**PROGETTO DI RICERCA**

**L’emperipolesi dei neutrofili con i megacariociti come biomarker dell’inibizione di CXCR1/CXCR2 nel modello murino GATA1low di mielofibrosi.**

L’aumento di emperipolesi tra i megacariociti ed i neutrofili osservata sia nei pazienti con mielofibrosi che nel modello murino Gata1low (1,2) è stato suggerito come causa dell’accumulo di TGFbeta nel microambiente midollare che induce la fibrosi midollare associata a questa patologia (3). E’ stato ipotizzato che il meccanismo che aumenta l’emperipolesi tra queste due popolazioni è rappresentato dall’aumenta espressione della P-selettina, una proteina che facilita l’adesione dei neutrofili, sulla superfice delle cellule. Tuttavia, l’emperipolesi tra queste due cellule potrebbe essere anche favorita dal rilascio da parte dei megacariociti di CXCL1/IL-8 una citochina pro-infiammatoria che esercita un’azione chemiotattica concentrazione dipendente sui neutrofili stimolandone la nettosi (4). Per testare questa ipotesi, si vorrà operare con osservazioni al microscopio confocale impiegando gli anticorpi CD42 (cat# 183345 Abcam) e Ly6 (cat# 25377, Abcam) controcolorate con Hoechst per evidenziare il nucleo delle cellule, per valutare se megacariociti del midollo di soggetti Gata1low contengono neutrofili nel loro citoplasma (emperipolesi) e se questo fenomeno è ridotto dall’inibizione di CXCR2/CXCR1 impiegando tessuti di soggetti trattati con somministrazione di inibitori di CXCR2/CXCR1.

L’emperipolesi tra megacariociti e neutrofili è stata ipotizzata essere responsabile dell’attivazione delle piastrine che aumenta la frequenza di eventi trombotici nelle malattie mieloproliferative (5) e ciò è confermato anche dalla propensione dei topi Gata1low a formare trombi in molti organi (6). Il fatto che la delezione del gene della P-selettina che riduce l’interazione tra i megacarioci ed i neutrofili, riduce gli eventi trombotici nei topi Gata1low supporta l’ipotesi che l’evento è iniziato dall’emperipolesi tra queste cellule (6). Ulteriore supporto per questa ipotesi sarà il contributo del presente progetto nella genesi di dati a dimostrazione della eventuale variazione di frequenza della trombosi nei topi Gata1low trattati con inibitori di CXCR2/CXCR1.

1. Schmitt et al., *Blood.* 2000;96:1342-1347.
2. Centurione et al., Blood 2004;104:3573-9.
3. Ceglia et al., I, Exp Haematology; 2016; 44:1138-1155.
4. Teijera et al Eur J Immunol 2021. 51: 2274–2280
5. Hasselbalch et al., 2021 Apr 22;137(16):2152-2160
6. Zetterberg et al., Platelets. 2014;25(7):539-47.

**PIANO DI ATTIVITA’**

1. Primi 4 mesi: gestione della parte sperimentale presso lo stabulario dell’Istituto Superiore di Sanità a Roma dove è stata autorizzata la sperimentazione.

E’ richiesta una formazione di base sulla gestione di animali in sperimentazione.

1. Successivi 6 mesi: tecniche immunoistochimiche di preparazione ed osservazione con microscopio confocale per raggiungere autonomia nella:
   1. preparazione delle sezioni
   2. osservazione in autonomia al microscopio
   3. interpretazione dei risultati

E’ richiesta una formazione di base preliminare sull’istologia del midollo osseo nel topo.

1. Successivi 2 mesi: tecniche istochimiche per oggettivare la presenza di trombi nel polmone, fegato e cuore.
   1. L’attività formative prevede l’acquisizione di competenze per l’impiego di analisi di imagine finalizzata a quantificare il fenomeno nei tessuti.

E’ richiesta una formazione di base sull’istologia di polmone, cuore e fegato di topo.