

Relazione tecnico-scientifica annuale del lavoro svolto durante il secondo anno da Ricercatore a Tempo Determinato tipologia A (RTD-A) - Dipartimento di Farmacia - S.C. 03/C1 S.S.D. CHEM-05/A Chimica Organica

Ricercatore: Dott.ssa Serena Pilato

Periodo di riferimento: dal 06/03/2024 al 05/03/2025

Progetto PNRR *Vitality* - Ecosistema per l'innovazione – WP4.4 Precision medicine for cell/tissue therapy and pollution contrast – Preparation and characterization of biomaterials/nano hybrids for biological applications, pollution contrast and lab-on-chip technology. CUP n. D73C22000840006.

ATTIVITA' SCIENTIFICA

L'attività di ricerca della Dott.ssa Serena Pilato durante il secondo anno di RTDA si è concretizzata con la pubblicazione di 7 lavori indicizzati su riviste con I.F. compreso tra 1.7 e 7.4 e con la partecipazione a quattro congressi internazionali (di cui due come relatrice, uno su invito) e a tre congressi nazionali (di cui due come relatrice).

L'attività di ricerca nell'ambito del progetto PNRR *Vitality* si è focalizzata sullo sviluppo e la caratterizzazione di differenti biomateriali ottenuti combinando derivati del grafene con biomacromolecole, polimeri, lipidi, farmaci e/o composti inorganici intesi a contrastare l'inquinamento, favorire la crescita di cellule staminali, direzionare il differenziamento verso linee cellulari specifiche e promuovere il rilascio di vescicole extracellulari. In particolare, scaffold a base di grafene ossido (GO) legato covalentemente a molecole di polietilenimina (PEI) sono stati allestiti e caratterizzati dal punto di vista fisico-chimico mediante differenti tecniche analitiche (spettroscopia Raman, IR, AFM e XPS), evidenziando la formazione di strutture tridimensionali ben definite e con porosità controllata, in grado di fornire un supporto ottimizzato per l'adesione e la proliferazione cellulare. Sono stati infatti analizzati gli effetti su adesione, proliferazione e metabolismo ossidativo di cellule staminali derivanti da liquido amniotico umano (hAFSCs) coltivate sui substrati di GO e GO-PEI, oltre ad essere valutato il contenuto di vescicole extracellulari (EVs) rilasciate in risposta all'esposizione ai biomateriali 3D allestiti. I risultati ottenuti hanno rivelato che i substrati di GO-PEI promuovono la proliferazione e la crescita delle cellule staminali e ripristinano il metabolismo OXPHOS rispetto a quelli costituiti di solo GO, sottolineando l'importanza della funzionalizzazione superficiale nell'influenzare il comportamento delle cellule staminali. Pertanto, questi dati potrebbero aprire la strada per lo sviluppo di supporti tridimensionali di GO-PEI per ottimizzare la proliferazione e la differenziazione delle cellule staminali in applicazioni di medicina rigenerativa e ingegneria tissutale, in particolare per quella cardiaca e neuronale. Infatti, il GO-PEI, che combina le proprietà di conducibilità del grafene con la biocompatibilità del PEI, potrebbe migliorare e sostenere le proprietà elettriche dei

cardiomiociti maturi e dei neuroni, portando allo sviluppo di supporti tridimensionali trapiantabili per la rigenerazione tissutale *in vivo*.

È stata inoltre studiata la combinazione di supporti tridimensionali con nanoparticelle, raccogliendo dati preliminari per ottimizzarne i parametri formulativi e le proprietà chimico-fisiche in vista della loro inclusione in bio-scaffold avanzati, nonché nella tecnologia dell'*organ-on-chip*. A tale scopo, sono stati preparati supporti di titanio personalizzati, con superfici modificate e innovative, con l'obiettivo di sviluppare una strategia efficace per ridurre il rischio di fallimento di impianti e favorire la rigenerazione nei trattamenti odontoiatrici, accelerando e migliorando il processo di osteogenesi. Per studiare l'interazione tra infiammazione e differenziazione dopo l'impianto, cellule staminali della polpa dentale (DPSCs) sono state coltivate su un supporto di titanio stampato in 3D con una struttura interna a celle aperte e sono state trattate con fattori osteogenici veicolati mediante una formulazione liposomiale (LipoMix). I liposomi a base di POPC/colesterolo sono stati preparati con il metodo dell'idratazione del film lipidico, incorporando fattori di differenziamento idrofili (acido ascorbico e β -glicerofosfato) e idrofobi (desametasone). La formulazione LipoMix ottenuta è stata sottoposta a sonicazione, sterilizzazione e caratterizzazione in termini di dimensioni, forma e carica superficiale mediante analisi DLS e AFM. Sono stati successivamente valutati il differenziamento osteogenico, la deposizione di matrice mineralizzata, l'angiogenesi, l'adesione cellulare e le risposte infiammatorie. I risultati ottenuti dimostrano che LipoMix migliora la proliferazione e l'adesione cellulare, come evidenziato dall'aumento dell'espressione dell'integrina $\beta 1$. Inoltre, la deposizione della matrice mineralizzata, l'espressione del gene SP7, il rilascio di collagene di tipo I e l'attività della fosfatasi alcalina risultano significativamente aumentati in seguito al trattamento con LipoMix. I dati riportati confermano che la topografia interna e i trattamenti post-produzione sulla superficie di titanio in combinazione con LipoMix influenzano positivamente la progressione delle DPSCs verso il fenotipo osteogenico. Pertanto, lo sviluppo di superfici personalizzate con porosità e caratteristiche controllate, insieme alla somministrazione di fattori di differenziamento veicolati da un sistema di rilascio liposomiale, potrebbe rappresentare uno strumento promettente e innovativo applicabile nel campo della rigenerazione tissutale odontoiatrica.

Un altro carrier ibrido per il trasporto di farmaci è stato ottenuto tramite l'inserimento di derivati aril-azo para-sostituiti del timolo nel bilayer liposomiale da utilizzare come "valvole intelligenti" controllabili attraverso una isomerizzazione *trans-cis* indotta dalla luce. I sistemi ibridi ottenuti, incorporati in supporti tridimensionali o in sistemi organ-on-chip, possono essere sfruttati per il trasporto e il rilascio controllato di farmaci per il trattamento di patologie infiammatorie. Le proprietà chimico-fisiche dei sistemi liposomiali ibridi sono state studiate mediante DLS, AFM, spettroscopia Raman e analisi fluorimetriche. In particolare, è stato analizzato l'effetto dell'irraggiamento UV a diverse lunghezze d'onda sulla capacità dei carrier di rilasciare il proprio contenuto e sulla permeabilità del bilayer agli ioni cloruro. I liposomi ibridi non irradiati trattengono il farmaco incapsulato, rallentandone la perdita spontanea, mentre l'irraggiamento UV ne promuove il rilascio, grazie all'isomerizzazione *trans-cis* del guest inserito nel bilayer. Gli interruttori fotochimici studiati sono anche in grado di attivare il trasporto transmembrana degli ioni cloruro, probabilmente attraverso l'apertura

di pori o la formazione di difetti nel bilayer in seguito all'isomerizzazione *trans-cis* indotta dalla luce. Inoltre, la reversibilità del processo consente il completo ripristino delle proprietà della membrana e il ritorno del flusso di ioni cloruro ai valori iniziali mediante l'irraggiamento con radiazioni nel campo del visibile. Infine, il passaggio degli ioni cloruro attraverso il bilayer può essere regolato con precisione variando la lunghezza d'onda della luce e i tempi di esposizione, consentendo lo sviluppo di interruttori fotochimici semplici ed efficaci per controllare la permeabilità delle membrane e il rilascio di farmaci per sistemi di somministrazione intelligenti.

Infine, nell'ambito della ricerca sulle vescicole extracellulari, sono stati studiati gli effetti dell'esposizione ad alta quota su parametri delle EVs isolate da urine. L'urina, essendo un campione biologico non invasivo, facilmente gestibile e potenzialmente molto informativo, rappresenta una matrice ideale per rilevare alterazioni del sistema urinario e di altri sistemi biologici così come della fisiologia delle EVs durante spedizioni in alta quota. Infatti, le EVs urinarie sono importanti per gli adattamenti fisiologici e vengono sempre più considerate come biomarcatori della funzionalità renale. È ampiamente noto che, in condizioni di ipossia dovuta all'altitudine, la riduzione della pressione parziale dell'ossigeno induce l'organismo a mettere in atto una serie di meccanismi compensatori che influenzano la fisiologia umana nel suo complesso. A tal fine, sono stati raccolti campioni di urina da 15 partecipanti sani a bassa e alta quota durante una spedizione alpina e analizzati per creatinina e albumina, perossidazione lipidica, IL-6 e derivati dell'ossido nitrico. In alta quota il rapporto albumina/creatinina è aumentato, così come i valori di IL-6 e 8-isoprostano. Complessivamente, la breve esposizione all'ipossia indotta dall'altitudine ha aumentato la capacità di concentrazione renale, ha prodotto un'alterazione non patologica della funzionalità renale e innescato un carico ossi-infiammatorio, con una risposta eterogenea del sistema dell'ossido nitrico. Successivamente, sono state ottenute le EVs urinarie con un protocollo ben standardizzato di isolamento tramite ultracentrifugazione con gradiente di saccarosio e caratterizzate dal punto di vista fisico-chimico con AFM e spettroscopia Raman. L'analisi morfologica mediante AFM ha evidenziato la presenza di EVs di forma globulare ma appiattita, sebbene diversi campioni fossero caratterizzati da una quantità elevata di contaminanti e vescicole che avevano perso la loro tipica forma sferica. Le analisi di spettroscopia Raman hanno rivelato la presenza di alcuni pattern tipici dei fosfolipidi che compongono le vescicole, spesso mascherati dai contaminanti che sono risultati maggiormente presenti ed evidenti nei campioni raccolti ad alta quota. La combinazione di AFM e spettroscopia Raman ha mostrato che le EVs raccolte in alta quota tendono maggiormente a fondersi tra loro e ad essere incorporate in una matrice di sedimenti, presentando picchi di contaminanti che rendono il processo di purificazione meno efficiente. L'alterazione subclinica della funzionalità renale in alta quota ha probabilmente modificato sia il contenuto delle EVs urinarie sia il fluido in cui erano immerse, alterando potenzialmente anche le proteine corona di superficie che rivestono le EVs. L'analisi del *fingerprint* urinario, grazie alla combinazione di diverse procedure analitiche, rappresenta un promettente campo di ricerca nell'ambito della fisiologia ambientale e potrebbe offrire nuove possibilità per rilevare effetti biologici e clinici causati dall'alta quota sul sistema renale.

1. A. Piro, M.C. Cufaro, P. Lanuti, D. Brocco, L. De Lellis, R. Florio, S. Pilato, S. Pagotto, S. De Fabritiis, S. Vespa, G. Catitti, F. Verginelli, P. Simeone, D. Pieragostino, P. Del Boccio, A. Fontana, A. Grassadonia, M. Di Ianni, A. Cama, S. Veschi,* **Exploring the Immunomodulatory Potential of Pancreatic Cancer-Derived Extracellular Vesicles through Proteomic and Functional Analyses**, *Cancers*, 16(10):1795 (2024). IF 4.5
2. S. Moffa, S. Carradori, F. Melfi, A. Fontana, M. Ciulla, P. Di Profio, M. Aschi, R. D. Wolicki, S. Pilato,* G. Siani,* **Fine-tuning of membrane permeability by reversible photoisomerization of aryl-azo derivatives of thymol embedded in lipid nanoparticles**. *Colloids and Surfaces B – Biointerfaces*, 241(4):114043 (2024). IF 5.4
3. M. P. Dimmito, L. Marinelli,* I. Cacciatore, E. C. Toto, B. Albertini, A. Fontana, S. Pilato, M. Reale, E. Costantini, C. Pesce, A. Di Stefano, P. Caliceti, **From self-assembly to healing: Engineering ultra-Small peptides into supramolecular hydrogels for controlled drug release**, *International Journal of Pharmaceutics*, 633, 124562 (2024). IF 5.3
4. M. Gallorini, A. Ricci, S. Pilato, A. Fontana, C. Mangano, A. Cataldi, S. Zara,* **Innovative 3D-printed titanium specimens favor a modulation of inflammation in Dental Pulp Stem Cells during liposome-triggered mineralization**, *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 1-31 (2024). IF 1.7
5. A. Di Credico, G. Gaggi, S. Bibbò, S. Pilato, S. Di Giacomo, G. Siani, A. Fontana, S. Moffa, F. Konstantinidou, L. Stuppia, V. Gatta, A. Di Baldassarre,* M. Donato, B. Ghinassi, **Exploring Potential Impact of Graphene Oxide-Polyethylenimine on Biological Behavior of Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells**, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 13598:1-17 (2024). IF 4.9
6. S. Pilato, S. Mrakic-Sposta, V. Verratti, C. Santangelo, S. Di Giacomo, S. Moffa, A. Fontana, T. Pietrangelo, F. Ciampini, S. Bonan, P. Pignatelli, C. Noce, P. Di Profio, M. Ciulla, D. Bondi,* F. Cristiano, **Urineprint of high-altitude: insights from analyses of urinary biomarkers and bio-physical-chemical features of extracellular vesicles**, *Biophysical Chemistry*, 316, 107351:1-10 (2025). I.F.3.3
7. P. Lanuti, F. Guardalupi, G. Corradi, R. Florio, D. Brocco, S. Veschi, E. Pennese, D. De Bellis, F. D'Ascanio, A. Piro, L. De Lellis, P. Simeone, M.C. Cufaro, S. Pilato, I. D'Amario, I. Villanova, B. Di Francesco, L. Di Re, F. Verginelli, D. Pieragostino, P. Salutari, F. Colasante, A. Natale, M.V. Mattoli, S. Vespa, A. Fontana, R. Giancola, B. Fabi, S. Baldoni, S. Santarone, F. Restuccia, N. Tinari, P. Del Boccio, A. Cama, M. Di Ianni,* **CD19.CAR-T cell-derived extracellular vesicles express CAR and kill leukemic cells, contributing to antineoplastic therapy**, *Blood Advances*, doi: 10.1182/bloodadvances.2024014860 (2025). I.F. 7.4

Proceedings (dal 06/03/2024 al 05/03/2025)

1. N. Barbacane, M. Ciulla, S. Di Giacomo, R. D. Wolicki, B. Castellani, G. Siani, S. Pilato, S. Moffa, P. Di Profio, **Basic Sorbents for High-pressure CO₂-Containing Streams: Experimental Investigations and Energy Evaluations**, *SPE Europe Energy Conference and Exhibition 2024*, Conference Paper.

Partecipazione Comitato Organizzatore Congressi (dal 06/03/2024 al 05/03/2025)

1. Comitato organizzatore Convegno "Sfide ed Opportunità Lavorative nella Transizione Energetica e nell'Economia Circolare" Aula G. Bettoni – Dipartimento di Farmacia – Università "G. d'Annunzio" di Chieti, 8 Marzo 2024.
2. Comitato organizzatore *ECGH 2024 – European Conference on Gas Hydrate*, 11-14 Giugno 2024, Trieste.

Comunicazioni a Congressi (dal 06/03/2024 al 05/03/2025)

1. S. Pilato, S. Moffa, G. Siani, F. Diomede, O. Trubiani, J. Pizzicannella, D. Capista, M. Passacantando, P. Samori, A. Fontana, **3D Graphene Oxide-Polyethylenimine scaffolds for Cardiac Tissue Engineering**, Vitality Day, 13 Maggio 2024, Chieti (CH), Comunicazione Poster.
2. S. Moffa, S. Pilato, D. Velluto, A. Fontana, **Graphene Oxide Functionalized Drug-Integrating Amphiphilic Nano-Assemblies (GO-DIANAs) with High Potential Application in the Diabetes Treatment**, Vitality Day, 13 Maggio 2024, Chieti (CH), Comunicazione Poster.
3. S. Pilato, S. Moffa, M. Aschi, M. Bazzoni, F. Cester Bonati, A. Secchi, P. Bruni, P. Di Profio, A. Fontana, G. Siani, **Study of water soluble and highly stable supramolecular assemblies from amphiphilic calix[6]arenes for drug delivery**, International Conference Nanoscience and Nanotechnology 2024, 03-06 Giugno 2024, Frascati (RM), Comunicazione Orale su invito.
4. S. Pilato, M. Ciulla, G. Siani, S. Moffa, N. Barbacane, R. D. Wolicki, A. Fontana, P. Di Profio, **Understanding Methane Hydrate Adhesion on Surfaces: A Preliminary Investigation**, *ECGH 2024 – European Conference on Gas Hydrate*, 11-14 Giugno 2024, Trieste, Comunicazione Poster.
5. N. Barbacane, M. Ciulla, S. Pilato, R. D. Wolicki, C. Pirim, P. Di Profio, B. Chazallon, **Potential Kinetic Promoters for CO₂/CH₄ Separation: IR vs in-situ Raman determinations**, *ECGH 2024 – European Conference on Gas Hydrate*, 11-14 Giugno 2024, Trieste, Comunicazione Poster.
6. R. D. Wolicki, M. Ciulla, S. Pilato, G. Siani, N. Barbacane, A. Fontana, S. Moffa, P. Di Profio, **Optimizing Biogas Upgrading with Clathrate Hydrates: Influence of Different Water Phases and Additives**, *ECGH 2024 – European Conference on Gas Hydrate*, 11-14 Giugno 2024, Trieste, Comunicazione Poster.

7. M. Ciulla, S. Pilato, G. Siani, N. Barbacane, R. D. Wolicki, C. Pirim, B. Chazallon, P. Di Profio, **Improvement of hydrogen clathrate formation by reverse micelles and optimization of the formulative parameters**, ECGH 2024 – European Conference on Gas Hydrate, 11-14 Giugno 2024, Trieste, Comunicazione Orale.
8. N. Barbacane, M. Ciulla, S. Di Giacomo, R. D. Wolicki, B. Castellani, G. Siani, S. Pilato, S. Moffa, P. Di Profio, **Basic Sorbents for High-pressure CO₂-containing Streams: Experimental Investigation and Energy Evaluations**, SPE Europe Energy Conference & Exhibition, 26-28 Giugno 2024, Centro Congressi Lingotto, Torino, Comunicazione orale (SPE-220222).
9. S. Pilato, S. Di Giacomo, S. Moffa, A. Fontana, M. Skinner, R. Warmoth, S. Lee, M. Ramal-Sanchez, L. Valbonetti, N. Bernabò, **Study of the interaction between Graphene Oxide and cholesterol using liposomes as artificial membrane model**, XXVII Congresso Nazionale della Società Chimica Italiana SCI 2024 – Elements of Future, 26-30 Agosto 2024, Milano (MI), Comunicazione Poster (ORG-PO-224).
10. V. Da Fermo, P. Bruni, V. Ferrone, S. Pilato, A. Fontana, S. Ferrari, **The SPINNERET project: Electrospun Nanocomposites for Energy Storage**, Conference of Nanoinnovation 2024, 9-13 September 2024, Roma, Comunicazione Poster.
11. S. Moffa, S. Pilato, D. Velluto, A. Fontana, **Graphene Oxide functionalized amphiphilic nano-assemblies (GO-DIANAs) with high application potential in diabetes treatment**, XVI National Congress of Supramolecular Chemistry – Supramol 2024, 10-13 September 2024, Pavia (PV), Comunicazione Poster (P021).

ATTIVITA' COMPLEMENTARE E SEMINARIALE

- Esercitazioni pratiche di laboratorio di microscopia a forza atomica nell'ambito del corso a scelta "Analisi Termica (DSC/TGA) e Microscopia a Forza Atomica (AFM) per campioni ad uso ambientale con laboratorio" nel CdS di Tecnologie Eco-Sostenibili e Tossicologia Ambientale (T.E.S.T.A.) (Proff. Antonella Fontana e Pantaleone Bruni), affini alle tematiche del progetto PNRR-Vitality ed inerenti al SSD CHEM-05/A (dal 10/04/2024 al 19/04/2024).
- Lezione seminariale per Dottorandi del Corso di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Farmaceutiche – 38° ciclo dal titolo "*Liposomi: caratterizzazione chimico fisica*" (14/05/2024 – 1h).
- Attività didattica per Dottorandi del Corso di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Farmaceutiche – 38° ciclo dal titolo "*Progettazione di nanoparticelle per il rilascio e il targeting mirato di farmaci*" (15/10/2024; 2h).

- Attività didattica per Dottorandi del Corso di Dottorato in Scienze e Tecnologie per lo Sviluppo Sostenibile – 39° ciclo dal titolo *"Grafene e materiali 2D: sfide ed opportunità nell'ambito dell'economia circolare"* (27/06/2024 – 29/07/2024 – 30/10/2024; 8h/1 CFU).
- Attività didattica per Dottorandi del Corso di Dottorato in Scienze Biomolecolari e Farmaceutiche – 39° ciclo dal titolo *"Microscopia a Forza Atomica e analisi topografica di biomateriali"* e *"Progettazione di nanoparticelle per il rilascio e il targeting mirato di farmaci"* (30/07/2024 – 28/02/2025; 4h).
- Esercitazioni pratiche di laboratorio di microscopia a forza atomica nell'ambito del corso a scelta *"Analisi Termica (DSC/TGA) e Microscopia a Forza Atomica (AFM) per campioni ad uso ambientale con laboratorio"* nel CdS di Tecnologie Eco-Sostenibili e Tossicologia Ambientale (T.E.S.T.A.) (Proff. Antonella Fontana e Stefania Ferrari), affini alle tematiche del progetto PNRR-Vitality ed inerenti al SSD CHEM-05/A (dal 22/01/2025 al 28/01/2025).

Relatore di Tesi di Laurea:

- Tesi sperimentale dal titolo *"Sviluppo di biomateriali polimerici funzionalizzati con grafene ossido per la rigenerazione di tessuto osseo"*, Ilenia De Sanctis, matricola 3166243, Laurea in CTF il 13/11/2024.

Attività di tutoraggio per la Tesi di Laurea:

- Tesi sperimentale dal titolo *"Fotoisomerizzazione di aril-azo derivati del timolo per il controllo della permeabilità di membrana"*, Martina Santelia, Tutor Prof.ssa Gabriella Siani, Laurea in CTF il 21/03/2024.
- Tesi sperimentale dal titolo *"Interazione di monoterpeni fenolici e loro derivati con liposomi di POPC come modelli di membrana: effetti sulle proprietà chimico-fisiche della membrana liposomiale e implicazioni per l'attività antimicrobica"*, Eleonora Di Giovanni, Tutor Prof.ssa Gabriella Siani, Laurea in CTF il 13/11/2024.
- Tesi sperimentale in corso di svolgimento (CTF), Michal Pawel Wolicki, Tutor Prof.ssa Antonella Fontana.
- Tesi sperimentale in corso di svolgimento (CTF), Francesco Gabriele Chiarelli, Tutor Prof.ssa Gabriella Siani.

La sottoscritta Serena Pilato, nata a Napoli (NA) il 03/11/1992, C.F. PLTSRN92S43F839F, e residente in Via Foce 34 Ischia (NA), dichiara la presente relazione è resa ai sensi degli articoli 38 e 47 del D.P.R. N. 445/2000 con piena consapevolezza delle sanzioni penali previste dall'art. 76, del medesimo D.P.R., per le ipotesi di falsità in atti e dichiarazioni mendaci eventualmente indicate.

Autorizzo il trattamento dei miei dati personali e la loro eventuale comunicazione a terzi ai sensi del Regolamento UE 2016/679.

Chieti, 2/03/2025

Firma

Serena Pilato