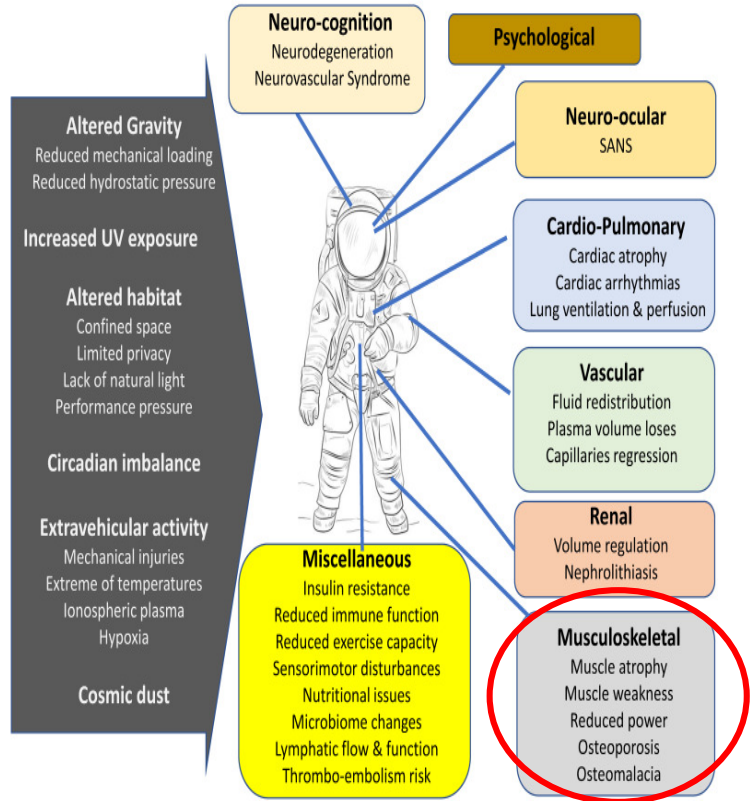


Analisi dell'alterazione dei miRNA associati alla microgravità: applicazione come biomarcatori e per lo sviluppo di sensori diagnostici

Alessandra Pasquo, PhD

Laboratorio di Metrologia e Diagnostica-
FSNTECFIS-DIM
Enea C.R. Frascati

- Con la prospettiva di missioni spaziali di lunga durata, si rende necessario raccogliere maggiori informazioni sugli adattamenti fisiologici che si verificano nel corpo umano
- comprensione dei cambiamenti molecolari fondamentali che si verificano durante i viaggi nello spazio



- progressi significativi nella comprensione di questi pericoli e rischi per la salute
- necessarie ulteriori ricerche per consentire un'esplorazione umana dello spazio più sicura oltre la LEO, comprese le missioni lunari, marziane e dello spazio profondo.

ricerca applicata è necessaria per contribuire al monitoraggio efficiente dei biomarcatori per la salute degli astronauti e allo sviluppo di contromisure

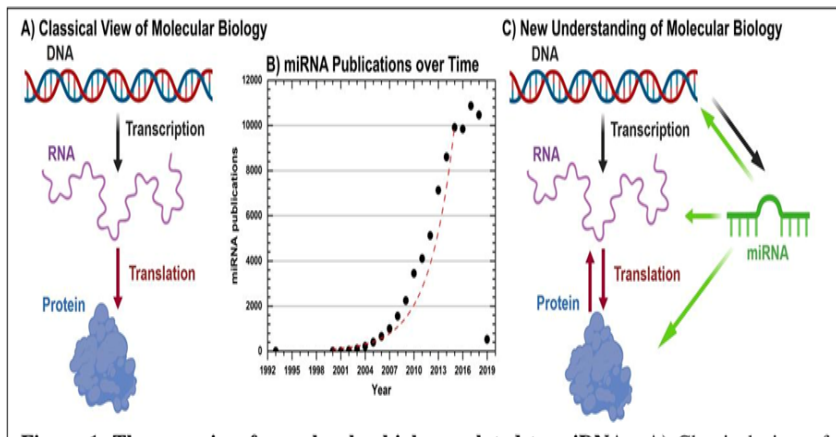
Conseguenze della gravità alterata



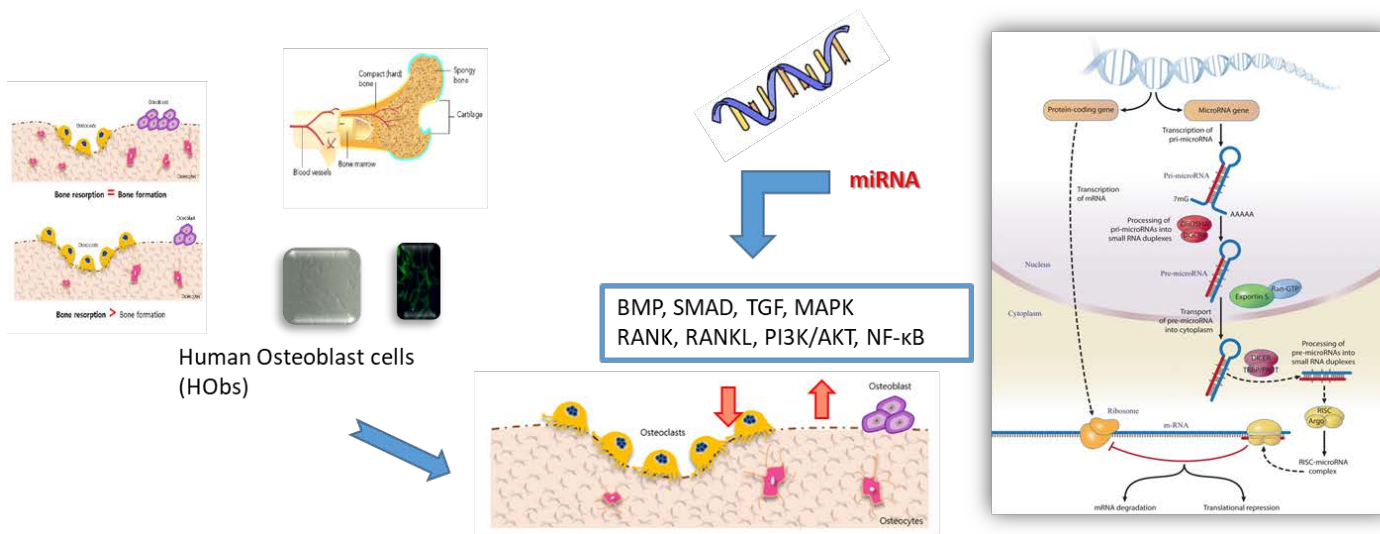
Diagnosi Precoce: Fondamentale per recupero fisiologico e per limitare i «danni»

Caratterizzazione molecolare: personalizzazione della terapia

Identificazione del Biomarker : miRNA



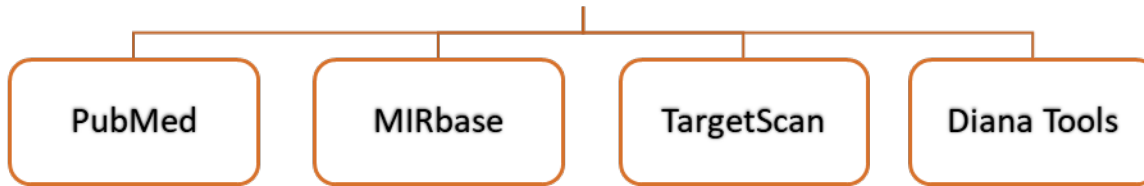
- dimensioni ridotte e maggiore stabilità, i miRNA possono circolare in tutto il corpo (fluidi corporei, tra cui sangue, urina, saliva e lacrime. (Weber et.al, *The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids, Clinical Chemistry* miRNA)
- stabili nel plasma, nel siero e in altri fluidi corporei, con una resistenza all'attività della RNasi, a pH estremi (Glinge, C., et al., *Stability of Circulating Blood-Based MicroRNAs - Pre-Analytic Methodological Considerations*)
- “fingerprints” per malattie specifiche (uso clinico dei miRNA circolanti)
- Caratteristiche che li rendono ottimi candidati come biomarkers diagnostici, di insorgenza di rischi per la salute e target terapeutici per lo sviluppo di contromisure a favore della salute umana



Biomedicina spaziale per le future missioni di esplorazione umana dello spazio: a call to action- ASI-15-17 marzo 2023

Primo approccio metodologico:

- Analisi di Big Data, Repository,
- Data Base on line
- Generazione di Data Set (GSE2352, GSE201543) per muscle/bone
- Analisi di pathways metabolici



Keywords: microgravity, miRNA, spaceflight, disease specifiche(bone/muscle)
Parametri di stringenza

Risultati ottenuti

- Up/down regolazione di pathway metabolici coinvolti in osteogenesi
- Confronto tra condizioni fisiologiche e patologiche (osteoporosi, bone mass reduction) w/wo Gravity
- Up/down Regolazione di pathways coinvolti nella miogenesi
- Confronto tra condizioni fisiologiche e patologiche (skeletal muscle loss, sarcopenia, atrofia) w/wo Gravity w/wo Gravity



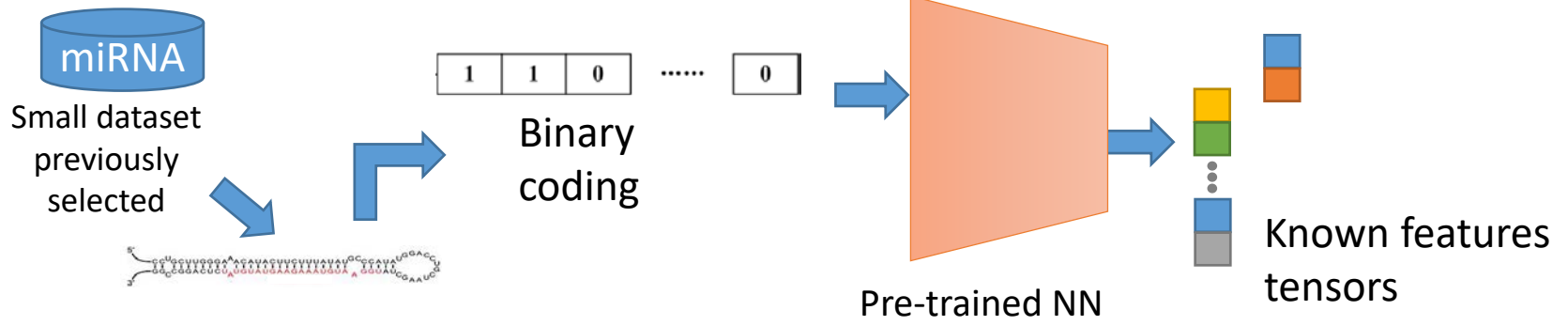
Assenza di Linearità



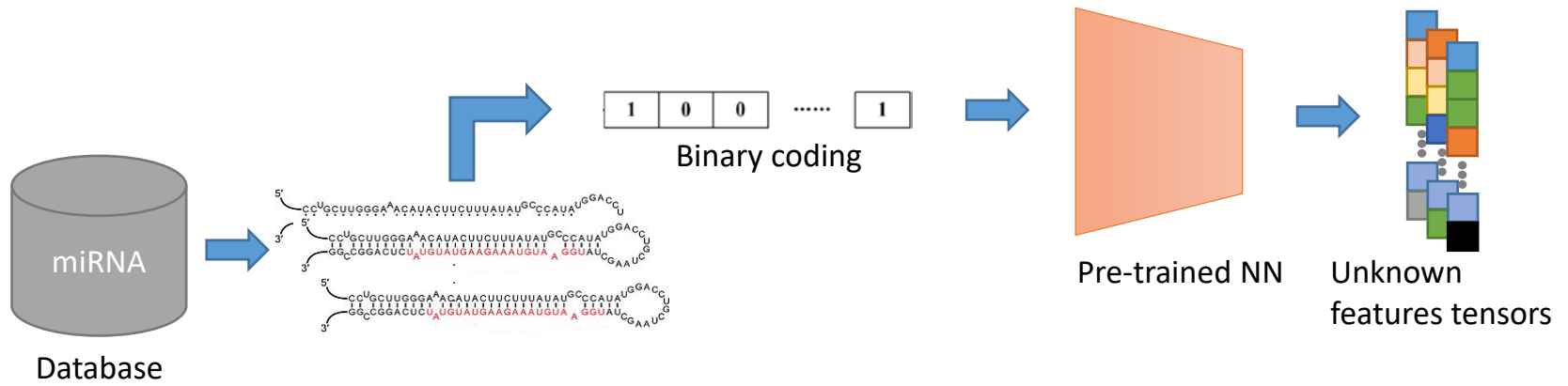
Approccio AI per **ottimizzazione** sequenze miRNA e maggiore **specificità**

A.I. for miRNA scouting

- Use A.I. algorithms for accelerating the process of miRNA identification for tissue specific.
- The first step: identification of a pre-trained Neural Network (NN) for issue classification.
- Removing the last layer, responsible for the classification for which the network has been trained, the NN will be used for features tensors generation of the processed coded miRNA.
- As first step, the features tensors of a small known dataset will be processed.
- These tensors will be used as reference for clustering the further processed miRNA and identifying their tissue specialization.

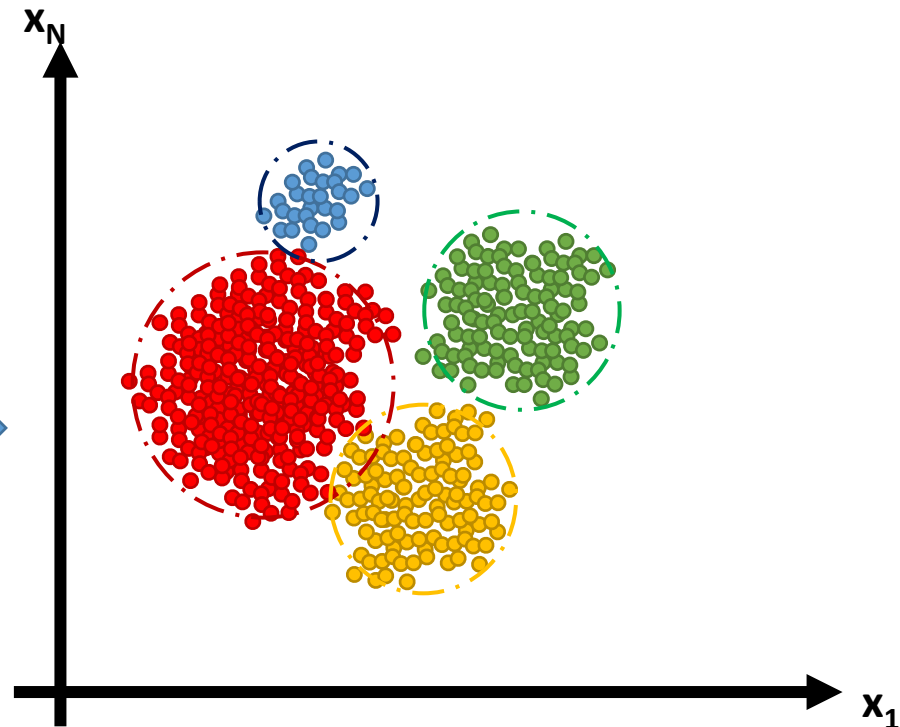
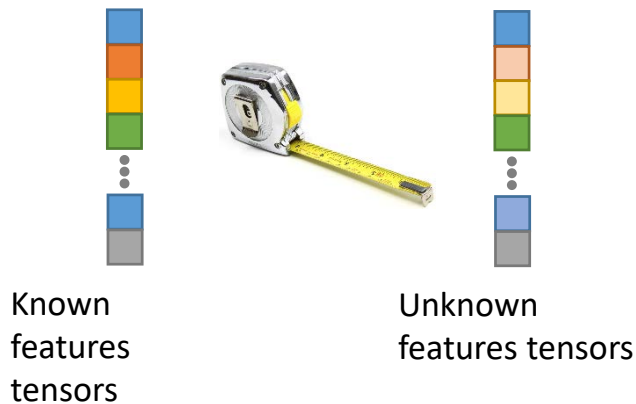


The same pre-trained NN will be used for the generation of the features tensors of the unknown miRNA held in the online databases.



A.I. for miRNA scouting

The miRNAs of interest will be selected by measuring the Euclidean distance between the known and unknown features tensors. The expected behaviour is to find classes of miRNA presenting the closest distance respect to the others: these miRNAs should be responsible of the same tissue regeneration. A supervised control of the obtained results will be made in a post-processing phase and the experimental tests will validate the truthfulness of the identified miRNA.



Sensore diagnostico non invasivo

per patologie ossee e muscolo scheletriche associate alla gravità alterata, per identificazione di miRNA diagnostici specifici (**Biomarker**)

Individuazione e identificazione di miRNA specifici e selettivi, responsabili della modulazione di processi di rigenerazione e rimodellamento nel tessuto muscolo scheletrico e tessuto osseo

Studi *in vitro* di colture cellulari in condizioni fisiologiche e patologiche (simulate, sperimentali, campioni esperimenti spaziali)

Dipartimento di Scienze di Base e Applicate per l'Ingegneria

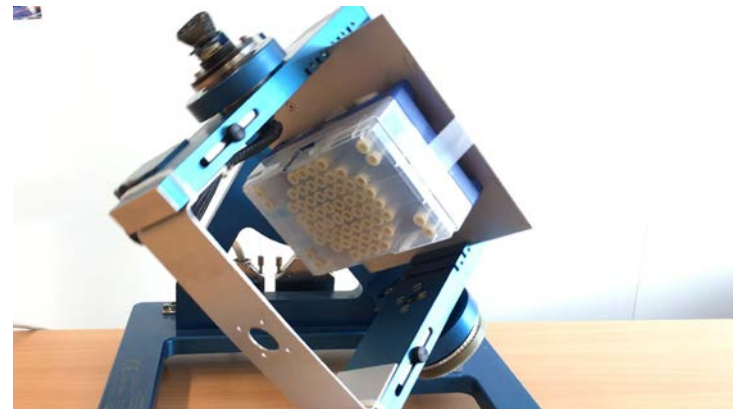
Università Sapienza, Roma
(Fraunhofer, IIT)



Dipartimento di Scienze Biochimiche

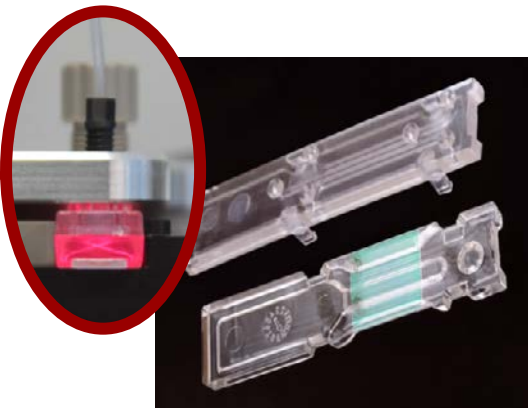
Università Sapienza, Roma

The Random Positioning Machine (RPM): a micro-gravity simulator



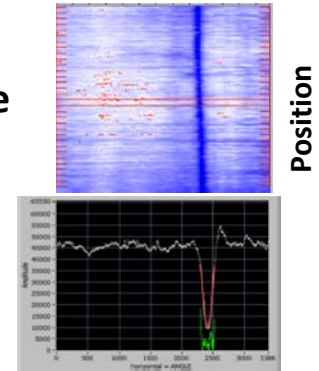


OPTICAL READOUT SYSTEMS: DESCRIPTION



Combined detection scheme

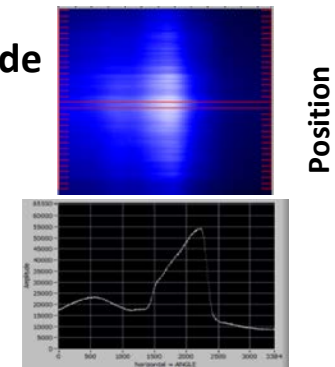
LF mode



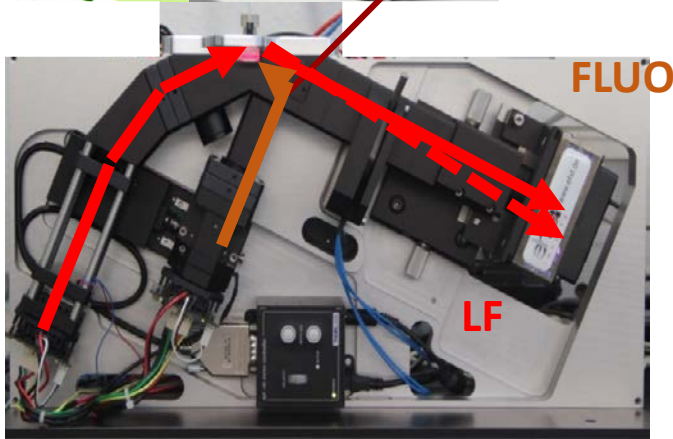
Position

Angle in substrate θ [deg]

FLUO mode

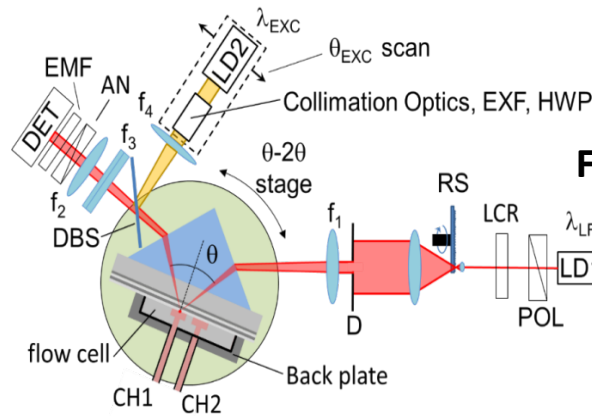


Position



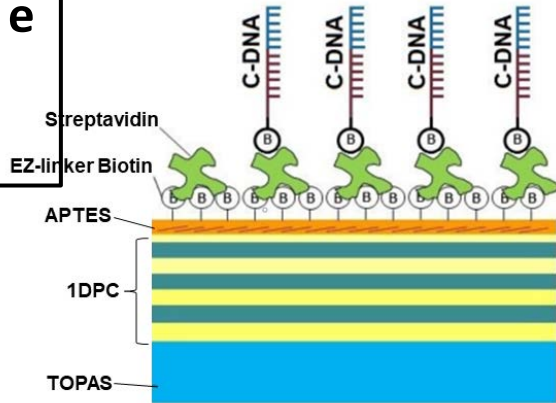
FLUO

LF



miRNA DETECTION FOR STROKE DIAGNOSIS

Bioconiugazione e chimica di superficie



miRNA sequences

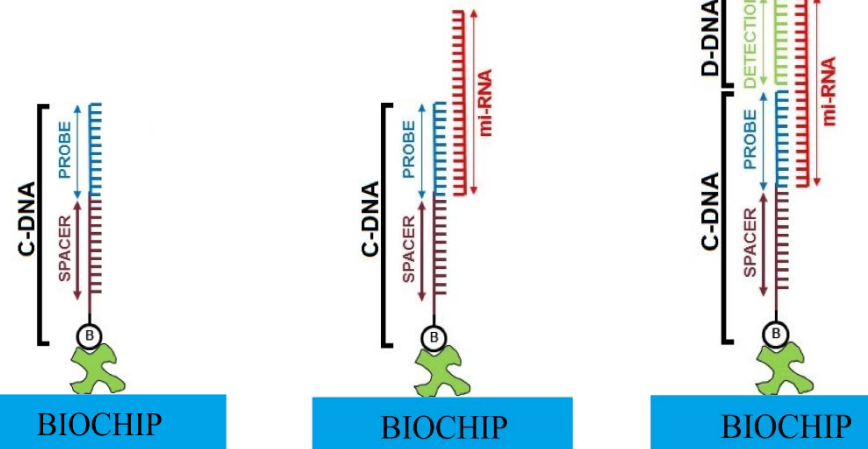
Hemorrhagic Stroke → **rno-miRNA-15-5p (target)**

5'- rGrCrG rGrUrU rArUrA rArArU rGrCrA rCrGrA rCrGrA rU -3'

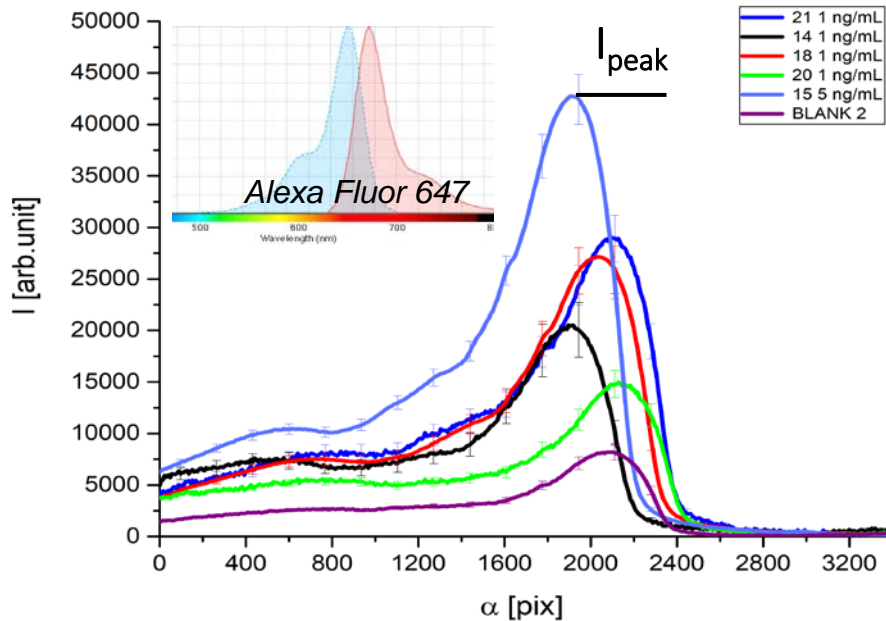
Ischemic Stroke → **rno-miRNA-101a-3p (non-target)**

5'- rArArG rUrCrA rArUrA rGrUrG rUrCrA rUrGrA rCrArU -3'

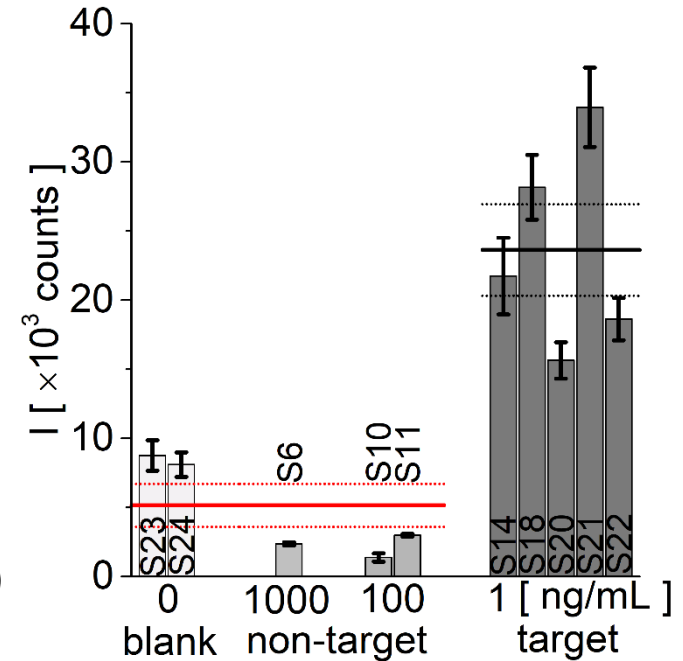
Assay format



miRNA DETECTION FOR STROKE DIAGNOSIS: FLUORESCENCE ASSAY



Fluorescence detection



RESULT Specific detection of miRNA in buffer solution (TE)

LoD = (0.67 ± 0.05) ng/mL = (95 ± 7) pM

Thank you for your attention

ENEA CR Frascati

Massimiliano Guarneri

Ilaria Petrignani

Laura Teodori

IBPM-CNR - Roma

Teresa Colombo

Dipartimento SBAI

Francesco Michelotti

Alberto Sinibaldi

Agostino Occhicone

P. Di Matteo

D. Chiappetta



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dipartimento Scienze
Biochimiche

Anna Scotto d'Abusco

Alessia Mariano

Roberta Chiaraluce