni target predetti, evidenziando una prevalenza di geni correlati allo sviluppo e alla differenziazione muscolare, inclusi la regolazione della proliferazione delle cellule muscolari, la differenziazione del muscolo scheletrico e lo sviluppo del tessuto muscolare (Figura 2D). Pertanto, l'unità 3 si è poi focalizzata sul cross-talk tra tessuto adiposo e tessuto muscolare.

Per approfondire le relazioni regolatorie, sono state costruite reti di interazione miRNA-gene per evidenziare il ruolo dei miRNA nella regolazione dei geni target coinvolti nei termini GO associati all'atrofia del muscolo scheletrico (SM) (Figura 2E). In particolare, i miRNA identificati convergono



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

su regolatori chiave del catabolismo muscolare, in particolare sull'asse di segnalazione FOXO, suggerendo un meccanismo coordinato di regolazione post-trascrizionale dell'espressione degli atrofici.

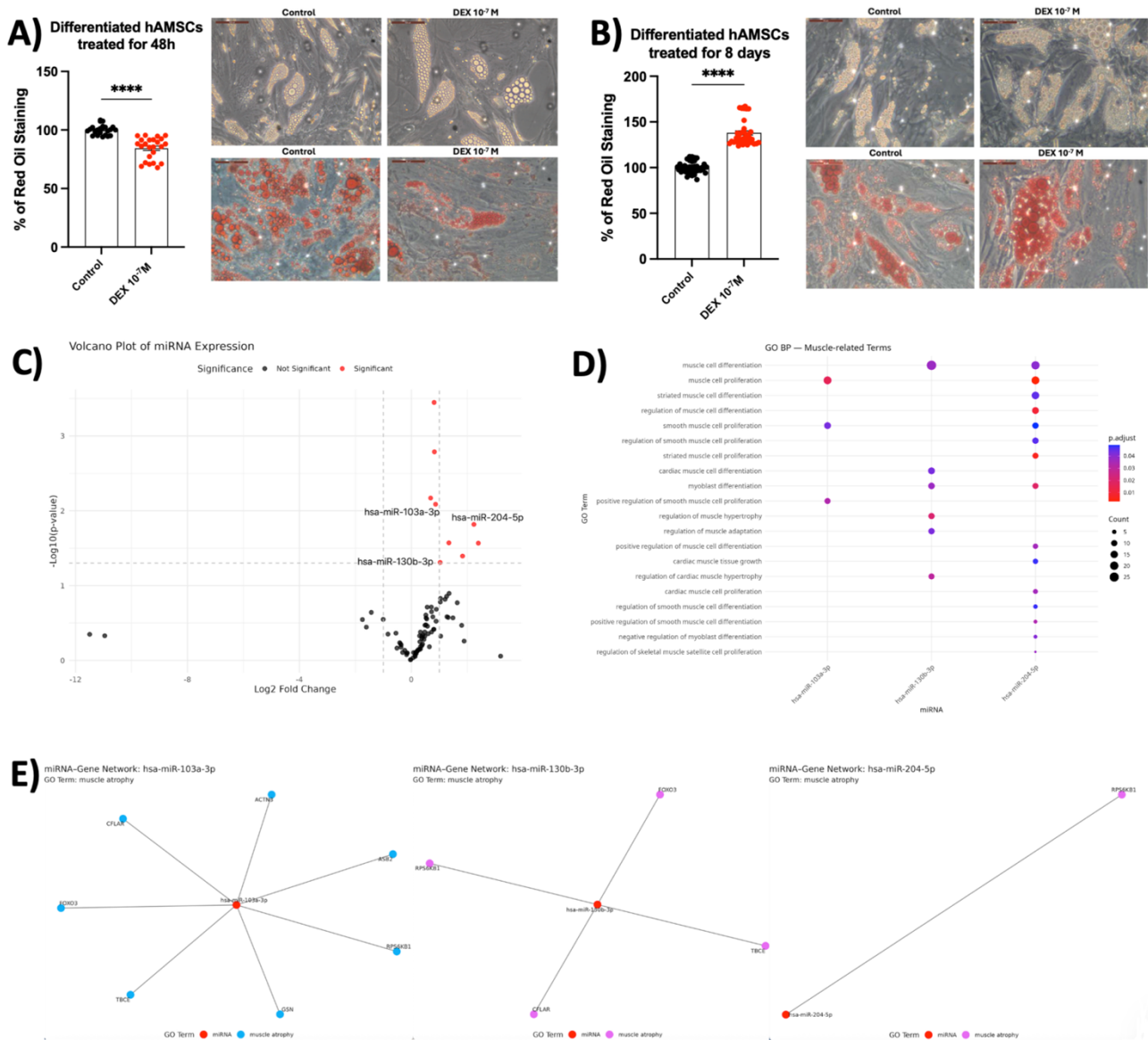


Figura 1: (A) Percentuale di colorazione ORO nelle hAMSC differenziate dopo trattamento acuto con DEX. (B) Percentuale di colorazione ORO nelle hAMSC differenziate dopo trattamento cronico con DEX. (C) Analisi tramite volcano plot nelle hAMSC differenziate dopo trattamento acuto con DEX, che evidenzia variazioni significative nei miRNA: miR-103a-3p, miR-130b-3p e miR-204-5p. (D) Analisi di arricchimento dei target predetti e costruzione e visualizzazione della rete del muscolo scheletrico (SM). (E) Interazioni miRNA-target con geni coinvolti nell'atrofia muscolare.

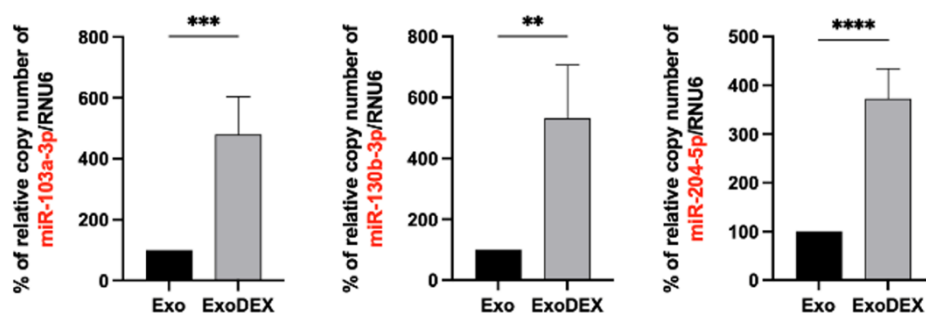
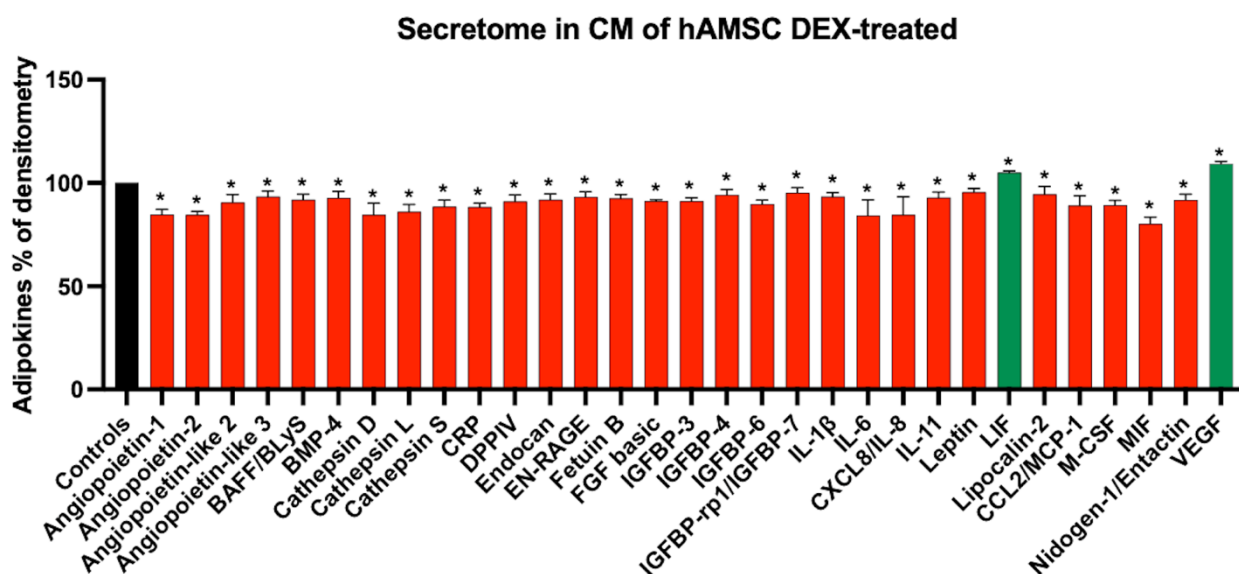


Figura 2: Espressione dei miRNA negli esosomi derivati da hAMSC (Exo) e negli esosomi derivati da hAMSC trattate con DEX (Exo DEX).

Il profilo delle adipochine, valutato come parte del secretoma nel mezzo di coltura delle hAMSC mediante il Proteome Profiler Human Adipokine Array, ha evidenziato prevalentemente una riduzione dei livelli di diversi fattori infiammatori e catabolici. In particolare, la secrezione di Angiopoietina-1, Angiopoietina-2, Angiopoietina-like 2, Angiopoietina-like 3, BAFF/BlyS, BMP-4, Cathepsina D, Cathepsina L, Cathepsina S, CRP, DPPIV, Endocan, EN-Rage, Fetuin B, FGF basic, IGFBP-3, IGFBP-4, IGFBP-6, IGFBP-7, IL-1 β , IL-6, CXCL8/IL-8, IL-11, Leptina, Lipocalina-2,



CCL2/MCP-1, M-CSF, MIF e Nidogen-1/Entactina è risultata significativamente ridotta ($p=0,0286$), mentre la secrezione di LIF e VEGF è risultata significativamente aumentata ($p=0,0286$) nel mezzo condizionato (CM) delle hAMSC trattate con DEX rispetto al controllo (Figura 3), suggerendo uno spostamento verso un ambiente favorevole all'omeostasi muscolare.

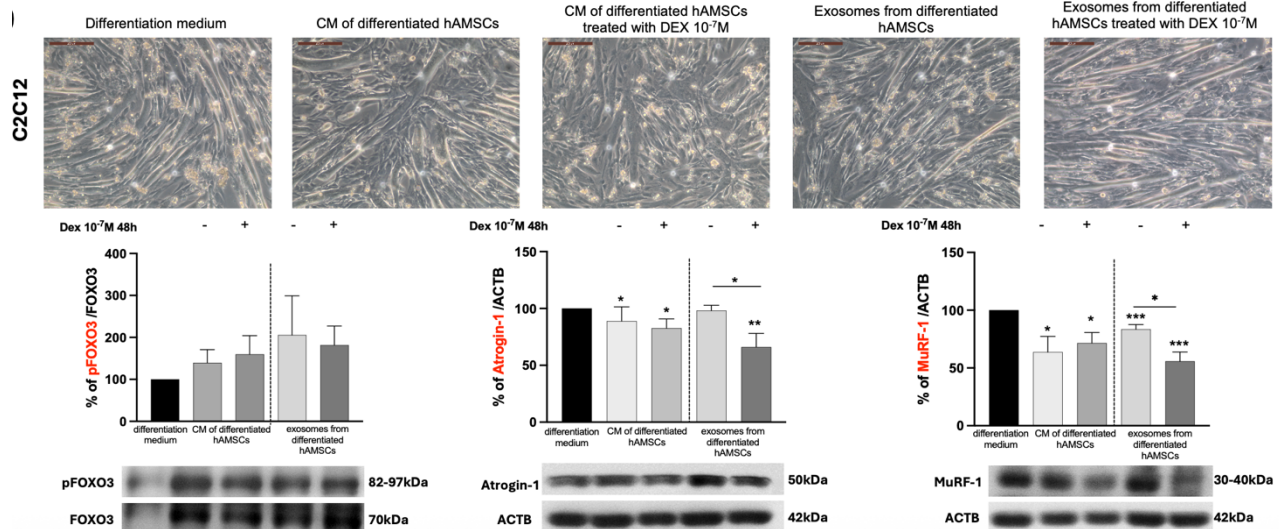
Figura 3: Analisi densitometrica delle adipochine nel mezzo condizionato (CM) delle hAMSC in seguito a trattamento acuto con DEX.

Per investigare se il trattamento acuto con DEX delle hAMSC potesse influenzare funzionalmente la segnalazione catabolica del SM, i miotubi C2C12 sono stati esposti al mezzo condizionato delle hAMSC (hAMSC-CM), sia non trattato sia trattato con DEX (CM e CM + DEX), nonché agli esosomi (Exo) ed esosomi derivati da hAMSC trattate con DEX (Exo DEX). I livelli proteici dei principali marcatori di atrofia sono stati valutati mediante analisi Western blot (WB).

Sebbene non siano state osservate differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali nella regolazione di FOXO3, sia i trattamenti con CM sia con Exo hanno determinato una significativa riduzione dell'espressione di Atrogin-1 (CM: -11,1%, $p = 0,04$; CM + DEX: -17,3%, $p = 0,04$; Exo DEX: -33,9%, $p = 0,002$ vs controllo [C2C12 in mezzo di differenziamento]) e di MuRF-1 (CM: -36,25%, $p = 0,02$; CM + DEX: -28,5%, $p = 0,02$; Exo: -16,4%, $p = 0,0006$; Exo DEX: -44,16%, $p = 0,0006$ vs controllo).



Il trattamento con Exo DEX ha indotto una riduzione significativamente maggiore dell'espressione proteica di Atrogin-1 e MuRF-1 rispetto a Exo (per Atrogin-1: Exo DEX -32% , $p = 0,03$; per MuRF-1: Exo DEX $-27,7\%$, $p = 0,014$) (Figura 4), suggerendo che l'effetto anti-atrofico predominante sia



mediato dalle vescicole esosomiali.

Figura 4: Immagini di C2C12 differenziate acquisite a 20X al termine dei trattamenti specifici. Analisi densitometrica Western blot (WB) di FOXO3, Atrogin-1 e MuRF-1 nei miotubi C2C12 esposti a mezzo condizionato (CM) con e senza DEX, e a esosomi derivati da hAMSC (Exo) ed esosomi da hAMSC trattate con DEX (Exo DEX). FOXO3 fosforilato è stato normalizzato su FOXO3 totale. Atrogin-1 e MuRF-1 sono stati normalizzati sull'actina.

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dall'analisi in immunofluorescenza (IF) (Figura 5). Rispetto ai miotubi di controllo coltivati in mezzo standard di differenziamento, l'esposizione a CM (con o senza DEX) ha determinato una marcata riduzione dell'espressione di Atrogin-1 (CM: -42% , $p < 0,0001$; CM + DEX: -30% , $p = 0,011$ vs controllo). Analogamente, il trattamento con Exo DEX ha ridotto significativamente i livelli di Atrogin-1 (-36% , $p = 0,0049$).

Allo stesso modo, l'espressione di MuRF-1 è risultata significativamente ridotta nella maggior parte dei gruppi trattati, in particolare: CM: -29% , $p = 0,004$; CM + DEX: -21% , $p = 0,015$; Exo DEX: -22% , $p = 0,0048$ rispetto ai miotubi di controllo.

Questi dati indicano che il trattamento acuto con DEX induce una modificazione nella composizione del secretoma delle hAMSC e nella frazione esosomiale, capace di esercitare un marcato effetto anti-atrofico sul muscolo scheletrico.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che il trattamento acuto con DEX delle hAMSC conferisce un effetto anti-catabolico sulle cellule muscolari scheletriche terminalmente differenziate, come confermato dall'espressione di MYOG, e supportano la capacità sia del mezzo condizionato sia degli esosomi rilasciati da hAMSC trattate con DEX di inibire le vie associate all'atrofia muscolare, evidenziando un meccanismo paracrina che contribuisce al mantenimento dell'omeostasi muscolare.

Per valutare direttamente il ruolo centrale dei miRNA esosomiali identificati nel mediare gli effetti del trattamento acuto con DEX delle hAMSC sul SM, i miotubi C2C12 sono stati trasfettati con mimics o inibitori.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

L'analisi in IF ha evidenziato che la trasfezione con mimics dei miRNA riduce significativamente i livelli proteici di Atrogin-1 (miR-204-5p $p < 0,0001$) e MuRF-1 (miR-103a-3p $p = 0,009$; miR-130b-3p $p = 0,0003$; miR-204-5p $p = 0,05$), replicando gli effetti osservati nei miotubi C2C12 esposti al mezzo condizionato delle hAMSC trattate con DEX. Al contrario, la trasfezione con inibitori dei miRNA ha parzialmente o completamente ripristinato l'espressione di questi marcatori di atrofia

(Atrogin-1: miR-103a-3p inibitore vs mimic $p = 0,02$; miR-204-5p inibitore vs mimic $p = 0,002$; MuRF-1: miR-103a-3p inibitore vs mimic $p = 0,004$; miR-130b-3p inibitore vs mimic $p = 0,004$; miR-204-5p inibitore vs mimic $p = 0,02$) (Figura 6A-B).

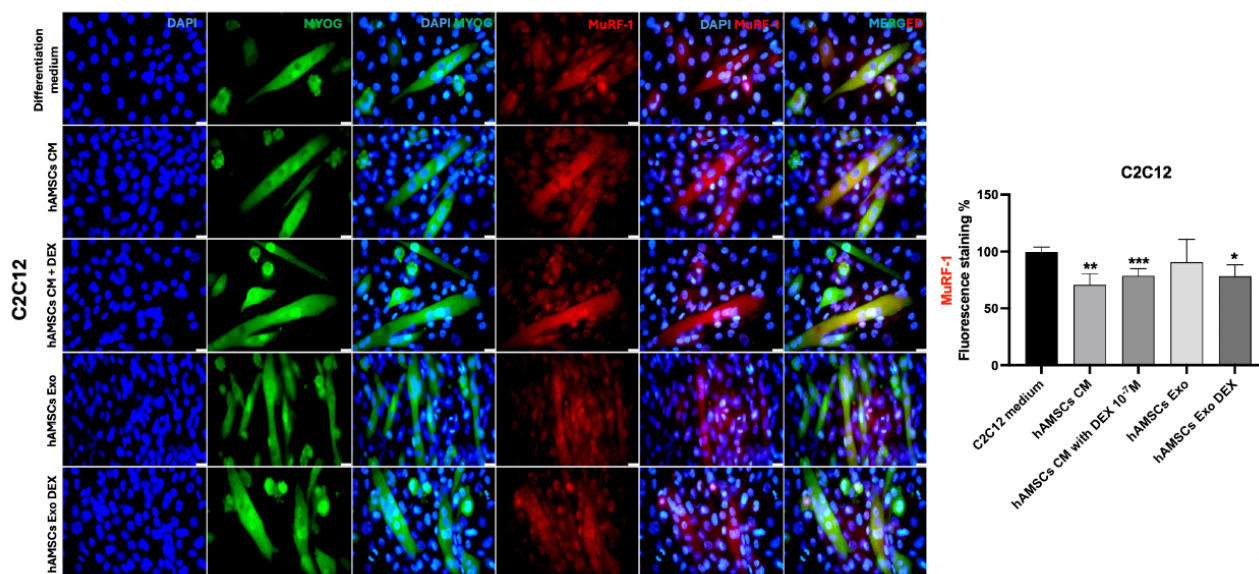
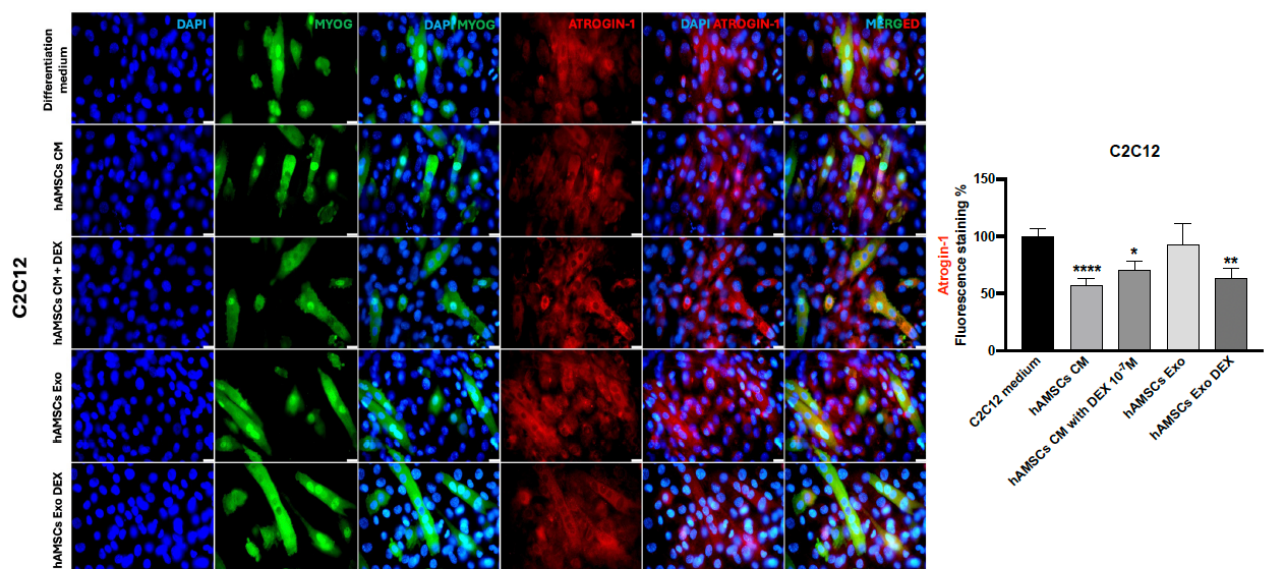




Figura 5: Analisi in immunofluorescenza (IF) di Atrogin-1 e MuRF-1 nei miotubi C2C12 esposti a mezzo condizionato (CM) con e senza DEX, e a esosomi derivati da hAMSC (Exo) ed esosomi da hAMSC trattate con DEX (Exo DEX). I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu), MYOG è stato rilevato con Alexa Fluor 488 (verde), mentre Atrogin-1 e MuRF-1 sono stati rilevati con TRITC (rosso), con immagini acquisite a ingrandimento 60x.

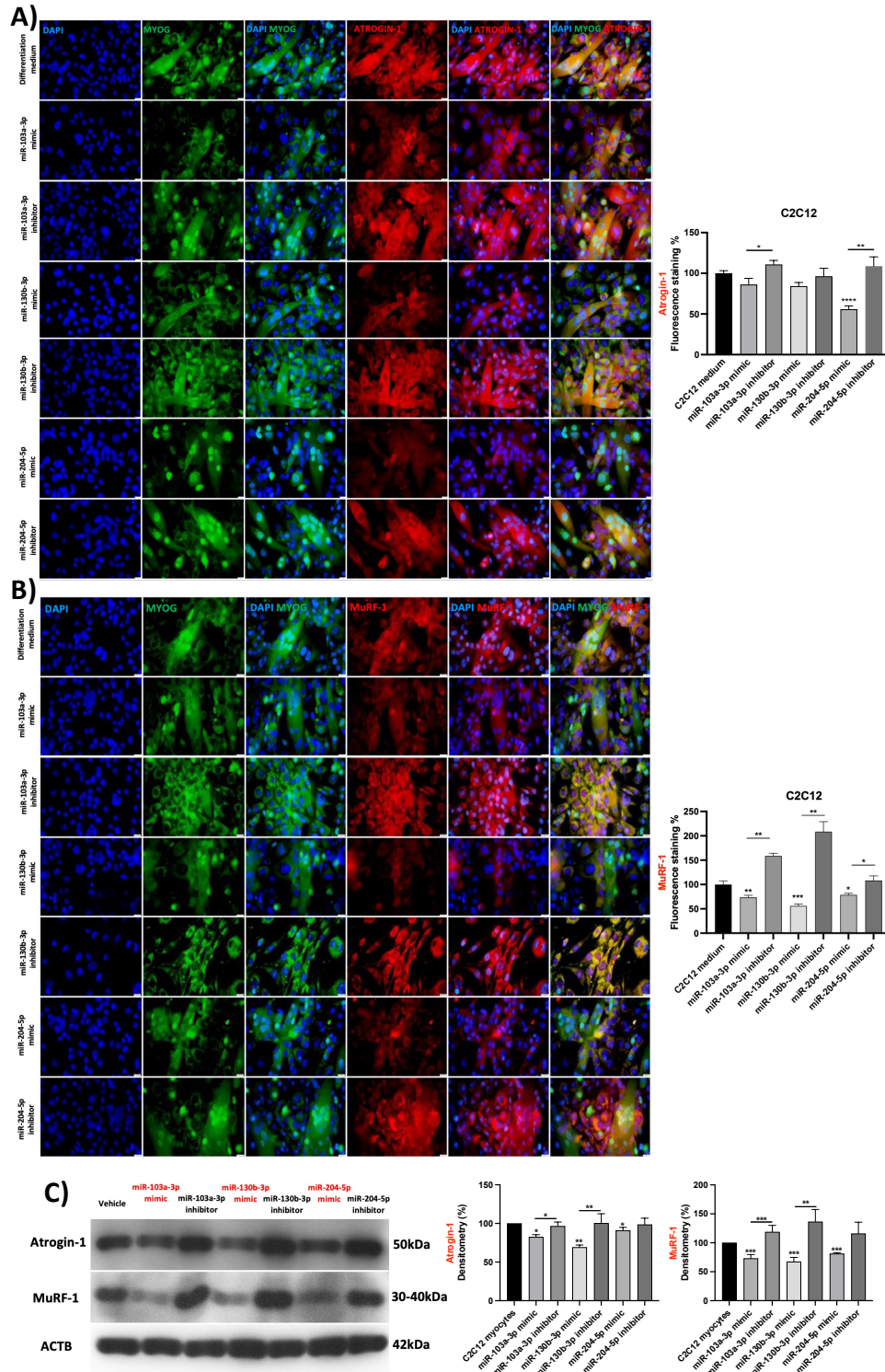


Figura 6: (A-B) Analisi in immunofluorescenza (IF) di miogenina (MYOG), Atrogin-1 e MuRF-1 in cellule trasfettate con mimics o inibitori di miRNA, con relativa quantificazione. I nuclei sono stati colorati con DAPI (blu), MYOG è stato rilevato con Alexa Fluor 488 (verde), mentre Atrogin-1 e MuRF-1 sono stati rilevati con TRITC (rosso), con immagini acquisite a ingrandimento 60x. (C) Analisi Western blot (WB) di Atrogin-1 e MuRF-1 nei miotubi C2C12 trasfettati con mimics o inibitori di miRNA, con relativa quantificazione.

I risultati del presente studio hanno dimostrato che l'esposizione acuta a DEX riprogramma il profilo secretorio delle hAMSC, generando un secretoma con effetti protettivi sul muscolo, arricchito in specifiche adipochine e miRNA esosomiali in grado di attenuare la segnalazione dell'atrofia nel SM.

Disseminazione

Un obiettivo delle attività di disseminazione è dimostrare come il Ministero dell'Università e della Ricerca abbia contribuito in modo significativo, attraverso il Piano Nazionale di Ripresa e Resilienza, al progresso della conoscenza scientifica nell'ambito del Cluster 1 "Health" di Horizon Europe 2021-2027. La disseminazione si è presentata dei risultati a internazionali e al termine della all'Ateneo organizzato al fine di nonché tramite social media.



focalizzata in itinere sulla congressi nazionali e progettualità a meeting interno presentare i risultati dello studio,

Lo studio è stato presentato al Congresso Europeo di Endocrinologia (ECE) tenutosi a Praga 9-11 maggio 2026, vincendo anche un Basic Science Meeting Grant.

Abstract N°: ECE_2727

Secretome and exosomes from conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) acutely treated with dexamethasone (Dex) reduce atrophic signals in C2C12 myocytes

Nunzia Magnacca*¹, Mariarosaria Negri², Feliciano Amatrudo², Francesco Cecere³, Maria Anna Marciano⁴, Bruno Hay Mele⁵, Cristina De Angelis¹, Chiara Simeoli¹, Erminio Massimo Crescenzo¹, Annamaria Colao^{1, 6}, Raffaella Crescenzo⁴, Rosario Pivonello^{1, 6}, Claudia Pivonello⁷

¹Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Sezione di Endocrinologia, Diabetologia, Andrologia e Nutrizione, Università Federico II di Napoli, Naples, Italy, ²Dipartimento di Psicologia e Scienze della Salute, Università Telematica Pegaso, Naples, Italy, ³UOS Laboratori di Ricerca e Biobanca, UOC Ricerca Clinica e Traslazionale, AORN Santobono-Pausilipon, Naples, Italy, ⁴Department of Biology, Federico II University, Naples, Italy, ⁵Department for the Promotion of Human Science and Quality of Life, San Raffaele Open University, Rome, Italy, ⁶UNESCO Chair for Health Education and Sustainable Development, Federico II University, Naples, Italy, ⁷Dipartimento di Sanità Pubblica, Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy

L'abstract dello studio è stato inviato anche agli INCONTRI ITALIANI DI ENDOCRINOLOGIA E METABOLISMO-IIEM 2026 che si terranno 22-24 ottobre 2026 ai Giardini-Naxos ME.

Infine, è attualmente in revisione su rivista scientifica peer-reviewed internazionale Comprehensive Physiology, Q1, IF: 5.2.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

Nunzia Magnacca¹, Mariarosaria Negri^{1,2}, Feliciano Amatrudo^{1,2}, Francesco Cecere³, Bruno Hay Mele⁴, Maria Anna Marciano⁵, Cristina de Angelis¹, Erminio Massimo Crescenzo¹, Chiara Simeoli¹, Annamaria Colao^{1,6}, Raffaella Crescenzo⁵, Rosario Pivonello^{1,6}, Claudia Pivonello⁷. **Secretome of human adipose-derived mesenchymal stem cells acutely treated with dexamethasone modulates skeletal muscle homeostasis in C2C12 cells.** Comprehensive Physiology (IF: 5.2), Under review.