

Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

CONSORZIO INTERUNIVERSITARIO

VIII CONVEGNO NAZIONALE

SU

SCIENZE DELLA VITA

ROMA, 23-24 OTTOBRE 2008

CNR

ABSTRACT DELLE COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Sessione "Medicina di Genere"

AZIONE MOLECOLARE DI MODULATORI EPIGENETICI NEI TUMORI

Lucia Altucci

Dipartimento di Patologia generale, Seconda Università degli studi di Napoli, Vico L. de Crecchio 7, 80138, Napoli, IT - Tel.0815667569; Fax 0812144840; lucia.altucci@unina2.it

I meccanismi epigenetici come la metilazione del DNA, le modifiche istoniche post-traduzionali, il rimodellamento dei nucleosomi contribuiscono alla regolazione dell'espressione genica e determinano la specificità cellulare e tessutale. La de-regolazione di questi meccanismi contribuisce insieme alle alterazioni genetiche alla genesi e alla progressione di tumori. L'uso di farmaci epigenetici, come gli inibitori delle istone deacetilasi (HDACi), correntemente utilizzati in terapie anticancro per la loro attività antiproliferativa, pro-apoptotica e differenziativa, può rappresentare una nuova frontiera nella medicina oncologica. Il nostro studio, percio', si è concentrato sulla comprensione dei meccanismi molecolari che sottintendono all'effetto dell'azione di inibitori delle istone deacetilasi in cellule tumorali.

Il nostro approccio sperimentale ha seguito sia uno studio di trascrittoma che di profilo di miRNA. Infatti, recenti evidenze hanno suggerito una forte relazione con l'espressione di piccoli RNA non

Pushs

Oroshs

Asymmetric milities

Asymmetric milities

The ill

Translational repression

PMCpppG

Off

Translational repression

Complementarity

Complementarity

AAAAA

Translational repression

Complementarity

AAAAA

Translational repression

Fig.1 Rappresentazione schematica della biosintesi dei miRNA e dei loro processo di silenziamento genico. Nature Review Cancer.2005.

codificanti, i microRNA (miRNA).

I miRNA sono molecole di RNA di ≈22 nucleotidi (nt) capaci di modulare l'espressione genica a livello posttrascrizionale. Conservati molti organismi (inclusi vertebrati, invertebrati e piante), i miRNA sono coinvolti in numerosi processi biologici quali regolazione del ciclo cellulare, il differenziamento. il metabolismo,

l'apoptosi e la senescenza. La loro espressione risulta tessuto specifica e fortemente dipendente dalla linea e dallo fase dello sviluppo cellulare. Il ruolo dei miRNA in vari processi patologici, incluso il cancro come oncogeni o oncosoppressori (oncomiRNA), ha aperto la strada alla possibile applicazione nella diagnosi e prognosi molecolare. Alcuni miRNA sono regolati o regolano alterazioni epigenetiche nelle cellule cancerose.

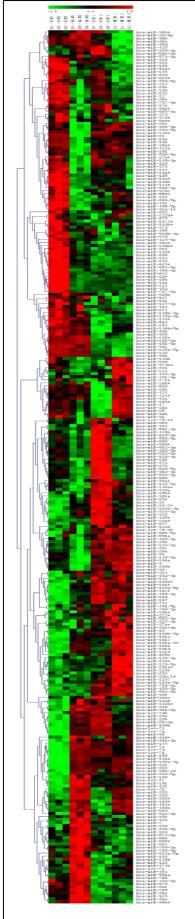


Fig.2 Bit map dell'analisi della varianza (ANOVA) sui profili di espressione dei miRNA delle linee cellulari di controllo. p<0.1

A partire da tali evidenze, il nostro studio è finalizzato alla comprensione dei profili di espressione dei miRNA in differenti linee cellulari di controllo e trattate con HDACi, comparando quest'ultimi con i profili di espressione genica (trascrittoma) al fine di individuare specifici miRNA che possano fungere da bersaglio nella terapia anticanero.

Ogni linea cellulare è stata trattata con l'Acido Idrossamico Suberoilanilide (SAHA), un HDACi utilizzato in molti *clinical trials* nel trattamento di tumori solidi ed ematologici ed approvato per la terapia di seconda linea nel CTCL.

A 6 ore dalla somministrazione si è proceduto con l'estrazione dei miRNA e dell'mRNA. I campioni trattati e di controllo sono stati analizzati per microarray. I profili di espressione dei miRNA (≈ 873 miRNA) sono stati esaminati e, mediante opportuni *software* di predizione dei *target* (miRBase, miRanda e Target scan), si è proceduto alla comparazione con quelli di espressione genica al fine di individuare specifici miRNA e i relativi *targets* coinvolti nella cancerogenesi nonché nei meccanismi epigenetici alla base della iniziazione e progressione tumorale.

Sono in corso esperimenti di validazione dei risultati dei *microarray* mediante RT-PCR quantitativa.

I risultati mostrano variabilità nei profili di espressione di base dei miRNA, presenza di un discreto gruppo di miRNA che accomunano le differenti linee ed una significativa alterazione dei profili di espressione dei miRNA in seguito al trattamento con SAHA. I dati ottenuti sono sottoposti ad approfondimenti e si prevedono analisi su campioni di pazienti e su cellule staminali, al fine di meglio comprendere il ruolo di miRNA nel differenziamento, proliferazione e apoptosi, processi la cui alterazione è alla base della cancerogenesi.

REFERENZE

- 1. Johnstone, R.W. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287-299 (2002).
- 2. Nebbioso, A., *et al.* Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med* 11, 77-84 (2005).

- 3. Mai A, Cheng D, Bedford MT, Valente S, Nebbioso A, Perrone A, Brosch G, Sbardella G, De Bellis F, Miceli M, Altucci L. Epigenetic multiple ligands: mixed histone/protein methyltransferase, acetyltransferase, and class III deacetylase (sirtuin) inhibitors. J Med Chem. 2008 Apr 10;51(7):2279-90. Epub 2008 Mar 19.
- 4. Manzo F, Nebbioso A, Miceli M, Conte M, De Bellis F, Carafa V, Franci G, Tambaro FP, Altucci L. TNF-related apoptosis-inducing ligand: Signalling of a 'smart' molecule. Int J Biochem Cell Biol. 2007 Dec 28. [Epub ahead of print]
- 5. Altucci L, Balducci L, Irminger-Finger I. Cancer therapy: new drugs are emerging based on molecular targeting but still many challenges. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(7-8):1278-9.

FINANZIAMENTI PER LA RICERCA

MIUR (PRIN2006);

EU: EPITRON, APO-SYS, CANCER-DIP;

Regione Campania L.5 annualità 2005

IL CONSUMO DI CANNABINOIDI DURANTE LA GRAVIDANZA E/O L'ALLATTAMENTO PRODUCE SOTTILI ALTERAZIONI NEUROFUNZIONALI NELLA PROGENIE

Silvana Gaetani e Vincenzo Cuomo Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "V. Erspamer", Sapienza Università di Roma

L'uso di droghe è uno dei problemi socio-sanitari più allarmanti per la gravità degli effetti nocivi sulla salute. Un aspetto certamente preoccupante sul piano medico, e non meno inquietante su quello etico, è rappresentato dal fenomeno dell'assunzione di sostanze di abuso durante la gravidanza che espone l'embrione e/o il feto all'azione tossica di tali composti.

L'entità e la diffusione del fenomeno da un lato spingono le autorità competenti a garantire una sempre più ampia diffusione dell'educazione sanitaria e una sempre più capillare presenza sul territorio di strutture in grado di fornire assistenza sociale e consulenza psicologica per donne tossicodipendenti; dall'altra fungono da stimolo affinché il progresso delle conoscenze possa condurre a una comprensione dei meccanismi fisiopatologici che sottendono le alterazioni, il più delle volte "subdole", prodotte dall'esposizione prenatale a varie sostanze di abuso. Ciò al fine di poterne prevenire o mitigare gli effetti dannosi sul prodotto del concepimento.

Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori, dapprima focalizzata essenzialmente sullo studio degli effetti del fumo di tabacco e dell'assunzione di alcool o eroina durante la gravidanza, si è allargata alla valutazione delle conseguenze dell'utilizzazione di altre sostanze di abuso come le amfetamine, i "designer drugs" ed i derivati della cannabis.

La complessità dei fenomeni studiati ha richiesto che, accanto alle indagini epidemiologiche e cliniche, si sviluppassero linee di ricerca condotte nell'animale da laboratorio.

L'utilità di tali modelli sperimentali deriva dalla possibilità di valutare l'impatto di ciascuna delle innumerevoli variabili presenti negli studi clinici, quali il dosaggio, il numero delle sostanze di volta in volta utilizzate, il periodo e la durata dell'assunzione, gli effetti sul comportamento materno, etc.

Per quanto lo sviluppo del prodotto del concepimento, il metabolismo dei composti utilizzati o il "pattern" d'uso caratteristici della specie umana non siano direttamente trasferibili all'animale da esperimento, pur tuttavia le informazioni ottenibili da questi modelli di studio (Costa et al., 2004) sono di primaria importanza per comprendere i meccanismi biologici che sottendono le azioni delle sostanze di abuso e per concepire strategie di intervento sull'uomo.

La marijuana e l'hashish, le preparazioni più note della cannabis, sono sostanze di uso ricreazionale largamente abusate dalle donne in gravidanza nei paesi occidentali. Una recente osservazione ha confermato che almeno il 18% delle donne in età fertile dichiarava di aver fatto uso di derivati della cannabis nel mese precedente all'indagine.

Purtroppo non sono numerosi gli studi epidemiologici e clinici sugli effetti dell'esposizione prenatale a derivati della cannabis e, pertanto, la paucità dei dati non consente di trarre conclusioni definitive. La scarsità del numero delle indagini deriva, molto verosimilmente, anche dalla convinzione, largamente condivisa, che considera i prodotti della canapa sostanze caratterizzate da una trascurabile tossicità. Tuttavia, l'osservazione che tali sostanze sono in grado sia di attraversare la barriera placentare che di passare nel latte (Fernandez-Ruiz et al. 2004; Hutchings et al. 1989; Jakubovic et al. 1977) suggerisce l'ipotesi che esse abbiano la possibilità di accumularsi in quantità significative in aree critiche del sistema nervoso centrale, interferendo con i processi dello sviluppo neurologico e psichico. I dati disponibili attualmente evidenziano l'esistenza di una diretta correlazione tra entità del consumo di derivati della cannabis in gravidanza e l'incidenza di alterazioni neurocomportamentali nel bambino, mentre negano l'esistenza di una maggiore mortalità nei primi due anni di vita, come suggerito da precedenti osservazioni epidemiologiche (Fried and Watkinson 1988; Fried and Watkinson 1990; Fried et al. 1992a; Fried et al. 1992b; Fried and Smith 2001). Mentre alla nascita possono essere presenti tremori ed una ridotta capacità a tollerare gli stimoli visivi, è con il procedere della crescita che meglio si delineano i disturbi neurocomportamentali. A 3 anni di vita sono stati evidenziati ritardi dello sviluppo del linguaggio e disturbi del pattern del sonno, mentre a 4 anni sono state descritte le seguenti alterazioni: ridotta capacità in test di percezione visiva, disturbi della memoria e dell'attenzione, alterazioni neuropsicologiche che esprimono difficoltà di integrazione (Day et al. 1994, Fried 2002a; Fried 2002b; Fried et al. 2003).

Le indagini condotte in animali da esperimento (roditori) suggeriscono che l'esposizione in utero a cannabinoidi induce "sottili" modificazioni neurocomportamentali che possono talvolta essere evidenziate da "challenges" farmacologiche ed ambientali. In particolare, sono state evidenziate alterazioni reversibili dell'ontogenesi dell'attività locomotoria spontanea e del comportamento esplorativo, disturbi anche permanenti nelle risposte comportamentali in presenza di situazioni nuove nonché anomalie nelle interazioni sociali. Alcuni di questi disturbi risultano criticamente dipendenti dalla dose e dal sesso dell'animale (Navarro et al. 1995). Recenti studi del nostro gruppo (Mereu et al. 2003; Antonelli et al. 2004; Antonelli et al., 2005; Antonelli et al. 2006; Castaldo et al. 2007) hanno, inoltre, contribuito a chiarire il meccanismo responsabile di alterazioni cognitive prodotte nella progenie dall'esposizione prenatale a cannabinoidi. In tali studi sono stati analizzati gli effetti sulla funzione cognitiva della progenie di ratte esposte durante la gravidanza ad un agonista dei recettori cannabinoidi CB1 (WIN 55,212–2) a dosi (0.5 mg/Kg dal 5° al 20° giorno di gestazione) che non producono malformazioni e/o una sintomatologia neurotossica manifesta. I risultati hanno messo in evidenza che la somministrazione di WIN 55,212-2 (WIN) causa

iperattività motoria nelle prime fasi di vita postnatale ed induce alterazioni a lungo termine delle capacità di ritenzione di un programma di evitamento attivo e passivo. Le alterazioni della memoria, non attribuibili a fattori di natura non associativa, sono correlate a modificazioni della long term potentiation (LTP) e del rilascio di glutammato nell'ippocampo. In particolare, studi elettrofisiologici hanno evidenziato, nella progenie di ratte trattate con WIN durante la gestazione, una significativa riduzione della fase di mantenimento della LTP in assenza di modificazioni dell'eccitabilità sinaptica basale e dell'induzione della LTP. Studi neurochimici in vitro e in vivo hanno, inoltre, dimostrato che il trattamento prenatale con WIN produce una significativa riduzione del rilascio basale e stimolato (K+) di glutammato nell'ippocampo di ratti di 1, 40 e 90 giorni di vita. Questi risultati suggeriscono che il ridotto rilascio di glutammato potrebbe essere responsabile delle alterazioni della LTP che a loro volta rappresenterebbero il substrato neuronale del deficit delle funzioni mnesiche causato dalla somministrazione dell'agonista dei recettori cannabinoidi durante la vita prenatale.

Bibliografia

- Antonelli T, Tanganelli S, Tomasini MC, Finetti S, Trabace L, Steardo L, Sabino V, Carratu MR, Cuomo V, Ferraro L. Long-term effects on cortical glutamate release induced by prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist (R)-(+)-[2,3-dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinyl-methyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone: an in vivo microdialysis study in the awake rat. Neuroscience. 2004, 124(2):367-75.
- Antonelli T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Finetti S, Mazzoni E, Trabace L, Carratù MR, Cuomo V, Tanganelli S, Ferraro L. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and carbon monoxide reduces extracellular glutamate levels in primary rat cerebral cortex cell cultures. Neurochem Int. 2006, 49(6):568-76.
- Antonelli T, Tomasini MC, Tattoli M, Cassano T, Tanganelli S, Finetti S, Mazzoni E, Trabace L, Steardo L, Cuomo V, Ferraro L. Prenatal exposure to the CB1 receptor agonist WIN 55,212-2 causes learning disruption associated with impaired cortical NMDA receptor function and emotional reactivity changes in rat offspring. Cereb Cortex. 2005, 15(12):2013-20.
- Castaldo P, Magi S, Gaetani S, Cassano T, Ferraro L, Antonelli T, Amoroso S, Cuomo V. Prenatal exposure to the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 increases glutamate uptake through overexpression of GLT1 and EAAC1 glutamate transporter subtypes in rat frontal cerebral cortex. Neuropharmacology. 2007, 53(3):369-78
- Costa LG, Steardo L, Cuomo V. Structural effects and neurofunctional sequelae of developmental exposure to psychotherapeutic drugs: experimental and clinical aspects. Pharmacol Rev 2004, 56(1):103-47
- Day NL, Richardson GA, Goldschmidt L, Robles N, Taylor PM, Stoffer DS, Cornelius MD, Geva D. Effects of prenatal marijuana exposure on the cognitive development of offspring at age three. Neurotoxicol Teratol 1994, 16: 169-175.
- Fernandez-Ruiz J, Gomez M, Hernandez M, de Miguel R, Ramos JA (2004) Cannabinoids and gene expression during brain development. Neurotox Res 6: 389-401

- Fried PA, O'Connell CM, Watkinson B. 60- and 72-month follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes, and alcohol: cognitive and language assessment. J Dev Behav Pediatr. 1992a, 13(6):383-91.
- Fried PA, Watkinson B. 12- and 24-month neurobehavioral follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes and alcohol. Neurotoxicol Teratol 1988, 10: 305-313.
- Fried PA, Watkinson B, Gray R. A follow-up study of attentional behavior in 6-year-old children exposed prenatally to marihuana, cigarettes, and alcohol. Neurotoxicol Teratol. 1992b, 14(5):299-311.
- Fried PA, Watkinson B. 36- and 48-month neurobehavioral follow-up of children prenatally exposed to marijuana, cigarettes and alcohol. J Dev Behav Pediatr 1990, 11: 49-58
- Fried PA (2002a) Adolescents prenatally exposed to marijuana: examination of facets of complex behaviors and comparisons with the influence of in utero cigarettes. J Clin Pharmacol 42: 97S-102S
- Fried PA (2002b) Conceptual issues in behavioral teratology and their application in determining long-term sequelae of prenatal marihuana exposure. J Child Psychol Psychiatry 43: 81-102
- Fried PA, Smith AM (2001) A literature review of the consequences of prenatal marihuana exposure. An emerging theme of a deficiency in aspects of executive function. Neurotoxicol Teratol 23: 1-11
- Fried PA, Watkinson B, Gray R (2003) Differential effects on cognitive functioning in 13- to 16-year-olds prenatally exposed to cigarettes and marihuana. Neurotoxicol Teratol 25: 427-36
- Hutchings DE, Martin BR, Gamagaris Z, Miller N, Fico T (1989) Plasma concentrations of delta-9-tetrahydrocannabinol in dams and fetuses following acute or multiple prenatal dosing in rats. Life Sci 44: 697-701
- Jakubovic A, Hattori T, McGeer PL (1977) Radiactivity in suckled rats after giving 14C-tetrahydrocannabinol to the mother. Eur J Pharmacol 22: 221-223
- Mereu G, Fa M, Ferraro L, Cagiano R, Antonelli T, Tattoli M, Ghiglieri V, Tanganelli S, Gessa GL, Cuomo V (2003)

 Prenatal exposure to a cannabinoid agonist produces memory deficits linked to dysfunction in hippocampal long-term potentiation and glutamate release. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 4915-20
- Navarro M, Rubio P, Rodriguez de Fonseca F. Behavioral consequences of maternal exposure to natural cannabinoids in rats. Psychopharmacology 1995, 122:1-15.

IL GENERE REGOLA LO STATO REDOX ED IL DESTINO CELLULARE DELLE CELLULE MUSCOLARI LISCE VASALI (VSMC)

Flavia Franconi*, Elisabetta Straface+, Paola Matarrese+, Barbara Ascione+, Rita Coinu*; Silvia Canu*, Annalisa Romani°, Paola Galluzzo^, Maria Marino^, Walter Malorni+

- (*) University of Sassari-INBB Osilo-Sassari, Department of Pharmacology, University of Sassari, Sassari, Italy
- (+)Department of Drug Research and Evaluation, Istituto Superiore di Sanita', Rome, Italy
- (^) Department of Biology, University Roma Tre, Roma
- (°) Department of Pharmaceutical Science, University of Florence, Sesto F.no (FI), Italy

La ricerca sistematica di genere è iniziata negli anni 90 del secolo scorso anche se le prime differenze erano emerse nella prima metà del 900. Un campo dove le differenze di genere sono particolarmente significative è quello cardiovascolare (Pilote et al, 2007; Hirakawa et al, 2007) tanto che sono state stese linee guida e raccomandazioni dedicate alla donna (Mosca et al, 2007). In particolare, differenze di genere significative si sono riscontrate nelle malattie coronariche, nell'ictus, nell'ipertensione arteriosa ecc. Per quanto riguarda l'ipertensione arteriosa, le prime differenze di genere sono state descritte nel lontano 1913 (Janeway, 1913) e sono state successivamente confermate sia in campo clinico che sperimentale (Reckelhoff, 2001; Lopez-Ruiz et al, 2008). Differenze di genere sono state descritte a livello del sistema renina-angiotensina e dell'endoteline (Sullivan et al, 2008). Infatti nei ratti deficienti del recettore dell'entotelina sottotipo B (ET_B) si osserva che la dieta ricca di sale produce un aumento della pressione arteriosa maggiore nei maschi rispetto a quanto avviene nelle femmine (Taylor et al, 2003).

Le differenze di genere non coinvolgono solo gli agenti con attività vasocostrittrice, ma si estendono anche ad agenti con attività vasodilatante come il fattore natriueretico atriale C che svolge una maggiore attività a livello delle coronarie femminili in confronto a quelle maschili (Villar et al, 2008), il nitrossido, la prostaciclina e il fattore iperpolarizzante endoteliale (EDHF). I primi due svolgono un ruolo preminente nel sesso maschile rispetto a quello femminile mentre una situazione opposta si realizza con il EDHF (Villar et al, 2008). Questo stato di fatto è confermato anche da studi con animali knockout; infatti i topi deficienti in NO-sintetasi e ciclossigenasi-1 (eNOS/COX-1) sviluppano ipertensione solo se di sesso maschile, essendo i maschi anche insensibili alla bradichinina (Villar et al, 2008). Altre differenze di genere implicano prodotti della cascata dell'acido arachidonico, come quelle indotte dagli epossieicosatrienoici e l' EDHF (Villar et al, 2008).

A questo punto è importante sottolineare che sia l'angiotensina II che l'endotelina promuovono la produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e quindi alterano il sistema redox (Fortuno et al, 2005) e le sue alterazioni giocano un ruolo centrale nell' ipertensione arteriosa sia sperimentale che clinica (Lopez-Ruiz et al, 2008). Lo stato redox delle VSMC è fortemente controllato dal sesso, essendo in generale maggiore nei maschi che nelle femmine (reviewed in Malorni et al, 2007;

Brandes and Mugge, 1997; Dantas et al, 2004; Malorni et al, 2008). In effetti differenze di genere sono state osservate sia nei meccanismi di produzione dei ROS (Lacy et al, 2000; Malorni et al, 2008) che nei sistemi antiossidanti (Malorni et al, 2007; 2008). Infatti la superossido dismutasi (SOD) è in genere più espressa nelle femmine (Barp et al, 2002; Malorni et al, 2007; Azevedo et al, 2001; Malorni et al, 2008). A questo proposito, ricordiamo che il tono miogenico è generalmente più basso nei topi femmina che nei topi maschi, ma tale differenza scompare nei topi privi di SOD, confermando ulteriormente l' importanza del tono redox nel controllo della pressione arteriosa (Veerareddy et al, 2004).

L'importanza del genere nello stato redox è confermata anche dalla differente risposta, almeno a livello sperimentale, dei ratti maschi e femmine ad alcuni antiossidanti. Infatti, solo nei ratti maschi si osserva una riduzione della pressione in seguito a somministrazione di antiossidati come il tempol, l'apocinina e l'ebselen (Lopez-Ruiz et al, 2008). Mentre le vitamine C ed E riducono la pressione nelle femmine ma non nei maschi indicando una possibile specificità di genere nella risposta agli antiossidanti (Sartori-Valinotti et al, 2007; Lopez-Ruiz et al, 2008).

Con queste premesse ci è sembrato importante indagare se cellule importanti per il controllo della pressione arteriosa ed anche per i processi aterosclerotici (Ross, 1990) come le VSMC, provenienti dalla aorta di ratti adulti maschi e femmine, differiscono nel controllo dello stato redox sia in condizioni basali che dopo stress ossidativo e se ciò può avere ripercussioni sul destino cellulare. Inoltre è stato analizzato se una miscela di composti derivati dall'olio extravergine di oliva che posseggono una forte attività antiossidante e che interferiscono con NF-kB (Franconi et al, 2006; Brunelleschi et al, 2007) fosse in grado di interagire in maniera genere-specifica con queste cellule. Le cellule sono state isolate dall'aorta toracica di ratti maschi e femmine come descritto in Coinu et al (2006) e mantenute in coltura come descritto precedentemente (Malorni et al, 2008). I metodi impiegati sono stati già descritti in precedenza (Malorni et al, 2008).

Le cellule maschili e femminili sono state caratterizzate per quanto riguarda l'espressione dei recettori degli estrogeni sia di tipo alfa che beta e per quella del recettore degli androgeni. Entrambi i tipi di cellula esprimono tutti i recettori studiati, in particolare non si notano differenze per quanto riguarda il recettore degli androgeni e per il recettore alfa degli estrogeni, mentre quello beta è più espresso nelle cellule di origine maschile. Importantemente, tale differenza di genere scompare dopo il 14° passaggio per cui gli esperimenti che andiamo ad illustrare sono stati ottenuti con cellule che non superano l'ottavo passaggio.

In condizioni basali, le VSMC producono O_2^- e H_2O_2 e tale produzione è significativamente maggiore nei maschi rispetto alle femmine, essendo la differenza più evidente con l'anione superossido. Per quanto riguarda i meccanismi difensivi sono stati indagati i livelli di glutatione

ridotto (GSH) e l'attività della SOD e della catalasi. I livelli di GSH sono significativamente più bassi nei maschi in confronto con quelli femminili, come l' attività della SOD e della catalasi. Il fenomeno è soprattutto evidente per quanto riguarda l'attività della catalasi che è più alta nelle cellule femminili di 5-6 volte rispetto a quelle maschili. Questi dati suggeriscono una maggiore vulnerabilità delle cellule maschili in confronto a quelle femminili per quanto riguarda lo stress ossidativo. Tale interpretazione trova conferma nel dosaggio di un indice della perossidazione lipidica: il 4-idrossineonale (4-HNE) che è significativamente maggiore nelle cellule maschili rispetto a quelle femminili.

Il citoscheletro, meglio l'actina, non appare significativamente diversa nelle cellule che provengono dai maschi e dalle femmine. Visto che i ROS giocano un ruolo chiave nei processi apoptotici si è esaminato tale fenomeno in entrambi i tipi cellulari. Dall'analisi appare che le cellule maschili sono più prone all'apoptosi di quelle femminili, mentre quelle femminili vanno più facilmente incontro a processi di senescenza (misurata come nuclei eterocromatinici e beta-galactosidasi). Importantemente, la deplezione del GSH porta ad un incremento molto marcato dell'apoptosi nelle cellule femminili.

Si è poi proceduto all'analisi dell'effetto di una miscela di composti polari minori ottenuti da olio d'oliva toscano attraverso una serie di processi per allontanare la parte lipidica (ivi compresa la vitamina E) come descritto in Brunelleschi et al (2007). La caratterizzazione degli estratti evidenzia che i leader compound sono rappresentati dal tirosolo, oleocantale, deacetossi-oleuropeina aglicone, e i derivati secoiridoidi.

Il trattamento delle cellule con tali estratti di olio extravergine di oliva non modifica la produzione di perossido d'idrogeno e di anione superossido, mentre l'esposizione delle cellule femminili all'estratto d'olio d'oliva porta ad un incremento significativo del GSH. I prodotti della lipoperossidazione lipidica risultano variati solo nelle cellule maschili dove il 4-HNE risulta significativamente ridotto.

Per quanto riguarda l'attività della SOD, della catalasi, dei processi apoptosi e di senescenza non si osserva nessuna variazione significativa in seguito all'esposizione ai derivati dell'olio così come per il citoscheletro nella sua componente actinica.

In considerazione del fatto che O_2^- e H_2O_2 sono importanti messaggeri intracellulari e che attivano numerose protein-chinasi (Griendling et al, 2000), incluse quelle importanti per la adesione cellulare come FAK (Mian et al, 2008; Mehdi et al, 2007; Gerthoffer, 2007), questa ultima è stata misurata ed essa risulta più espressa nelle cellule femminili che maschili e non variata dal trattamento con l'estratto di olio extravergine di oliva.

L'esposizione alle radiazioni ultraviolette (UVB) produce un aumento della generazione di O_2^- e H_2O_2 , del 4-HNE, una diminuzione del GSH e della attività della SOD e catalasi, ed alterazioni del citoscheletro e ciò avviene in maniera quantitativamente diversa se consideriamo il genere, essendo maggiore nelle cellule maschili con la sola eccezione della catalasi. Inoltre, si osserva che le cellule maschili sono più prone alla apoptosi mentre quelle femminili sono più esposte alla senescenza, mentre l'espressione della p-FAK in seguito all'UVB è ridotta solo nei maschi.

Il pre-trattamento con l'estratto di olio d'oliva prima dell'esposizione alle radiazioni UVB: 1) riduce leggermente la produzione di O_2^- e in maggior misura quella del H_2O_2 e la produzione di 4-HNE, le alterazioni del citoscheletrico nei maschi; mentre nelle femmine la produzione di O_2^- , H_2O_2 e 4-HNE ritorna praticamente ai valori osservati nelle cellule di controllo essendo anche maggiore l'effetto sul citoscheletro 2) la riduzione dei livelli di GSH, dell'attività della SOD e della catalasi è diminuita o abolita nelle VSMC ottenute da ratti femmine, mentre nelle VSMC ottenute da ratti maschi non si osservano variazioni significative dei livelli di GSH, mentre gli effetti sulla SOD e catalasi sono minori rispetto a quelli delle cellule femminile 3) si ha una diminuzione dei processi apoptotici e dei fenomeni di senescenza specialmente nelle cellule originate da ratti di sesso femminile. Infine, si osserva un importante effetto sulla p-FAK che nel sesso femminile supera notevolmente i valori di controllo, mentre nei maschi li ripristina.

Questi dati confermano ed estendono le differenze di genere sia in condizioni basali che dopo stimolazione con UVB, suggerendo anche che i composti polari minori dell'olio di oliva extravergine possono avere effetti diversi nei due generi e quindi importanti conseguenze.

Referenze

- Azevedo RB, Lacava ZG, Miyasaka CK, Chaves SB, Curi R. Braz J Med Biol Res. 34(5): 683-687, 2001
- Barp J, Araújo AS, Fernandes TR, Rigatto KV, Llesuy S, Belló-Klein A, Singal P. Braz J Med Biol Res. 35: 1075–1081, 2002.
- Brandes RP, Mugge A. Life Sci. 60: 391–396, 1997.
- Brunelleschi S, Bardelli C, Amoroso A, Gunella G, Ieri F, Romani A, Malorni W, Franconi F. Pharmacol Res. 56: 542-549, 2007.
- Carvalho MH. Cardiovasc Res. 61: 22–29, 2004.
- Coinu R, Carta S, Urgheghe PP, Mulinacci N, Pinelli P, Franconi F, Romani A. *Food Chem.* 101: 524, 2007.
- Dantas AP, Franco Mdo C, Silva-Antonialli MM, Tostes RC, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Cardiovasc Res. 61(1):22-29, 2004.
- Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G. Exp Physiol. 90(4): 457-462. 2005.
- Franconi F, Coinu R, Carta S, Urgheghe PP, Ieri F, Mulinacci N, Romani A. *Food Agr Chem.* 54: 3121-3125, 2006.
- Gerthoffer WT. Circulation Research. 100: 607-621, 2007.

- Griendling KK, Sorescu D, Lassègue B, Ushio-Fukai M. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(10): 2175-2183, 2000.
- Hirakawa Y, Masuda Y, Kuzuya M, Iguchi A, Kimata T, Uemura K. Intern Med. 46(7):363-366, 2007.
- J, Alamian A, Barnett T, Cox J, Ghali WA, Grace S, Hamet P, Ho T, Kirkland S, Janeway TC. *Arch Int Med.* 12: 755-798, 1913.
- Kim E. Chem Biol Interact. 171(1): 57-66, 2008.
- Lacy F, Kailasam MT, O'Connor DT, Schmid-Schönbein GW, Parmer RJ. Hypertension. 36: 878–884, 2000.
- Lambert M, Libersan D, O'Loughlin J, Paradis G, Petrovich M, Tagalakis V. CMAJ. 176(6):S1-44, 2007.
- Lopez-Ruiz A, Sartori-Valinotti J, Yanes LL, Iliescu R, Reckelhoff JF. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 295(2): H466-474, 2008.
- Malorni W, Campesi I, Straface E, Vella S, Franconi F. Antioxidants & Redox Signaling. 9: 1779-1801, 2007.
- Malorni W, Straface E, Matarrese P, Ascione B, Coinu R, Canu S, Galluzzo P, Marino M, Franconi F. FEBS lett. 582: 635-642, 2008.
- Mehdi MZ, Azar ZM, Srivastava AK. Cell Biochem Biophys. 47(1): 1-10, 2007.
- Mian MF, Kang C, Lee S, Choi JH, Bae SS, Kim SH, Kim YH, Ryu SH, Suh PG, Kim JS, Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, Rabi D, Tremblay Reckelhoff JF. *Hypertension*. 37: 1199-1208, 2001.
- Ross R. Adv Nephrol Necker Hosp. 19: 79-86, 1990
- Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Fortepiani LA, Yanes LL, Reckelhoff JF. Clin Exp Pharmacol Physiol. 34(9): 938-945, 2007.
- Sullivan JC. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 294(4): R1220-1226, 2008.
- Taylor TA, Gariepy CE, Pollock DM, Pollock JS. Hypertension.;41(3 Pt 2): 657-662, 2003.
- Veerareddy S, Cooke CL, Baker PN, Davidge ST. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 287(1): H40-45, 2004.
- Villar IC, Hobbs AJ, Ahluwalia A. *J Endocrinol*. 197(3): 447-462, 2008.

LA MEDICINA DI GENERE E LA MEDICINA DI COPPIA: PROPOSTE OPERATIVE

Mario Maggi

Unità di Medicina della Sessualità e Andrologia, Dipartimento di Biomedicina, AOUC Careggi

La diversità e l'unicità degli esseri umani si basa sull'incontro sessuato di individui di sesso opposto. Il fallimento parziale o totale di questo incontro dà luogo ad eventi patologici con caratteristiche molto diverse da quelli della nosografia medica classica, perché coinvolgono non il singolo individuo, ma la coppia di individui che si incontra. Essenzialmente la coppia può accusare un difetto riproduttivo, un difetto sessuale o entrambe. Già da molti anni la patologia riproduttiva viene affrontata in alcune realtà indagando simultaneamente la coppia da parte di una equipe di esperti. (ginecologo e andrologo-endocrinologo, a cui si affianca la consulenza dell'andrologo-urologo). L'equipe valuta collegialmente la problematica e disegna soluzioni terapeutiche appropriate. Questa strategia, oltre a esitare in un migliore intervento terapeutico, permette una maggiore e più rapida operatività, essenziale nei disturbi riproduttivi, che sempre più spesso sono accusati dalla coppia non più giovane.

La patologia della sessualità, pur avendo radici e ripercussioni in entrambe i membri della coppia, non viene quasi mai indagata nella sua interezza, ma i singoli componenti si rivolgono individualmente a figure sanitarie distinte, molto spesso non inter-comunicanti e, purtroppo, anche non facilmente identificabili. A volte i problemi della sessualità, non trovando l'alveo sanitario corretto in cui defluire, rimangono nell'ambito della coppia, entrano in risonanza e si amplificano in modo geometrico, proprio perché la coppia è costituita da due individui diversi, entrambe in sofferenza. La Medicina della Sessualità ha come oggetto la promozione della salute sessuale e, per quanto detto primo, come soggetto la coppia.

Parimenti alla coppia con patologia riproduttiva anche la coppia con patologia della sessualità deve essere valutata e trattata simultaneamente, sfruttando le diverse competenze mediche del caso. La Medicina della Sessualità ha inoltre come oggetto anche quelle situazioni in cui il concetto di identità sessuale contrasta con il sesso fenotipico (Disturbo di Identità di Genere), che viene, perciò, percepito come fonte di profondo disagio ed emarginazione.

La medicina specialistica ha il vantaggio di poter dare risposte sempre più competenti e approfondite ad aspetti particolari della scienza medica, ma ha anche il difetto di scotomizzare e quindi frammentare, a volte in modo eccessivo, l'unità dell'essere umano. Alcuni aspetti della Sanità devono recuperare l'unità della natura umana e quindi devono essere, per definizione, interdisciplinari o sovra-disciplinari.

Per esempio, il benessere sessuale prevede l'interazione di due corpi con barriere cutanee che si interdigitano (competenza dermatologica), perché il sistema nervoso centrale lo vuole (competenza

psico-neurologica), gli ormoni lo favoriscono (competenza endocrinologica) e gli organi sessuali lo permettono (competenza uro-ginecologica). Finchè la medicina della sessualità viene gestita da uno solo di questi specialisti, essa non potrà che cogliere gli aspetti parcellari, e quindi i frammenti, e mancare della sintesi che è il pre-requisito per il benessere totale.

L'intervento deve quindi essere coordinato in una rete di competenze specialistiche accomunate da:

- 1) <u>la finalità dell'intervento</u> (nel nostro esempio il benessere sessuale dell'individuo, ma soprattutto della coppia)
- 2) <u>le modalità dell'analisi della domanda (</u>l'uso di protocolli anamnestici-diagnostici strutturati e condivisi)
- 3) <u>la tipologia della risposta</u> (l'uso di protocolli terapeutici prestabiliti e condivisi).

Si calcola per esempio che circa un 20% della popolazione generale possa avere problemi che riguardano la Medicina della Sessualità, se anche solo un 10% volesse un ausilio medico, in Regione Toscana ci sarebbero circa 70.000 clienti. Per ovvie ragioni tutti questi clienti non possono convergere e essere accuditi da un singolo Centro di Eccellenza, ma c'è bisogno di delega sul territorio a Centri di II livello (specialistici) e di I livello (consultori).

DIFFERENZE DI GENERE NELLA TERAPIA DELLE MALATTIE CARDIOVASCOLARI

Francesco Rossi

Ordinario di Farmacologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Seconda Università di Napoli

Le malattie cardiovascolari sono, insieme al cancro e al diabete, tra le patologie croniche maggiormente responsabili di mortalità, morbilità e invalidità permanente negli Stati Uniti e in Europa (1). In Italia, esse sono responsabili del 42,5% di tutti i decessi. I principali fattori di rischio, correlati all'insorgenza di tali malattie, sono rappresentati da fattori non modificabili come età, sesso, familiarità e da fattori modificabili come ipercolesterolemia, ipertensione arteriosa, fumo, obesità, diabete mellito. Tali fattori sono diversamente implicati nello sviluppo delle malattie cardiovascolari nei due sessi (2). In diversi studi è stato messo in evidenza, infatti, che il diabete mellito e l'ipertensione arteriosa rappresentano fattori di rischio cardiovascolare più determinanti nelle donne rispetto agli uomini (3,4). L'insieme di questi fattori può, con vari meccanismi, determinare una alterata funzione endoteliale (5), differente tra i due sessi ed attualmente considerata l'evento più precoce nello sviluppo del processo aterosclerotico alla base delle malattie cardiovascolari (6).

L'aterosclerosi tende a manifestarsi in modo diverso e in tempi differenti nei due sessi. Nel sesso maschile la formazione della placca aterosclerotica inizia a rendersi evidente verso i 30 anni circa. Nella donna la formazione significativa delle placche ateromatose non ha inizio prima della menopausa. Si riscontra, inoltre, una differenza di eventi coronarici tra i due sessi; con prevalenza in quello maschile fino a 65 anni, nelle donne dopo i 65 anni (2).

La gestione dei fattori di rischio modificabili è un elemento importante per ottenere la massima riduzione del rischio cardiovascolare globale a lungo termine (riduzione di eventi cardiovascolari morbosi e mortali). Il trattamento farmacologico, pertanto, è orientato non solo al controllo della patologia predominante, come per esempio della pressione arteriosa con farmaci specifici (β-bloccanti, ACE-inibitori, antagonisti recettoriali dell'angiotensina II, inibitori della renina, diuretici, Ca⁺⁺ antagonisti), ma anche al trattamento di tutti i fattori di rischio reversibili identificati e ad una gestione appropriata delle condizioni cliniche associate.

In tale ottica di approccio terapeutico globale ai diversi fattori di rischio, riveste particolare rilevanza clinica il problema della variabilità individuale nella risposta ai farmaci, fenomeno per cui lo stesso farmaco può risultare in alcuni soggetti pienamente efficace, in altri scarsamente efficace o inefficace, in altri può determinare effetti tossici (7). Alla variabilità nella risposta interindividuale ai farmaci concorrono fattori di varia natura: fisiologici, patologici, ambientali e genetici. Anche il genere rappresenta un fattore importante di variabilità nella risposta ai farmaci. Tale variabilità può

essere di tipo farmacodinamico o di tipo farmacocinetico. Mentre pochi sono i dati sulla variabilità farmacodinamica, più numerose sono le evidenze che descrivono le caratteristiche della variabilità farmacocinetica. Tutte le fasi della farmacocinetica possono risentire della variabilità tra i due sessi. In particolare, si assiste ad una ridotta concentrazione plasmatica dei farmaci per via orale nella donna, dovuta ad una minore capacità di svuotamento gastrico e da tempi di transito intestinale più rapidi nelle donne rispetto agli uomini. Inoltre, i livelli di acidità gastrica, minori nelle donne rispetto agli uomini, possono comportare un diverso assorbimento dei farmaci. Pertanto, farmaci a pH tendenzialmente basico vengono assorbiti più rapidamente e raggiungono concentrazioni plasmatiche più elevate. Anche il volume di distribuzione risulta differente nei due sessi; le donne, infatti, hanno un minor peso corporeo, un ridotto volume ematico, ma una maggiore quantità di massa grassa (8). A livello del metabolismo vi sono differenze nell'espressione e nella funzione degli enzimi deputati a tale processo; alcuni enzimi, infatti, sono espressi in maniera sesso-specifica e tessuto-specifica e possono essere estrogeno-dipendenti (9). Il sistema microsomiale CYP450, di cui sono state identificate 18 famiglie di isoenzimi, è responsabile di importanti reazioni metaboliche. In particolare, nelle donne l'aumentata attività del CYP3A4 aumenta il metabolismo (20-30%) di alcuni farmaci cardiovascolari, come nifedipina e verapamil; al contrario una ridotta attività del CYP2D6 comporta un aumento della concentrazione plasmatica di metoprololo con aumentati effetti bradicardizzanti ed ipotensivi; la ridotta attività del CYP2C19 determina aumentata concentrazione plasmatica di propranololo (10, 11).

Molti dati sono stati prodotti relativamente alle differenze esistenti nella risposta ai farmaci nella terapia delle malattie cardiovascolari. Ad esempio, è stata effettuata un'analisi *post-hoc* dei dati dello studio LIFE (The Losartan Intervention For Endpoint Reduction in Hypertension). Tale trial ha confrontato l'effetto antipertensivo e la riduzione della morbilità e mortalità cardiovascolare in pazienti con ipertensione e ipertrofia ventricolare sinistra, in terapia con losartan, un antagonista recettoriale dell'angiotensina II, oppure con atenololo, un antagonista selettivo dei recettori β₁-adrenergici (12). L'analisi *post-hoc* ha messo in evidenza che le donne hanno manifestato più eventi avversi a farmaci rispetto agli uomini, ma meno gravi. Gli eventi avversi erano più frequenti nel gruppo di donne trattate con atenololo rispetto al gruppo losartan (43,8% vs 37,3%) (13).

Risultati simili erano già stati messi in evidenza in altri studi e si ritiene che alcuni farmaci antipertensivi abbiano un profilo di tollerabilità genere—specifici. Ad esempio, nello studio TOMHS (Treatment of Mild Hypertension Study), condotto su 902 pazienti, trattati con clortalidone, acebutololo, doxazosina, amlodipina, enalapril o placebo, le donne hanno manifestato un numero di eventi avversi doppio rispetto agli uomini (14). La terapia con farmaci diuretici ha messo in evidenza una maggiore insorgenza di iponatriemia e ipokaliemia nelle donne rispetto agli uomini,

che hanno manifestato più frequentemente gotta (15). La terapia con ACE-inibitori, inoltre, determina l'insorgenza di tosse nelle donne con un'incidenza di tre volte superiore rispetto agli uomini (16).

Anche il profilo trombogenico è differente tra i due sessi; le donne, infatti, mostrano un aumentato rischio trombogenico rispetto agli uomini, nonostante i livelli più elevati di HDL. Il trattamento con pravastatina a 6 mesi ha ridotto più significativamente nelle donne i livelli del frammento F 1.2 della protrombina (un marker nella formazione di trombina) (17).

In conclusione, la variabilità di efficacia e tollerabilità dei farmaci osservata nei due sessi, anche nel trattamento delle malattie cardiovascolari, impone una attenta scelta della terapia farmacologica per ottenere il migliore profilo rischio/beneficio dei farmaci utilizzati.

Bibliografia

- Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics: 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation. 2008;117:e25–e146
- 2. J. E. Roeters van Lennep, H. T. Westerveld, D. W. Erkelens, E.E. Van der Wall Risk factors for coronary heart disease: implications of gender Cardiovascular Research 2002;53:538–49
- 3. Barrett-Connor, E. & Ferrara, A. Isolated postchallenge hyperglycemia and the risk of fatal cardiovascular disease in older women and men. The Rancho Bernardo Study. Diabetes Care 1998;21:1236–9
- 4. Lundberg, V., Stegmayr, B., Asplund, K., Eliasson, M., Huhtasaari, F. Diabetes as a risk factor for myocardial infarction: population and gender perspectives. J. Intern. Med. 1997;241:485–92
- 5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med 2005;352:1685–95
- Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelian and Endothelian Factors of the European Society of Hypertension. J Hypertens 2005; 23: 233-46
- 7. Roden DM, George AL Jr. The genetic basis of variability in drug responses. Nat Rev Drug Discov. 2002;1:37–44.
- 8. M. Gandhi, F. Aweeka, R. M. Greenblatt, T. F. Blaschke Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2004;44:499-523
- 9. Miksys S, Tyndale RF Drug-metabolizing cytochrome P450s in the brain. J Psychiatry Neurosci 2002;27:406–15
- Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. Am J Med. 2002;113:746-50
- 11. Scandlyn MJ, Stuart EC, Rosengren RJ. Sex-specific differences in CYP450 isoforms in humans. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2008;4:413-24

- 12. Dahlo"f B, Devereux R, de Faire U, Fyhrquist F, Hedner T, Ibsen H, Julius S, Kjeldsen S, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Lindholm LH, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wedel H. The LIFE Study Group. The Losartan Intervention For Endpoint reduction (LIFE) in Hypertension study: rationale, design, and methods. The LIFE Study Group. Am J Hypertens. 1997;10:705–13
- 13. Os I, Franco V, Kjeldsen SE, Manhem K, Devereux RB, Gerdts E, Hille DA, Lyle PA, Okin PM, Dahlöf B, Oparil S. Effects of losartan in women with hypertension and left ventricular hypertrophy: results from the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension Study. Hypertension. 2008;51:1103-8
- 14. Neaton JD, Grimm RH Jr, Prineas RJ, Stamler J, Grandits GA, Elmer PJ, Cutler JA, Flack JM, Schoenberger JA, McDonald R, Lewis CE, Liebson P. Treatment of Mild Hypertension Study: final results. Treatment of Mild Hypertension Study Research Group. JAMA. 1993;270:713–24
- 15. August P, Oparil S. Hypertension in women. In: Oparil S, Weber M, eds. Hypertension. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1999:Chapter 63
- 16. Os I, Oparil S, Gerdts E, Hoieggen A. Essential hypertension in women. Blood Press. 2004;13:272-8
- 17. Dangas G, Smith DA, Badimon JJ, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Cohen AM, Levine D, Fallon JT, Ambrose JA. Gender differences in blood thrombogenicity in hyperlipidemic patients and response to pravastatin. Am J Cardiol. 1999;84:639-43

Sessione "Interferenti endocrini"

EFFETTI DI INTERFERENTI ENDOCRINI SINGOLI E IN MISCELE SULL' EPATOPANCREAS DI MOLLUSCHI

Laura Canesi

Dipartimento di Biologia, Università di Genova, Corso Europa 26, 16132, Genova Laura. Canesi@unige.it

Gli interferenti endocrini (IE) rappresentano contaminanti ubiquitari dell'ambiente acquatico. Tra questi, estrogeni naturali e sintetici, e una varietà di sostanze chimiche ad azione estrogenica, spesso in miscele complesse, sono stati identificati nelle acque dolci, salmastre e marine, dove possono rappresentare un rischio per le specie acquatiche (Atkinson et al., 2003; Pojana et al., 2004, 2007). Dati ottenuti in mammiferi e pesci hanno sottolineato il potenziale rischio di esposizione a miscele di sostanze estrogeniche, anche se ogni componente è presente singolarmente a concentrazioni inattive (Rajapakse et al., 2002; Brian et al., 2005, 2007).

Recenti ricerche hanno dimostrato che nel mollusco bivalve *Mytilus* (il comune mitilo edule) diversi estrogeni sintetici e composti chimici ad attività estrogenica, sia singolarmente che in miscele, sono in grado di modulare la funzione immunitaria *in vitro* ed *in vivo*, interferendo con i meccanismi di azione dell' estrogeno naturale, il 17β-estradiolo (E₂) (Canesi et al., 2007a, 2007b). Negli immunociti di mitilo, tali sostanze sono in grado di modulare, sia positivamente che negativamente, i meccanismi di azione 'non genomici' dell'estrogeno naturale, in particolare lo stato di fosforilazione sia di cinasi citosoliche (MAPK-Mitogen activated protein kinases e PKC-Protein kinase C) che di fattori di trascrizione STAT (Signal transducers and Activators of Transcription) e CREB (cAMP responsive binding element) (Porte et al., 2006). Tali dati hanno suggerito che gli interferenti endocrini potessero modulare l'espressione genica anche nelle cellule di invertebrati.

Nel mitilo, l' epatopancreas o ghiandola digestiva gioca un ruolo centrale nel metabolismo e nella distribuzione dei nutrienti alle gonadi nel periodo riproduttivo (Dimitriadis et al., 2004). Le cellule dell'epatopancreas del mitilo sono state le prime cellule di invertebrati in cui è stata dimostrata la responsività agli estrogeni (Moore et al., 1978). Nei mitili, l'esposizione a concentrazioni fisiologiche di E₂ (1,35-13 ng/g tessuto) mediante iniezione diretta nel sistema circolatorio, ha dimostrato effetti significativi sulla funzione lisosomiale, il metabolismo lipidico e dei carboidrati e l'attività degli enzimi antiossidanti dell'epatopancreas (Tab. 1). Inoltre, E₂ determina l'induzione dell'espressione di alcuni geni, valutata mediante RT-PCR quantitativa, in particolare dei recettori per gli estrogeni MER1 e MER2 e di proteine coinvolte nella protezione dallo stress ossidativo, quali la catalasi e le metallotioneine (Canesi et al., 2007c). L'esposizione dei mitili ad un classico IE, il Bisfenolo A (BPA), a concentrazioni simili a quelle di E₂ e confrontabili con i livelli di esposizione ambientale (3-60 ng/g tessuto), ha mostrato effetti significativi sui parametri lisosomiali

e sulle attività enzimatiche modulati dall' E₂. Inoltre, per quanto riguarda l'espressione genica, il BPA induce una up-regulation dell'espressione di MER2, ma non di MER1, e una downregulation della trascrizione di catalasi e metallotioneine (Canesi et al., 2007d). Nel complesso i risultati indicano che, negli invertebrati come nei vertebrati, il BPA può esercitare sia effetti estrogeno-simili che opposti rispetto a quelli dell'estrogeno naturale. Tali dati sono in accordo con gli effetti distinti precedentemente osservati per E₂ e BPA sulla modulazione dello stato di fosforilazione di enzimi citosolici e di fattori di trascrizione nelle cellule di mitilo (Canesi et al., 2006a; Porte et al., 2006).

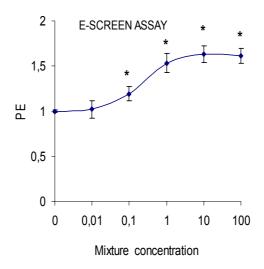
Questo aspetto risulta di particolare interesse quando si consideri che nell'ambiente naturale gli organismi acquatici sono tipicamente esposti a miscele complesse di sostanze ad azione estrogenica ed antiestrogenica. A tale scopo abbiamo voluto verificare i possibili effetti di una miscela di interferenti endocrini contenente 7 diversi composti (17β-estradiolo, 17α-etinil estradiolo, mestranolo, nonlfenolo, nonilfenolo monoetossilato carbossilato, bisfenolo A, benzofenone), a concentrazioni e in proporzioni simili a quelle misurate in diversi siti della Laguna di Venezia (Pojana et al., 2004). Il potenziale estrogenico di tale miscela è stato inizialmente valutato mediate il saggio di proliferazione cellulare della linea di breast cancer MCF-7 (E-SCREEN Assay): un effetto proliferativo (PE) significativo è stato osservato a partire dalla concentrazione 0.1x (0.177 ng/l) (Fig. 1). I mitili sono stati quindi iniettati con diverse concentrazioni della miscela (0.0177, 0.177, 1.77 and 177 ng/g tessuto) e i tessuti campionati a 24 e 72 ore di trattamento. I risultati ottenuti, riassunti in Tab. 1. indicano che la miscela determina variazioni significative dei parametri lisosomiali, dell'accumulo di lipidi e di prodotti di perossidazione lipidica, della attività di catalasi e glutatione transferasi-GST, e degli enzimi glicolitici PFK e PK. Inoltre, sono state osservate variazioni dell'espressione delle due isoforme del recettore MER1 e MER2, della catalasi e della GST- π , con diversi effetti, in positivo o in negativo, a seconda della concentrazione e del tempo di esposizione (Canesi et al., 2008). Tali dati dimostrano che l'esposizione a breve termine a concentrazioni ambientali di miscele di IE interferisce con la funzione lisosomiale, il bilancio redox e l'espressione genica dell'epatopancreas di mitilo.

I risultati ottenuti indicano che, nelle cellule dell'epatopancreas, come negli immunociti di mitilo, miscele di composti ad azione estrogenica possono esercitare sia effetti simili che distinti rispetto a quelli di estrogeni naturali o ambientali singolarmente. L'effetto complessivo dipenderebbe da diversi fattori, quali la composizione della miscela, le concentrazioni relative dei composti individuali, e la durata dell'esposizione. In particolare, è interessante notare che nell'epatopancreas di mitilo effetti significativi sono stati osservati a partire da una concentrazione della miscela 0.1x (corrispondente a 0.177 ng/g tessuto ed equivalenti a 0.177 ng/l plasma di

estrogeni totali) (Canesi et al., 2008); ciò indica una sensibilità del sistema sperimentale utilizzato alle miscele di IE confrontabile a quella di un classico test di estrogenicità su cellule umane (E-SCREEN assay). Inoltre, tali concentrazioni complessive sono inferiori a quelle di E₂ o BPA che, singolarmente, risultano efficaci nelle stesse condizioni sperimentali sia nell'epatopancreas di mitilo (Canesi et al., 2007c, 2007d) che nell'E-SCREEN assay (dati non pubblicati). Nel complesso, i dati fino ad oggi ottenuti supportano l'ipotesi che, come nei vertebrati, anche negli invertebrati gli effetti di miscele di IE possono essere maggiori di quelli prevedibili in base alla concentrazione dei singoli componenti della miscela, e che alcune specie di invertebrati come il mitilo, nelle opportune condizioni sperimentali, possono essere utilizzate come modello utile per la valutazione degli effetti degli IE.

Fig. 1 - Potenziale estrogenico di una miscela di estrogeni ambientali valutata mediante l'E-SCREEN assay. La proliferazione cellulare è stata determinata mediante l'MTT assay.

PE = Proliferative effect. * = $P \le 0.05$. La concentrazione totale di sostanze estrogeniche è compresa tra 0.01x = 0.0177 ng/l a 100x = 177 ng/l.



Tab. 1 – Effetti di estrogeni naturali e ambientali, singoli o in miscele, su parametri funzionali e sull'espressione genica nell'epatopancreas di mitilo.

Parametri funzionali

	E ₂	BPA	MIX
Stabilità membrana lisosomiale	-	-	-
Accumulo lipidi neutri	+	+	+
Accumulo di lipofuscine	n.s.	+	+
Attività catalasi	+,-	+,-	+
Attività GST	+	+	+
Attività PFK	+	+	+
Attività PK	+	n.s.	+

Espressione genica

r			
	E_2	BPA	MIX
MER1	+	n.s.	+,-
MER2	+	+	+,-
CATALASI	+	-	+, -
MT20	+	-	-
GST-π	+	-	+

GST = glutatione transferasi; PFK = fosfofruttokinasi; PK = piruvato kinasi; MER1 = Mytilus Estrogen Receptor 1; MER2= Mytilus Estrogen Receptor 2; MT20 = Metallothionein 20. n.s. = non significativo (da Canesi et al., 2007a-2007d, 2008).

- Atkinson, S., Atkinson, M.J., Tarrant, A.M., 2003. Estrogens from sewage in coastal marine environments. Environ. Health Perspect. 111, 531-535.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamorea, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. Environ. Health Perspect. 113, 721-728.
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2007. Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. Environ. Sci. Technol. 41, 337-344.
- Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., 2007a. Effects of endocrine disrupting chemicals on the immune system of the edible bivalve mollusc Mytilus. The Endocrine Disruptors, 1-12, M. Marino and D.G. Mita, Erd., Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India.
- Canesi, L., Lorusso, L.C., Ciacci, C., Betti, M., Rocchi, M., Pojana, G., Marcomini, A., 2007b. Immunomodulation of *Mytilus* hemocytes by individual estrogenic chemicals and environmentally relevant mixtures of estrogens: *in vitro* and *in vivo* studies. Aquat. Toxicol., 81, 36-44.
- Canesi, L., Borghi, C., Fabbri, R., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Gallo, G., Vergani, L., 2007c. Effects of 17β-Estradiol in mussel digestive gland. Gen. Comp. Endocrinol., 153, 40-46.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci C., Fabbri, R., Vergani, L., Gallo, G. 2007d. Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. Mol. Cell. Endocrinol., 276, 36-44.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Vergani, L., Marcomini, A., Pojana, G., 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. Aquat. Toxicol., 87, 272-279.
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P., Cajaraville, M.P., 2004. Cytochemical and histochemical aspects of the digestive gland of the mussel *Mytilus galloprovincialis* (L.) in relation to function. J. Mol. Histol. 35, 501-509.
- Moore, M.N., Lowe, D.M., Fieth, P.E.M., 1978. Responses of lysosomes in the digestive cells of the common mussel *Mytilus edulis*, to sex steroids and cortisol. Cell Tissue Res. 188, 1-9.
- Pojana, G., Bonfà, A., Busetti, F., Collarin, A., Marcomini, A., 2004. Estrogenic potential of the Venice, Italy, Lagoon waters. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1874-1880.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., Marcomini, A., 2007. Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. Environ. Int. 33, 929-36.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., Fossi, M.C., Canesi, L., 2006. Endocrine Disruptors in marine organisms: approaches and perspectives, Comp. Biochem. Physiol., 143C, 303-315.
- Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A., 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. Environ. Health Perspect. 110, 917-921.

MOLECULAR BASES OF BPA INTERFERING WITH ESTROGEN RECEPTOR ACTIVITIES

Maria Marino^{1,2} and Gustavo D. Mita^{2,3}

¹Department of Biology, University Roma Tre, Viale Guglielmo Marconi 446, I-00146 Roma, Italy. ²National Institute of Biostructures and Biosystems, Viale Medaglie d'Oro, 305, I-00136 Roma, Italy. ³Department of General Pathology, Second University of Napoli, Via Luigi De Crecchio, 7, I-80138 Napoli, Italy.

The endocrine disruptors (EDs) are an heterogeneous and widely distributed group of hormone-like chemicals, mostly of anthropogenic origin. A common feature of these compounds is the ability to interfere with natural hormone at concentrations below their toxicity threshold (*i.e.*, in the μM range). Epidemiological data correlate EDs exposure to the onset of various pathologies including cancer. Of particular relevance, epidemiological studies have highlighted the correlation between the increasing environmental level of BPA, a good EDs prototype, and the incidence of human prostate and breast cancer suggesting that on-going exposure to environmental low BPA doses can act as a mitogenic receptor-mediated substance inducing cell proliferation and, consequently, increasing the incidence and susceptibility to neoplastic transformation in humans. This correlation is further supported by the results on animal models which indicate that BPA can induce preneoplastic lesions in the mammary gland in rats.

Several mechanism involving different hormonal receptors have been proposed to be involved in the BPA effects. Among others, the estrogen receptors (both the α and β isoforms: ER α and ER β) are considered as the foremost molecular mediator of the *in vitro* and *in vivo* effects exerted by BPA. In particular, is well known that BPA is able to bind to ER α and ER β , even thought with an affinity lower than 17 β -estradiol (E2).

ER α and ER β have markedly different tissue distribution and mediate diverse E2 effects. Evidences accumulated suggesting ER α as mediator of the E2-induced cancer promoting response in several target cells, whereas ER β is associated with a protective role in cancerogenesis. These data arise the possibility that ER α could mediate BPA-induced cell proliferation. As ER α , like other nuclear receptors, is a ligand-activated transcriptional factor, the research has been mainly focused on the ability of BPA to modulate nuclear transcriptional activity of this receptor. Interestingly, the set of genes induced by BPA and E2 seems to be quite different being most of them unique for BPA and E2.

Although less studied, other different molecular mechanisms could been proposed to explain the E2-mimetic BPA effects on cell proliferation. BPA, in fact, could interfere with ER α -mediated rapid signal transduction pathways which are deeply involved in both E2-induced cell proliferation and in E2-induced gene transcription. Moreover, it has been reported that some BPA effects could

relay even on the existence of non-conventional membrane-bound E2-binding site (*i.e.*, seven-transmembrane G-Protein coupled Receptor 30, GPR30). As far we know no information are available on the involvement of these pathways in the proliferative effect of BPA.

The aim of this work is to elucidate the ER-dependent mechanism(s) underlying the proliferative effect of BPA. Moreover, we evaluate if the BPA-estrogenic activity persists after removing this ED after treatment with laccase. Human cervix adenocarcinoma cells (HeLa cells) devoid of any ERs and transiently transfected with an empty or ER α expression vectors, and the ER β -containing DLD-1 colon cancer cells have been used as experimental models.

Our results confirm that BPA is a weak ER α agonist. In fact, the K_d value for BPA binding to ER α , either *in vitro* or over-expressed in cellular systems, is about 10,000-fold higher than that of E2. No BPA effect is observed in HeLa cells transfected with the empty vector at any BPA concentration tested. The ability of the ER competitive inhibitor ICI 182,780 to prevent the BPA- and E2-induced cell proliferation in HeLa cells further outlines that BPA action is ER α -dependent. Although devoid of ERs, HeLa cells express membrane GPR30 which contribution to the BPA-induced cancer cell growth, if any, is negligible, at least in this experimental model. BPA at a concentration of at least 10-fold higher than that inducing cell proliferation exerts severe cytotoxic effects in a ER-independent manner. In fact, both empty vector- and ER α -transfected HeLa cells showed the same dose-dependent decrease in cell number.

The present results correlate, for the first time, the BPA-induced proliferative response to the ER α -mediated non-genomic signals activation. In fact, upon BPA stimulation ER α mediates signal transduction pathways which culminates with ERK and AKT phosphorylation. The BPA-induced ERK and AKT phosphorylation are not present in empty vector-transfected cells and are completely prevented by the antiestrogen ICI 182,780. Moreover, similar to E2, BPA-induced ERK and AKT activation is required for its proliferative effect. Although the K_d value for BPA binding to ER β is very similar to ER α , BPA treatment of ER β -containing DLD-1 completely blocked the ability of this receptor to activate gene transcription and the apoptotic cascade (i.e., caspase-3 activation and PARP cleavage) which characterize the E2 protective effect against colon cancer growth. As a whole, this study indicates that, in the presence of ER α , BPA acts as an E2 agonist by the activation of rapid and 'non genomic' pathways which drive cells into proliferation, whereas in the presence of ER β BPA acts as an E2 antagonist blocking the protective hormonal effect.

Owing to the potential noxious effects of BPA on cell proliferation, special attention should be given to remediation of polluted waters. The bioremediation of BPA could became an accessible goal due to the fulfilment of a bioreactor carrying a membrane-immobilized laccase able to oxidize BPA. Our results indicate that laccase-catalyzed oxidation of BPA converts this cytotoxic

compound into a much less reactive substance; indeed, enzymatically oxidized BPA looses any ER α - and ER β -dependent activities. The inability of oxidized BPA to induce the ER α -dependent cell proliferation and to block ER β -dependent pro-apoptotic cascade is in good agreement with the inability of this compound to bind ER α and ER β . In line with these observations and according to the molecular weigh obtained by mass spectrometry ([M-H]⁻ = 227±1), the most probable product obtained by laccase-catalyzed oxidation of BPA is 2,2-bis(4-phenylquinone)propane. Although this chemical shows the same molecular mass of BPA, the oxidation of both hydroxyl groups by treatment with laccase impairs recognition by ERs.

Intriguingly, the BPA cytotoxic effect decreases after laccase-mediated oxidation. In fact, $100 \mu M$ of BPA determine a decrease of about 70% of the cell viability while a 10-fold higher concentration of the enzymatically-treated BPA causes only about 40% decrease of cell viability. The more stable carbonylic groups present in oxidized BPA suggests that this compound could be less prone to the production of reactive oxygen species compared with BPA and, thus, less able to cause an oxidative stress into the cells. However, we cannot exclude that the laccase catalyzed oxidation of BPA can accelerate the metabolism of this product into the cells determining a shorter half-life.

In recent years, it has become evident that many chemicals present in the environment can mimic, antagonize or alter the physiological actions of endogenous hormones. Even when present in minute amounts (part per trillion), EDs could interfere with the synthesis, secretion, transport, metabolism, binding, action, or elimination of natural hormones responsible for homeostasis maintenance, reproduction, and developmental processes. Nowadays endocrine disruption is one of the topics receiving much attention throughout all sectors of the society; thus, the need to identify the appropriate remediation actions is increasing. Our results indicate that bioreactors could be useful tools for the bioremediation of EDs in aqueous solutions.

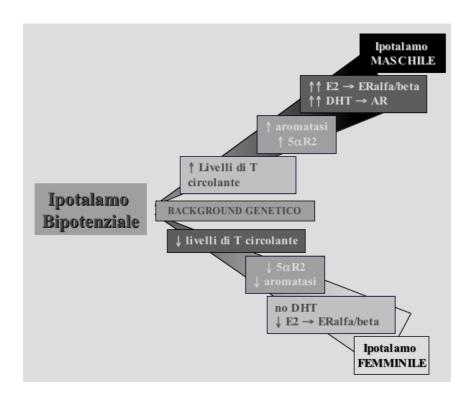
INTERFERENTI ENDOCRINI E SVILUPPO DEI MECCANISMI NEUROENDOCRINI CHE CONTROLLANO IL SISTEMA RIPRODUTTIVO

L. Casati, A. Colciago, O. Mornati, F. Celotti, P. Negri-Cesi Istituto di Endocrinologia, Unità di Ricerca INBB, Università degli Studi di Milano Via Balzaretti 9, Milano

Nei mammiferi, la concordanza fra il sesso genetico (cioè la presenza nel genoma di cromosomi sessuali XX o XY) e il fenotipo sessuale (cioè aspetto esteriore, modalità di secrezione degli ormoni sessuali e comportamenti legati alla riproduzione di tipo femminile o maschile) è il risultato di una complessa serie di eventi "organizzativi" che, durante lo sviluppo, determinano l'evoluzione corretta di strutture plastiche bipotenti costituite sia dagli organi riproduttivi sia dalle aree ipotalamiche che ne controllano le funzioni. In particolare, due sono i nuclei ipotalamici che sviluppano un maggiore dimorfismo sessuale: il nucleo sessualmente dimorfico dell'area preottica mediale (SDN-POA), che è coinvolto nel comportamento copulatorio di monta ed è maggiormente sviluppato nei maschi rispetto alle femmine e, al contrario, l'area anteroventrale periventricolare (APVP), che controlla la modalità di rilascio di GnRH tipica del ciclo ovulatorio, più sviluppata nelle femmine (Patisaul e Polson 2008). Il "periodo critico" durante il quale l'ipotalamo acquista caratteristiche morfo-funzionali dimorfiche si estende dall'ultimo terzo di gestazione alla prima infanzia; fattore chiave che determina tale evoluzione è la presenza in circolo di differenti livelli di steroidi gonadici nei due sessi, causata dall'evoluzione delle gonadi bipotenti in ovaie o testicoli e dall'inizio della secrezione da parte di questi ultimi di testosterone (T). Come accade per gli organi riproduttivi, anche il "cervello sessuale" ha la tendenza intrinseca a differenziarsi in senso femminile a meno che non si attivino stimoli precisi che lo mascolinizzano. Il processo di differenziazione del cervello verso un fenotipo maschile comporta quindi due eventi distinti: la perdita della capacità di mostrare comportamenti di tipo femminile (defemminilizzazione) e lo sviluppo di circuiti che permetteranno l'attivazione di comportamenti tipici del maschio (mascolinizzazione). I meccanismi molecolari alla base di entrambi questi eventi sono noti in alcune specie animali fra cui i roditori e sono dipendenti dall'azione intraneuronale del T circolante che, in questa specie, presenta due picchi plasmatici: uno nei giorni finali di gestazione (GD17-GD19) e l'altro nel primo giorno di vita (PN1) (Negri-Cesi et al. 2008).

Il meccanismo d'azione del T comporta la sua trasformazione in mediatori attivi (Estradiolo, E₂, e diidrotestosterone, DHT), ad opera rispettivamente dell'enzima aromatasi e delle due isoforme della 5alfa-riduttasi (5alfa-R1 e 2). La 5alfa-R1, poco affine al T, è un enzima ubiquitario con un ruolo di tipo catabolico; la 5alfa-R2 invece, ad alta affinità per T, è l'enzima specifico per la formazione di DHT nelle strutture androgeno-dipendenti periferiche e centrali (Russel e Wilson 1994). E₂ e DHT, una volta prodotti grazie all'attività dell'uno o dell'altro dei sistemi enzimatici, si legano

rispettivamente al recettore estrogenico (ER-alfa o beta) o al recettore androgenico (AR) ed attivano la trascrizione di geni bersaglio coinvolti nell'apoptosi o nella sopravvivenza neuronale, modellando così la morfologia e la plasticità delle aree sopra citate (Forger 2006). Da studi condotti nel nostro laboratorio, che utilizzano come modello sperimentale il ratto, è emerso che l'aromatasi ipotalamica segue l'andamento del T plasmatico con due picchi al GD19 e al PN2 specifici del maschio; la 5alfa-R2 invece aumenta dal GD17 al PN10 in entrambi i sessi, sebbene in modo significativamente più marcato nei maschi rispetto alle femmine (Poletti et al. 1998; Negri-Cesi et al. 2001; Colciago et al. 2005). Ne consegue che, in aggiunta ai diversi livelli di T, la quantità relativa di questi due enzimi nell'ipotalamo in via di differenziazione, unita ad un differente livello di espressione di AR ed ER, amplificando e differenziando l'azione dell'ormone nativo, determina l'evoluzione dimorfica della struttura. Uno schema di questo processo è illustrato qui di seguito.



E' noto da molto tempo che, almeno nei roditori, E₂ è il principale responsabile della differenziazione ipotalamica in senso maschile (Negri-Cesi et al. 2004; Ohtani-Kaneko 2006). Il ruolo del DHT nel processo di mascolinizzazione/defemminilizzazione cerebrale non è ancora chiaro; tuttavia esso, da solo o in associazione con E₂, a seconda dell'area cerebrale considerata, sembra essere importante nel determinare il rapporto sopravvivenza/morte cellulare (Forger 2006) e nella produzione di agenti differenzianti neuronali (Yonehara et al. 2003). Inoltre, non si conosce ancora l'importanza dell'aromatasi nella femmina; tuttavia è possibile che questo sistema enzimatico possa fornire adeguati livelli di E₂ per l'inizio della pubertà (come suggerito da recenti

dati ottenuti nel nostro laboratorio, che dimostrano una maggiore espressione di aromatasi nella femmina rispetto al maschio allo svezzamento) e per il mantenimento di un corretto comportamento sessuale nella vita adulta (come dimostrato in animali KO per l'aromatasi (Bakker et al. 2006)).

E' quindi intuitivo che tutto ciò che interferisce con la complessa e precisa integrazione quali- e quantitativa di questi sistemi ormonali nel il periodo critico della differenziazione sessuale del cervello potrebbe perturbare l'omeostasi neuroendocrina con ripercussioni sulle funzioni riproduttive; l'effetto sarà tanto più evidente quanto prima e a lungo avviene l'esposizione.

I principali e più studiati prodotti naturali o sintetici che hanno attività di interferenti endocrini (EDC), in specifico sulla neuroendocrinologia della riproduzione, possiedono un'attività estrogenica/antiestrogenica e/o antiandrogenica, nonché la capacità di modulare l'espressione dei recettori per gli ormoni sessuali e/o l'attività dell'aromatasi e delle 5alfa-R. Molti di questi composti sono lipofili, quindi tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo e nel latte materno; inoltre, poichè passano con facilità le barriere emato-placentare ed emato-encefalica, possono avere pesanti effetti avversi su una struttura vulnerabile come il cervello in via di differenziazione.

Uno dei primi esempi di interferenza con la neuroendocrinologia riproduttiva riguarda l'estrogeno sintetico diestilsilbestrolo, un farmaco usato largamente per prevenire casi di aborto che ha causato nella progenie femminile, oltre all'elevata incidenza di adenocarcinoma vaginale, una sorta di defeminilizzazione centrale con alterazioni di alcuni comportamenti legati al genere (ad es., scelta dei giochi nell'infanzia, scelte sessuali, comportamento materno, ecc.) (Newbold 1993).

I fitoestrogeni sono invece composti di origine vegetale con debole attività estrogenica. Fra questi, la genisteina (un isoflavonoide contenuto in grandi quantità nella soia) sembra comportarsi da agonista o antagonista estrogenico a seconda del recettore attivato (rispettivamente ERbeta ed ERalfa). Gli effetti dei fitoestrogeni sulla differenziazione sessuale del cervello sono largamente sconosciuti, tuttavia i dati a disposizione nella femmina di ratto indicano un effetto globale di mascolinizzazione: aumento del volume del SDN-POA, alterazione della normale ciclicità ovarica, soppressione della lordosi (il tipico comportamento sessuale della femmina) (Patisaul 2005). Non è ancora chiaro se tali effetti siano dovuti solamente al legame con l'uno o l'altro dei due ER, oppure anche a modificazioni dell'espressione dell'aromatasi e/o delle 5alfa-R (Chen 1997). L'alta variabilità del contenuto in fitoestrogeni nella dieta non ha permesso finora di delineare chiaramente gli effetti dell'esposizione perinatale a queste sostanze nella specie umana. Tuttavia è possibile che un'alimentazione ricca in soia durante la gestazione o la prima infanzia possa creare uno sbilanciamento dei normali livelli ormonali con conseguenze visibili a lungo termine. E' da sottolineare che, ad esempio, l'uso del latte di soia per i lattanti con intolleranza al lattosio genera

livelli circolanti di fitoestrogeni circa 10 volte più elevati di quelli definiti attivi dal punto di vista ormonale.

Un altro composto molto studiato è il bisfenolo A (BPA), molecola monomerica tuttora usata nella sintesi di policarbonati e di resine epossidiche utilizzate nella produzione di bottiglie di plastica, biberon ed in generale contenitori per alimenti. Questo utilizzo così diffuso fa sì che il BPA si ritrovi costantemente in urine, sangue, plasma materno e fetale, liquido amniotico di origine umana ed animale. I numerosi studi finora effettuati non hanno ancora definito con chiarezza le conseguenze dell'esposizione al BPA: alcuni hanno dimostrato l'induzione di defeminilizzazione (diminuzione del volume dell'area AVPV e mascolinizzazione di alcuni comportamenti sessuali dimorfici nelle femmine) (Takagi 2004); altri invece hanno messo in evidenza alcuni effetti demascolinizzanti (ad esempio una ridotta performance sessuale nel maschio), riconducibili ad un'azione antiestrogenica della molecola, nonostante questo composto sia in grado di indurre l'espressione genica dell'aromatasi (Kishida et al. 2001) e di aumentarne in vitro l'attività (Nativelle-Serpentini et al. 2003). Infine, l'esposizione al BPA non sembra compromettere la salute riproduttiva nell'uomo (Goodman et al. 2006). Questi risultati contrastanti evidenziano alcuni dei principali problemi nello studio degli EDC, in particolare sulle funzioni riproduttive: la variabilità delle risposte a seconda della specie animale, la diversità dei livelli e tempi di esposizione, la capacità di questi composti di avere effetti spesso opposti a seconda del contesto ormonale e cellulare in cui agiscono.

Fra i composti ampiamente diffusi nell'ambiente dotati di attività estrogenica e/o antiandrogenica si possono citare l'insetticida organoclorurato metossicloro (MXC) ed il fungicida vinclozolina. E' stato dimostrato che l'esposizione a MXC (che in vivo viene convertito nel suo metabolita attivo HPTE) è in grado di causare modificazioni a lungo termine il sistema riproduttivo (ad esempio alterazione dell'innesco della pubertà, modificazioni della ciclicità ovarica, deficit dei comportamenti sessuali nei roditori (Palanza et al. 2002; Savabieasfahani et al. 2006). L'azione di interferente endocrino di questo composto probabilmente implica un'alterazione della sintesi di GnRH, come dimostrato da alcuni studi in vitro (Gore 2002). Oltre ad essere un antindrogeno, la vinclozolina sembrerebbe possedere anche attività estrogenica, attivando anche entrambe le isoforme di ER (Molina–Molina et al. 2006). Esso è in grado inoltre di modulare l'espressione genica dei recettori steroidei e dei geni coinvolti nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi, come il recettore per GnRH (Lautchanwoot et al. 2008). Secondo alcuni studi condotti nei roditori, alcuni comportamenti non riproduttivi, ma sessualmente dimorfici (ad esempio quelli sociali legati al gioco), vengono alterati nei maschi esposti che tendono ad assumere un comportamento di tipo femminile (Hotchkiss et al. 2002).

Altri composti classificati come EDC sono la 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina, tristemente famosa per l'incidente di Seveso nel 1976, e i bifenilipoliclorurati (PCBs), protagonisti di casi di contaminazione dell'olio di riso in Giappone e a Taiwan (Yusho disease). Queste due classi di composti sono caratterizzate dalle medesime proprietà chimico-fisiche e da simili meccanismi d'azione: entrambe persistono lungamente nell'ambiente grazie alla loro stabilità, e tendono ad accumularsi nel tessuti grassi e nel latte materno grazie alla loro lipofilicità; inoltre sono in grado di attraversare sia la barriera emato-placentare che quella emato-encefalica, risultando così altamente dannosi per il feto in via di sviluppo. Nel nostro laboratorio abbiamo valutato gli effetti dell'espressione perinatale a miscele commerciali (aroclor 1254) o ricostituite di PCB sull'espressione di aromatasi, delle 5alfa-R e dei recettori degli ormoni steroidei. I dati indicano in generale che tali composti possono influenzare la produzione e l'azione centrale di E₂ e di DHT, modulando l'espressione dei relativi enzimi e recettori in modo differente a seconda del tipo di miscela utilizzata e della durata dell'esposizione; alcuni di questi effetti possono ancora essere evidenti per molto tempo dopo la fine dell'esposizione. Inoltre, dai nostri risultati (Colciago et al. 2006 e dati non ancora pubblicati) sembrerebbe emergere la capacità da parte dei PCB di interferire con aromatasi e/o 5-alfa-riduttasi in modo sesso e tempo specifico, in alcuni casi annullando ed in altri amplificando il normale andamento dimorfico d'espressione genica di questi enzimi. Le modificazioni della formazione di steroidi attivi nell'ipotalamo in via di sviluppo da un lato potrebbero essere poste in relazione alle alterazioni dell'inizio della pubertà da noi osservate (anticipata nelle femmine, ritardata nei maschi) e dall'altro sembrano provocare l'annullamento dei comportamenti sessuali dimorfici (demascolinizzazione nei maschi e defemminilizzazione nelle femmine), come dimostrato negli esperimenti effettuati nel nostro ed in altri laboratori (Vreugdenhil et al. 2002; ten Tusscher et al. 2004).

Da ultimo, osservazioni condotte recentemente hanno dimostrato che un'esposizione embrionale e post-natale a MXC, DES o genisteina può avere effetti trans-generazionali che prescindono da mutazioni del patrimonio genetico. Questi inquinanti causerebbero un'alterazione permanente nella riprogrammazione epigenetica delle cellule germinali che trasmetterebbero così alle generazioni successive disordini endocrini, riproduttivi (infertilità, patologie prostatiche), malattie del sistema immunitario, sviluppo di neoplasie alla mammella e all'utero. (Anway et al. 2006; Newbold et al. 2006). L'imprinting epigenetico è sesso specifico, quindi anche l'effetto degli EDC potrà essere dimorfico oltre che transgenerazionale. Ne è un esempio la vinclozolina che sembra indurre nel ratto modificazioni di alcuni parametri comportamentali, come la scelta del compagno, solo nelle femmine i cui progenitori siano stati esposti all'antiandrogeno (Crews et al. 2007).

Gli effetti epigenetici degli EDC sembrano coinvolgere anche i meccanismi legati all'azione del T. Ad esempio in alcuni pesci (*Oryzias latipes* o pesce del riso) gli estrogeni di sintesi sembrano alterare lo stato di metilazione del promotore del gene dell'aromatasi e del recettore estrogenico (Contractor et al. 2004) in modo tessuto e sesso specifico, causando così un annullamento il dimorfismo sessuale di questi parametri.

Qui di seguito è riportato un riassunto dei principali effetti degli EDC a livello ipotalamico, nonchè delle alterazioni epigenetiche finora riscontrate. Per una rassegna più dettagliata vedere Negri-Cesi et al. 2007)

	Interazione con	Aromatasi	5alfa-	Comportamento sessuale	Alterazioni
	Recettori		Riduttasi		epigenetiche
Fito- estrogeni	Attività estrogenica o antiestrogenica a secondo dell'isoforma di ER	Genisteina → Inibitore in vitro	Nessun dato	Defeminilizzazione e mascolinizzazione in ratti femmina	Alterazioni del pattern di metilazione e modificazioni istoniche
BPA	Attività estrogenica ed antiandrogenica	Attività alterata	Nessun dato	Defeminilizzazione di AVPV	Alterazioni del pattern di metilazione
MXC	Attività estrogenica ed antiandrogenica	Attività alterata → Inibitore in vivo	Nessun dato	Nessun dato	Nessun dato
PCB & Diossina	Attività estrogenica o antiestrogenica; atività androgenica/ antiandrogenica	Attività inibita ed espressione genica alterata (sesso-tempo specifico)	Espressione genica alterata (sesso-tempo specifico)	Defeminilizzazione in ratti femmina e demascolinizzazione nei maschi	Nessun dato
Vinclozo- lina	Antiandrogenica/ Estrogenica	Nessun dato	Nessun dato	Alterazioni comportamenti dimorfici non riproduttivi	Probabile alterazioni del pattern di metilazione

Le conseguenze dell'esposizione agli EDC sullo sviluppo dei meccanismi neuroendocrini che controllano il sistema riproduttivo sono subdole e da vagliare approfonditamente; infatti, la capacità da parte di questi composti di alterare l'acquisizione di una corretta identità di genere sia nella progenie esposta, che nelle generazioni successive, richiede sicuramente studi approfonditi e coordinati per chiarire i molteplici effetti riscontrabili in un sistema integrato complesso come quello che porta ad una completa maturità sessuale.

Bibliografia essenziale

Anway M.D., Leathers C., Skinner M.K. (2006) Endocrinology 147: 5515.

Bakker J., De Mees C., Douhard Q., Balthazart J., Gabant P., Szpirer J. and Szpirer C. (2006) Nat Neurosci 9: 220.

Chen S., Kao Y.C., Laughton C.A. (1997) J Steroid Biochem Mol Biol 61: 107.

Colciago A., Celotti F., Pravettoni A., Mornati O., Martini L., Negri-Cesi P. (2005) Dev Brain Res 155: 107.

Colciago A., Negri-Cesi P., Pravettoni A., Mornati O., Casati L., Celotti F. (2006) Reproductive Toxicol 22: 738.

Contractor RG, Foran CM, Li S, Willett KL. (2004) J Toxicol Environ Health A. 67: 1.

Crews D., Gore A.C., Hsu T.S., Dangleben N.L., Spinetta M., Schallert T., Anway M.D., Skinner M.K. (2007) *PNAS*: 104: 5942.

Forger N.G. (2006) Neuroscience, 138, 929.

Goodman J.E., McConnell E.E., Sipes I.G., Witorsch R.J., Slayton T.M., Yu C.J., Lewis A.S., Rhomberg L.R. (2006) Crit Rev Toxicol 36: 387.

Gore A.C. (2002) Mol Cell Endocrinol 192: 157.

Hotchkiss A.K., Ostby J.S., Vandenburgh J.G., Gray L. (2002) Environ Health Perspect 110 (Suppl 3): 435.

Kishida M., McLellan M., Miranda J.A., Callard, G.V. (2001) Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 129: 261.

Loutchanwoot P., Wuttke W., Jarry H. (2008) Toxicology 243: 105.

Molina-Molina J.M., Hillenweck A., Jouanin I., Zalko D., Cravedi J.P., Fernández M.F., Pillon A., Nicolas J.C., Olea Balaguer P. (2006) *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 44.

Nativelle-Serpentini C., Richard S., Seralini G.E., Sourdaine P. (2003) Toxicol In Vitro 17: 413.

Negri-Cesi P., Colciago A., Celotti F. (2007) In "*The Endocrine disruptors*" (M. Marino e DG Mita Eds), Research Signpost/Transworld Research Network, Trivandrum, Kerala, India, p. 67.

Negri-Cesi P., Colciago A., Celotti F., Motta M. (2004) J Endocrinol Invest 27: 120.

Negri-Cesi P., Colciago A., Motta M., Martini L. e Celotti F. (2001) Mol Cell Endocrinol 178: 1.

Negri-Cesi P., Colciago A., Pravettoni A., Casati L., Conti L., Celotti F. (2008) J Steroid Biochem Mol Biol 109: 294

Newbold R.R. (1993) Environ Health Perspect 101: 208.

Newbold R.R., Padilla-Banks E., Jefferson W.N. (2006) Endocrinology 147: S11.

Ohtani-Kaneko R. (2006) Histol Histopathol 21: 317.

Palanza P., Morellini, F., Parmigiani, S. and vom Saal, F.S. (2002) Neurotoxicol Teratol 24: 55.

Patisaul H.B. (2005) J Neuroendocrinol, 17: 57.

Patisaul H.B. and Polson E.K. (2008) Brain Res Rev 57: 352.

Poletti A., Negri-Cesi P., Rabuffetti M., Colciago A., Celotti F., Martini L. (1998) Endocrinology 139: 2171.

Russel D. and Wilson J. (1994) Annu Rev Biochem, 63: 25.

Savabieasfahani M., Kannan K., Astapova O., Evans N.P., Padmanabhan V. (2006) Endocrinology 147: 5956.

Takagi H., Shibutan, M., Masutomi N., Uneyama C., Takahashi N., Mitsumori K., Hirose M. (2004) *Arch Toxicol* 78: 97.

ten Tusscher G.W. and Koppe, J.G. (2004) Chemosphere 54: 1329.

Vreugdenhil H.J., Slijper, F.M., Mulder, P.G., Weisglas-Kuperus, N. (2002) Environ Health Perspect 110: A593.

Wilson C.A. and Davies D.C. (2007) Reproduction 133: 331.

Yonehara K., Suzuki M., Yamanouchi K., Nishihara M. (2003) J Reprod Dev 49: 547.

SENSORI E BIOSENSORI ELETTROCHIMICI PER LA DETERMINAZIONE DI MODULATORI ENDOCRINI

- G. Palleschi°, D. Moscone°, F. Valentini°, F. Arduini°, D. Compagnone*, D.G. Mita°**
 Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma tor Vergata
- *Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Teramo
- **Dipartimento di Medicina Sperimentale, Facoltà di Medicina e Chirurgia- Seconda Università di Napoli
- ° Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi INBB, Roma

Introduzione

Nel corso degli ultimi anni un particolare interesse è stato rivolto verso lo studio di alcuni inquinanti, soprattutto gli estrogeni (ormoni naturali e sintetici) e gli xenoestrogeni (pesticidi e composti di provenienza antropica), in concomitanza con lo sviluppo degli effetti tossici di tali specie, riscontrati sull'uomo ed i mammiferi in genere¹. L'uso ormai crescente degli estrogeni quali promotori della crescita della massa muscolare negli animali, ha contribuito all'incremento dei loro livelli di concentrazione nell'ambiente, superando di gran lunga i livelli di attenzione fissati². La normativa vigente in Italia e nei paesi membri dell'Unione Europea³ (UE) vieta l'uso delle sostanze ad attività ormonale per scopi anabolizzanti negli animali di allevamento. Per quanto riguarda, in particolare, i residui degli ormoni sessuali naturali quali il 17 β -estradiolo, il testosterone ed il progesterone, nel nostro paese sono stati fissati i livelli fisiologici massimi consentiti nel sangue bovino ed i controlli sull'abuso di tali ormoni sono iniziati nel 1989, con l'applicazione del piano nazionale per la ricerca dei residui negli animali e nelle carni.

Il BPA è un interferente endocrino in quanto attiva lo stesso fattore di trascrizione del 17 β estradiolo e la sua attività è conosciuta fin dal 1938⁴. La sua misura è di grande interesse in quanto
risulta essere tra i composti maggiormente impiegati a livello industriale. Il bisfenolo A si trova
infatti in molti tipi di plastica, nei rivestimenti delle lattine e in seguito a riscaldamento può
penetrare nei cibi.

Per quanto riguarda invece la legislazione vigente in merito ai livelli di attenzione e limiti di legge di tali specie nell'ambito dei corpi idrici superficiali, non esiste ancora nulla di ben definito, dato che la presenza di tali inquinati nelle acque è dell'ordine di poche parti per trilione (ppt)⁵.

Alla luce di ciò si intuisce chiaramente la necessità di disporre di metodi analitici estremamente sensibili, precisi ed accurati per la determinazione di tali inquinanti presenti in tracce in alcune matrici ambientali.

Le tecniche analitiche che vengono impiegate per questa determinazione sono prevalentemente le tecniche *ifenate* che nascono dall'accoppiamento di più metodiche tradizionali, come la cromatografia gassosa (GC) e quella liquida ad alta pressione (HPLC), con un rivelatore molto sensibile, quale la spettrometria di massa (MS). Se da una parte tali tecniche cromatografiche si propongono come metodi ufficiali non contestabili, dall'altra parte, gli elevati costi delle

strumentazioni, la complessità delle apparecchiature (e la richiesta dunque di personale sempre più specializzato) ha contributo allo sviluppo di nuovi metodi di analisi, che sono in grado di fornire tutta una serie di vantaggi, quali:

- -la miniaturizzazione dei dispositivi di misura;
- -l'automazione del sistema di analisi;
- -il basso costo delle apparecchiature;
- -la rapidità della risposta (tale da effettuare analisi in tempo reale);
- -la sensibilità e selettività del metodo;
- -l'utilizzo di materiali biocompatibili in grado di minimizzare eventuali rischi chimici.

Presso il gruppo di Chimica Analitica dell'Università di Roma Tor Vergata sono stati sviluppati diversi metodi innovativi per analisi di screening di tali composti.

In particolare sono stati sviluppati nuovi metodi analitici per la misura quantitativa dell'estradiolo⁶ del DDT, ma anche del prodotto di prima degradazione del DDT, ossia il DDE (un congenere del DDT)⁷. Successivamente, sono stati sviluppati biosensori per la misura del BPA.

Dettagli su tali determinazioni sono riportati di seguito.

Sviluppo di un metodo ELISA accoppiato a rivelazione elettrochimica in flusso (FIIA: Flow Injection ImmunoAssay) per la determinazione del 17β-estradiolo in matrici ambientali

In questo lavoro è stato sviluppato un dosaggio immunochimico, ELISA di tipo competitivo, usando un anticorpo policionale (anti-17 β -E₂) in combinazione con un rivelatore elettrochimico in flusso⁶. L'attività enzimatica dell'enzima perossidasi (HRP, usato in questo lavoro come enzima marcatore) è stata rivelata in presenza di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) come substrato dell'enzima HRP8. Questo metodo è stato applicato per la determinazione di estradiolo in matrici ambientali di acque reflue, tal quali o dopo trattamento del campione stesso. Tale metodo offre una buona sensibilità ed accuratezza nella misura, e permette di evitare l'uso di traccianti radioattivi (come nel dosaggio ufficiale di tipo radioimmunochimico-RIA, previsto per l'estradiolo). Il limite minimo di rilevabilità del 17 β -estradiolo è risultato essere di 5 pg mL⁻¹, e la riproducibilità delle misure valutata sia nello stesso giorno che durante giorni diversi di misura (espressa come RSD), è compresa nell'intervallo 1-3% e 3-6%, rispettivamente. La sensibilità e la precisione sono risultate dello stesso ordine di grandezza del saggio DELFIA. A ciò si aggiunge la rapidità e la facilità del dosaggio immunochimico in flusso, il basso costo della strumentazione e la miniaturizzazione dell'apparato di misura. E' stato inoltre possibile investigare l'effetto degli interferenti sulla risposta analitica dell'immunosensore, presenti in tre campioni di acque reflue, provenienti da tre differenti impianti di depurazione. I valori di recupero riportati in Tabella 1 ed in Figura 1 hanno mostrato

l'assenza dell'effetto matrice, sia lavorando con i medesimi campioni diluiti 1:1 in soluzione tampone (senza pre-trattamento), sia sottoponendo i campioni ad un trattamento di estrazione liquido-liquido in dietiletere (qualora sia richiesta una sensibilità elevata).

Tabella 1. Studio di recupero di estradiolo in campioni di acque reflue

	Estradiol added/pg mL-1			
	0.26	1.31	2.63	13.13
Recovery (%)	95	89	85	90
RSD	5	3	5	5

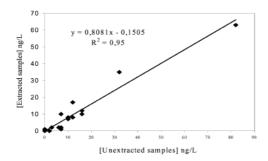


Figura 1. Studio di confronto tra i campioni tal quali e quelli sottoposti al processo di estrazione, analizzati con il metodo ELISA elettrochimico in flusso.

Sebbene il dosaggio ELISA risulti essere sensibile come metodo di screening diretto, si può tuttavia incorrere a falsi positivi nella misura finale (a causa dell'effetto matrice) ed è quindi necessario utilizzare un metodo analitico di conferma, ufficialmente validato, in grado di quantificare, in maniera inequivocabile, gli analiti di interesse ai livelli di concentrazione richiesti. In questo studio è stato utilizzato un metodo basato sulla cromatografia liquida (LC) accoppiata al sistema di rivelazione in spettrometria di massa (MS-MS) usando come sorgente di ioni l'electrospray (ESI) che opera in modalità di ionizzazione negativa (NI).

In definitiva 36 campioni sono stati analizzati in parallelo, sia mediante LC-ESI-MS-MS (metodo di conferma) sia con il saggio ELISA elettrochimico in flusso (metodo di screening). Questo studio comparativo ha mostrato un ottimo accordo tra i risultati ottenuti (Figura 2), dimostrando che il metodo di screening proposto in questo lavoro è adatto per una determinazione quantitativa sensibile di estradiolo in campioni ambientali di acque reflue.

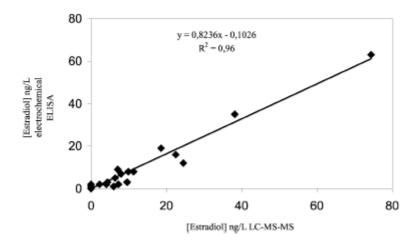


Figura 2. Studio comparativo per la determinazione di estradiolo in campioni di acque reflue condotto mediante metodo ufficiale, LC-MS-MS, e ELISA elettrochimico in flusso.

Inoltre, tenendo in considerazione che gli anticorpi diretti contro l'etinilestradiolo sono disponibili in commercio e che sono stati già usati con successo per la determinazione di quest'estrogeno mediante dosaggi ELISA, si può pensare ad un'applicazione futura che vede l'utilizzo di questo immunodosaggio in flusso per la valutazione dell'attività estrogenica totale di matrici ambientali, quali le acque reflue.

Determinazione di DDT e di relativi congeneri mediante metodo ELISA elettrochimico in flusso: analisi in acque reflue

Allo stato dell'arte il metodo analitico ufficialmente impiegato per la determinazione del DDT e dei prodotti di prima degradazione di questo composto è la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS). Tale metodo analitico risulta essere estremamente sensibile ed accurato, ma anche molto complesso perché richiede procedure di analisi molto lunghe e personale altamente specializzato, considerando inoltre i costi ingenti dell'apparato di misura e la difficoltà di analizzare un numero consistente di campioni, nell'arco di una giornata. I dosaggi immunoenzimatici invece, sono sensibili, di basso costo e facili da maneggiare.

In questo lavoro è stato ottimizzato un saggio ELISA⁷ accoppiato ad un sistema di rivelazione elettrochimico in flusso (FIA) per la determinazione di DDT e di suoi congeneri, più frequentemente riscontrate nell'ambiente, come: p,p'-DDT, p,p'-DDE, 1,1-dicloro-2,2-bis-(4-clorofenil)etano (p,p'-DDD), e o,p-DDT.

Questo approccio è stato già applicato con successo per la determinazione del 17-B-estradiolo in campioni di siero bovino⁸e di acque reflue⁶, a livelli di concentrazione dell'ordine di pg ml⁻¹. In

particolare, le prestazioni analitiche di questo dosaggio sono risultate essere soddisfacenti sia analizzando campioni di acque reflue non sottoposti ad alcun trattamento (quindi in presenza di matrici complesse) sia quelli sottoposti a processo di estrazione liquido-liquido (schema 1).

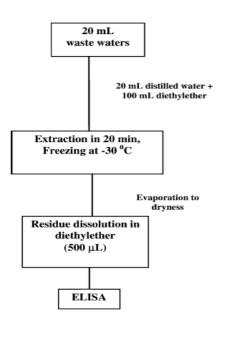


Figura 3. Procedura di estrazione del p,p'-DDT nelle acque di scarico

L'ottimizzazione del metodo ELISA con rivelazione elettrochimica in flusso ha permesso di ottenere risposte analitiche simili per l'1,1,1-tricloro-2,2-bis(p-clorofenil) etano (p,p'-DTT) ed alcuni tra i più comuni isomeri del p,p'-DDT riscontrati in matrici ambientali, quali: 1,1-dicloro-2,2-bis(p-clorofenil)etilene (p,p'-DDE), 1,1-dicloro-2,2-bis-(4-clorofenil) etano (p,p'-DDD), ed infine o,p-DDT.

L'attività dell'enzima per ossidasi (HRP) utilizzato per marcare l'anticorpo diretto contro il p,p'-DDT è stata misurata elettrochimicamente in presenza di 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, come substrato enzimatico.

Il limite minimo di rilevabilità del p,p'-DDT è risultato essere pari a 40 pg ml⁻¹ e la riproducibilità, espressa come R.S.D., è risultata compresa nell'intervallo 1-3% nello stesso giorno di misura, e tra il 3 ed il 6% in giorni differenti. E' stato inoltre investigato l'effetto matrice in campioni di acque reflue provenienti da diversi impianti di depurazione. Da questo studio è emerso che la matrice ambientale non interferisce in maniera significativa con la misura del p,p'-DDT e dei suoi congeneri (Tabella 2).

Tabella 2. Studio di recupero per il DDT in campioni di acque reflue

Recovery values of p,p'-DDT in a pool of waste water samples

p,p'-DDT added (ng/ml)	Recovery (%)	R.S.D. (inter-day)
5.0	98	3
0.5	100	2
5.0×10^{-2}	100	3
5.0×10^{-3}	88	6

Data were obtained extracting the samples three times for three different days. Electrochemical determinations of each extracted sample were carried out in different days.

In definitiva, 10 campioni sono stati analizzati (dopo estrazione in dietiletere) con il metodo ELISA descritto in questo lavoro, per determinare quantitativamente il DDT, presente in tracce in tali matrici ambientali (Tabella 3).

Tabella 3.

Analysis of DDTs in urban waste waters

Waste water	p.p'-DDT (pg/ml)		
samples $(n = 3)$	Inlet	Outlet	
1	5 ± 0.2	n.d.ª	
2	5 ± 0.2	n.d.	
3	4 ± 0.2	n.d.	
4	3 ± 0.1	n.d.	
5	2 ± 0.1	n.d.	
б	2 ± 0.1	n.d.	
7	5 ± 0.1	n.d.	
8	5 ± 0.2	n.d.	
9	3 ± 0.2	n.d.	
10	3 ± 0.1	n.d.	

The concentration values represent: $\bar{x} \pm S.D.$

Il metodo si è dimostrato idoneo e sensibile per l'analisi di questi analiti presenti sia in campioni non sottoposti ad alcun pre-trattamento che in quelli sottoposti al processo di estrazione in solvente organico (qualora fosse necessario per-concentrare i campioni per ottenere livelli di sensibilità elevati).

I risultati di questo studio dimostrano che il dosaggio immunochimico con rivelazione elettrochimica in flusso è adatto per le analisi di routine del DDT in campioni ambientali di acque reflue e, selezionando opportuni anticorpi specifici, è possibile estenderlo in futuro, alla determinazione quantitativa di altri inquinanti ambientali.

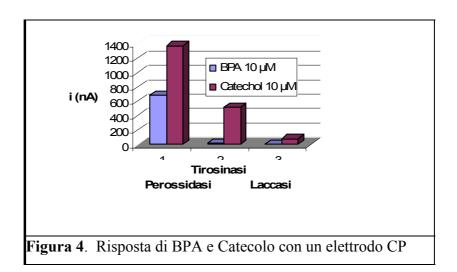
a n.d.: non-detectable.

Inoltre, tenendo conto dei livelli di sensibilità raggiunti in questo lavoro, tale metodo di analisi si presta molto bene alla determinazione del DDT in molte aree dove i livelli di concentrazione di questi composti sono significativamente al di sopra dei limiti previsti da organismi internazionali, quali: The World Health Organization (WHO) e The Food and Agriculture Organization (FAO).

Bisfenolo A

Per quanto riguarda l'analisi di questo modulatore endocrino, abbiamo sviluppato un biosensore elettrochimico per la misura del bisfenolo A⁹. Come per i composti fenolici in generale, è possibile la misura elettrochimica diretta del bisfenolo A; tuttavia essa è caratterizzata dalla passivazione della superficie elettrodica. Un metodo alternativo si è rivelato essere l'utilizzo di un biosensore con tirosinasi che catalizza l'idrossilazione di composti fenolici, con la conseguente ossidazione *o*-fenolo a *o*-chinone.

In questo lavoro di ricerca sono stati studiati diversi enzimi, quali tirosinasi, laccasi e perossidasi immobilizzati in un elettrodo a pasta di carbone (CP). La scelta dell'enzima è stata effettuata misurando la risposta di una stessa concentrazione di BPA e Catecolo, poiché, a causa del suo ingombro sterico, il BPA non è un buon substrato per questi enzimi, e il Catecolo, noto per essere un migliore substrato, è stato preso come riferimento. La composizione della pasta di carbone è stata: 10% in peso di enzima, 50% di grafite in polvere e 40% di olio minerale. In figura 4 sono riportati i segnali per il BPA e Catecolo. Dai risultati ottenuti è stato scelto per il prosieguo del lavoro l'enzima Tirosinasi.



Il biosensore con la tirosinasi con la composizione su descritta, in condizioni ottimizzate di pH, potenziale applicato (-150 mV) e concentrazione di enzima, ha mostrato limite di rilevabilità (LOD) di $0.2~\mu M$.

Per ottenere una maggiore sensibilità sono state studiate altre variabili nella composizione della pasta di carbone, quali il tipo di legante organico (il classico olio minerale, l'esadecano ed il dodecano) e diverse tipologie di carbone, in aggiunta alla polvere di grafite: polvere di carbone vetroso, nanotubi di carbonio a parete multipla e a parete singola.

In tabella 4 sono riportati i risultati ottenuti al variare del tipo di carbone, mentre in tabella 5 quelli ottenuti al variare del tipo di legante.

Tabella 4: Caratteristiche analitiche di differenti biosensori per BPA

Biosensors type	Linear range (µM)	Sensitivity (nA/µM)	Detection limit (µM)	Sensitivity $_{ m BPA}$ /Sensitivity $_{ m Catechol}$
Graphite Carbon Powder (GCP)	0.1-15	68	0.1	50
SWCP	0.1-12	138	0.02	71
MWCP	1-16	92	1	82

Tabella 5: Influenza del tipo di legante organico sulle caratteristiche analitiche del biosensore a BPA

Type of Oil	I _{BPA} /I _{Catechol} (%)	Sensitivity BPA (nA/µM)	Sensitivity Catechol (nA/µM)	Response Time (min)
Mineral Oil	55	65	117	5
Hexadecane	73	99	136	30
Dodecane	59	68	115	7

Dai dati si evince che l'elettrodo a CP realizzato con la polvere di grafite mostra il più ampio intervallo di linearità, ma che i due biosensori realizzati con i nanotube sono caratterizzati da una

maggiore sensibilità. Inoltre, il biosensore utilizzante i SWNT ha mostrato non solo la più alta sensibilità, ma anche il più basso LOD, grazie ad una bassa corrente di fondo e ad un più alto rapporto segnale/rumore. Il LOD ottenuto è stato pari a 0.02 μM (≅ 5 ppb).

Per quanto riguarda i tipi di leganti testati, una marcata differenza in termini di aumentata sensibilità è stata mostrata dall'uso dell'esadecano, probabilmente a causa di un suo miglior effetto solvente nei confronti del BPA. Tuttavia, questo ultimo ha mostrato un tempo di risposta più lungo ed anche una minore stabilità rispetto al biosensore realizzato con l'olio minerale, che è stata la scelta finale.

Riferimenti Bibliografici

- J. K. Fawell and W. F. Young, European Workshop on water quality and drinking water. Report of Proceedings, 11-14 May 1997, Baveno, Lago Maggiore.
- 2. M Castillo, D. Barcelò, Analytical Chemistry, 16, 1997, 574.
- 3. Council of the European Communities, Council Directive EC/96/22, Off. J. Eur. Communities L., L125, 3.1996.
- 4. A. Di Corcia, R. Curini, A. Gentili, R. Saperi, Environ. Sci. Technol., 24 (34), 2000, 534.
- 5. F. Valentini, D. Compagnone, A. Gentili and G. Palleschi, Analyst, 127, 2002, 1333–1337.
- 6. F. Valentini, D. Compagnone, G. Giraudi, G. Palleschi, Analytica Chimica Acta 487, 2003, 83–90.
- 7. E.C. Dodds, W. Lawson, Proceedings of Royal Society of Lords B 125 (1938) 222-232.
- 8. G. Volpe, D. Compagnone, R. Draisci and G. Palleschi, Analyst, 1998, 123, 1303
- 9. D.G. Mita, A. Attanasio, F. Arduini, N. Diano, V. Grano, U. Bencivenga, S. Rossi, A. Amine, D. Moscone, Biosensors and Bioelectronics, 23, 2007, 60-65.

VARIATION OF THE GENETIC EXPRESSION PATTERN AFTER EXPOSURE TO ESTRADIOL-17β AND 4-NONYLPHENOL IN MALE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

Ruggeri B. 1 , Ubaldi M. 2 , Lourdusamy A. 1 , Soverchia L. 1 , Ciccocioppo R. 1 , Hardiman G. $^{3, 4}$, Baker M.E. 5 , Palermo F 2 ., Polzonetti-Magni A.M. 2

Introduzione

Recenti evidenze hanno destato preoccupazione per l'incremento della presenza nell'ambiente di composti chimici capaci di distruggere il sistema endocrino, e quindi capaci di alterare lo sviluppo e la riproduzione degli animali causando danni notevoli alla biodiversità. Fra questi composti il 4-nonilfenolo (4-NP) è uno dei xeno estrogeni (EDs) più studiati a causa della sua ampia diffusione e la possibilità di accumulo nei sedimenti dei sistemi di acqua dolce e salata che causa conseguentemente un bioaccumulo nel tessuto adiposo degli organismi acquatici. Strumenti promettenti per lo studio dell'effetto del 4-nonilfenolo e di altri EDs sono i microarray perché questa tecnologia permette di analizzare simultaneamente l'espressione dei geni coinvolti nella risposta endocrina. L'analisi dell'intero trascrittoma di un organismo ha la potenzialità di delucidare le complesse azioni provocate dagli EDs quando interferiscono con i vari pathways ormone-dipendenti.

Un modello particolarmente attrattivo per lo studio del sistema endocrino è rappresentato da zebrafish. Esistono infatti numerosi ed approfonditi studi sul differenziamento e lo sviluppo di questo modello animale ed è possibile ottenere dei mutanti.

In questo contesto e sulla base del nostro interesse nel meccanismo di azione del 4-nonilfenolo (Polzonetti-Magni et al., 2004; Soverchia et al., 2007), abbiamo utilizzato un microarray in cui sono rappresentati 16399 geni di zebrafish per lo studio degli effetti sia del 4-nonilfenolo che dell'estradiolo- 17β (E2) in adulti di maschi di zebrafish.

In questo lavoro descriviamo come il 4-nonilfenolo oltre ad attivare i classici biomarkers estrogenodipendenti, come la vitellogenina, regoli anche l'espressione di geni che non sono regolati dall'estradiolo-17β.

Inoltre questo studio valida l'uso dei microarray per analizzare le complesse azioni causate dagli ED.

¹ Department of Experimental Medicine and Public Health, University of Camerino, via Madonna delle Carceri, 62032 Camerino (MC), Italy.

² Department of Morphological Sciences and Comparative Biochemistry, University of Camerino, via Gentile III da Varano, 62032 Camerino (MC), Italy.

³Biomedical Genomics Microarray Facility (BIOGEM),

⁴Department of Medicine, University of California San Diego, La Jolla CA 92093, USA.

⁵ Department of Medicine, 0693, University of California, San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, CA 92093-0693, USA.

Metodi

Disegno sperimentale. L'esperimento è stato eseguito allestendo tre vasche contenenti ognuna 30 animali in 80 litri di acqua. I gruppi sperimentali erano 3: il primo gruppo è stato sottoposto all'esposizione di 4-NP alla concentrazione di 10-7 M, il secondo gruppo è stato esposto a estradiolo-17β alla stessa concentrazione, l'ultimo gruppo era ospitato in una vasca solo con acqua come controllo negativo.

Le esposizione sono state condotte in un sistema di flusso continuo in modo da mantenere costante la concentrazione dei composti nell'acqua durante tutte e tre le settimane dell'esperimento.

Alla fine di questo periodo i pesci sono state sacrificati, il fegato rimosso e immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -70 °C. Sono state anche condotte analisi istologiche mediante colorazione con ematossilina-eosina per confermare l'omogeneità del tessuto. Il sangue è stato prelevato dal cuore in siringhe eparinizzate e poi conservato in ghiaccio. Dopo la centrifugazione il plasma è stato congelato in ghiaccio secco e conservato a -70 °C.

Preparazione dell'RNA, marcatura fluorescente e ibridizzazzione. L'RNA totale è stato isolato dal fegato di singoli individui utilizzando TRIzol. L'RNA totale epatico è stato ulteriormente purificato utilizzzando un apposito kit (RNeasy Mini kit). Le concentrazione sono state determinate pr via spettrofotometrica e l'integrità dell'RNA accertata tramite Agilent bioanalyzer. Solo i campioni che non mostravano degradazione (28S/18S > 1.8) sono stati utilizzati per la marcatura. L'RNA totale è stato convertito in cRNA marcanto in maniera fluorescente utilizzando un apposito kit (Agilent low RNA input fluorescent linear amplification kit). I microarray sono stati ottenuti da Norwegian Microarray Consortium (http://www.mikromatrise.no/). Questo microarrai è stato costruito utilizzando utilizzando una libreria di oligo di zebrafish acuistato da Sigma Genosys. Il set di oligo consiste di oligonucleotidi lunghi 65 bp che rappresentano 16399 geni di zebrafish. Ogni ibridazione (controllo vs. campione esposto) è stato ripetuto invertendo i marcatori fluorescenti (Cy3 e Cy5).

Analisi statistica dei dati di microarray. Le intensità degli spot sono state estratte dopo la scansione dell'array con il software GenePix 6.1. I dati sono stati normalizzati utilizzando il metodo LOWESS. I geni differenzialmente espressi sono stati selezionati tramite un t-test. Gli pvalue calcolati sono stati corretti per comparazione multiple utilizzando il metodo di Benjamini and Hochberg. I geni sono stati considerati differenzialmente espressi quando il pvalue corretto era più piccolo di 0.05 ed il fold change era maggiore o minore di |0.8|. Utilizzando DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) sono state analizzate le categorie di Gene Ontology ed i pathways KEGG in cui ricadevano i geni differenzialmente espressi.

<u>Determinazine dei liveli di VTG mediante ELISA:</u> la concentrazione di VTG nel plasma è stata determinata utilizzando un kit ELISA per VTG di zebrafish. Le concentrazioni di VTG misurate sono state normalizzate al volume (ml) del campione corrispondente tenendo conto della diluizione. *Risultati*

In totale 425 geni sono risultati differenzialmente espressi in risposta al trattamento con 4-NP e 153 in risposta al trattamento con E2. Una lista dei geni differenzialmente espressi in risposta ai due trattamenti è riportata in figura 1.

Entrambi i composti sono capaci di elevare l'espressione della vitellogenina 1 e il 4-NP induce un'espressione due volte più elevata dell'E2. D'altro canto l'E2 è capace di elevare anche l'espressione della vitellogenina 3.

4-NP e E2 inducno il gene che codifica per growth/differentiation factor 7, ubiquitin and transferrin- a. Gdf7 (Growth/differentiation factor 7) è un membro della famiglia delle Bone Morphogenetic Protein (BMP) ed è coinvolto nella morfogenesi e nel differenziamento (Settle et al., 2001). I livelli di RNA della transferrina sono influenzati dal trattamento con etinilestradiolo in *Xenopus laevis*. Lo stesso tipo di trattamento influenza anche l'espressione della vitellogenina (Urbatzka et al., 2007).

I nostri risultati dimostrano un aumento dell'espressione della transferrina nel fegato dopo entrambi i trattamenti, e sono coerente con altri risultati che dimostrano che tale gene ha un elemento di risposta estrogenico (Mikawa et al., 1996).

L'analisi mostra che i geni regolati dal 4-NP cadono in categorie funzionali correlate con la regolazione dei processi cellulari, sviluppo, morfogenesi e biosintesi. E' interessante l'osservazione che un numero significativo di geni modulati dal 4-NP codificano per proteine ribosomali.

Per quanto riguarda l'E2 l'analisi funzionale mostra che i geni espressi sotto trattamento con estradiolo ricadono in categorie funzionali correlate con il metabolismo, compreso il metabolismo di amine e aminoacidi e con l'omeostasi cellulari. Inoltre i geni modulati dall'estradiolo sono coinvolti nel metabolismo delle purine, pirimidine ed acidi grassi (Ruggeri et al., 2008).

In generale entrambi i trattamenti sembrano indurre un elevato turnover delle proteine elevadodo l'espressione di geni coinvolti nella proteolisi e quelli che costituiscono i ribosomi.

I due trattamenti regolano alcuni geni in direzioni opposte. Tra questo troviamo la fatty-acid synthase che è regolata in senso negativo dal 4-NP. La fatty acid sinthase (FASN) è espressa nelle cellule sensitive agli ormoni ed in cellule con un elevato metabolismo dei lipidi. Inoltre FASN è espressa anche nelle cellule in proliferazione durante lo sviluppo (Kusakabe et al., 2000).

Un differente pattern di espressione fra i due trattamenti è stato osservato in geni coinvolti nello stress ossidativo. L'espressione della glutatione perossidasi è indotta da E2 mentre è repressa da 4-

NP. Lo stesso caso si verifica per la glutatione s-transferasi, un altro enzima coinvolto nel metabolismo del glutatione. Come è noto la coniugazione del glutatione ad una varietà di substrati, compresi i prodotti del danno ossidativo è un'importante processo di detossificazione. In base ai nostri risultati si osserva che E2 induce il meccanismo di detossificazione mentre 4-NP inibisce questo meccanismo di protezione cellulare.

Conclusioni

Nel complesso questi risultati dimostrano come l'approccio dei microarray può contribuire in maniera significativa alla comprensione delle variazioni del pattern di espressione indotto da E2 e 4-NP in zebrafish. I nostri risultati mostrano come la tecnica degli array può essere efficace nel dissezionare gli effetti sull'espressione genica da parte degli ormoni e degli inquinanti ambientali che mimano gli effetti degli ormoni. Le nostre osservazioni mostrano che l'estradiolo e lo xenoestrogeno 4-nonilfenolo possono modulare l'espressione di alcuni geni in maniere differenti, suggerendo che 4-NP è capace di agire tramite un pathway alternativo a quello utilizzato dagli estrogeni.

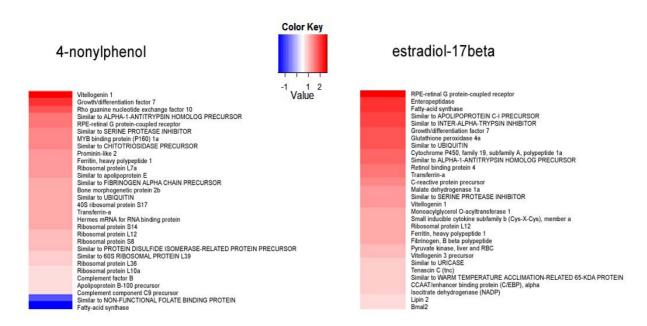


Figura 1- Heatmap dei geni maggiormente modulati dai due trattamenti

Bibliografia

- Kusakabe, T., Maeda, M., Hoshi, N., Sugino, T., Watanabe, K., Fukuda, T., and Suzuki, T. 2000. Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormone-sensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells. J.Histochem.Cytochem. 48, 613-622.
- Mikawa, N., Hirono, I., and Aoki, T. 1996. Structure of medaka transferrin gene and its 5'-flanking region. Mol.Mar.Biol.Biotechnol. 5, 225-229.
- Polzonetti-Magni, A. M., Mosconi, G., Soverchia, L., Kikuyama, S., and Carnevali, O. 2004. Multihormonal control of vitellogenesis in lower vertebrates. Int.Rev.Cytol. 239, 1-46.

- Settle, S., Marker, P., Gurley, K., Sinha, A., Thacker, A., Wang, Y., Higgins, K., Cunha, G., and Kingsley, D. M. 2001. The BMP family member Gdf7 is required for seminal vesicle growth, branching morphogenesis, and cytodifferentiation. Dev.Biol. 234, 138-150.
- Ruggeri B, Ubaldi M, Lourdusamy A, Soverchia L, Ciccocioppo R, Hardiman G, Baker ME, Palermo F, Polzonetti-Magni AM. 2008. Variation of the genetic expression pattern after exposure to estradiol-17beta and 4-nonylphenol in male zebrafish (Danio rerio). Gen Comp Endocrinol. In press.
- Soverchia, L., Mosconi, G., Palermo, F., Ruggeri, B., Ubaldi, M., Franzoni, M.F., Polzonetti-Magni A.M. 2007. Molecular strategies and xenoestrogen dependent effects on fish and amphibian reproductive cascade. Evolutionary and molecular strategies and plasticity. Research Signpost, Kerala, India. Canonaco and Facciolo eds. 95-112.
- Urbatzka, R., Bottero, S., Mandich, A., Lutz, I., and Kloas, W. 2007. Endocrine disrupters with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of Xenopus laevis: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. Comp Biochem.Physiol C.Toxicol.Pharmacol. 144, 310-318.

Sessione "Polifenoli e chemioprevenzione"

ATTIVITÀ ANTITUMORALE DELLE CATECHINE DEL TÈ VERDE: UN PERCORSO DI RICERCA TRANSAZIONALE DAI DATI DI LABORATORIO AI RISULTATI CLINICI

Saverio Bettuzzi

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Parma, Italy. E-mail: saverio.bettuzzi@unipr.it

L'incidenza del cancro della prostata (CaP) aumenta costantemente nei Paesi Occidentali ed ormai si classifica al secondo posto come causa principale di morte specifica per cancro fra gli uomini in Europa. In un recente congresso della Società Italiana di Urologia è stato annunciato che ormai è diventata la prima causa di morte per tumore in Italia. Il CaP rappresenta perciò non solo un notevole problema sanitario ma anche un grosso problema sociale in considerazione dell'ampia popolazione coinvolta e dei costi sanitari. Una caratteristica particolare del CaP è che si tratta di una malattia che procede molto lentamente: infatti, la diagnosi viene posta di solito in età avanzata. Inoltre è noto che lo stile di vita e l'alimentazione giocano un ruolo molto importante nella predisposizione verso questa patologia. Per queste ragioni il CaP è un obiettivo ideale per strategie di chemioprevenzione. Attualmente si considera che, dal momento che nessuna terapia si è dimostrata efficace quando la malattia diventa aggressiva, una efficace chemioprevenzione potrebbe rappresentare il miglior approccio terapeutico possibile.

Numerose evidenze sperimentali raccolte in laboratorio hanno recentemente suggerito che le componenti biologicamente attive del tè verde sono le catechine. Tra queste, le molecole più comuni presenti nell'infuso sono EGCG, EGC, ECG ed EC. Per questi composti, ed in particolare per EGCG, è stata da tempo dimostrata un'attività anti-tumorale in numerosi sistemi cellulari e in vitro. Recentemente il nostro gruppo di ricerca (1) ha dimostrato che un estratto di Tè Verde ricco di Catechine (GTC) era molto efficace nell'inibire la progressione del CaP sia in vitro (in modelli cellulari) che in vivo in un modello animale transgenico di sviluppo del CaP chiamato TRAMP. Nei topi TRAMP l'antigene SV40, che viene espresso in modo androgeno-dipendente in modo specifico nella prostata, scardina il controllo del ciclo cellulare ed induce una spinta proliferativa che porta allo sviluppo del CaP secondo fasi di progressione che assomigliano a quelle manifestate dalla malattia umana. I dati da noi raccolti suggeriscono che l'estratto GTC è in grado di provocare la morte apoptotica selettiva di cellule di cancro attraverso l'induzione della forma nucleare di Clusterina, una proteina dalle proprietà pro-apoptotiche che controlla la proliferazione dell'epitelio prostatico, mentre lascia invece intatte le cellule benigne.

Al di là dei promettenti risultati ottenuti in laboratorio, nessuno era finora stato in grado di dimostrare una reale attività antitumorale in pazienti umani. Per questa ragione, incoraggiati dai dati pre-clinici, abbiamo condotto uno studio clinico pilota su una coorte di 60 volontari umani portatori della lesione pre-neoplastica HG-PIN (neoplasia prostatica intraepiteliale di alto grado). La lesione

microscopica HG-PIN viene diagnosticata mediante esame anatomo-patologico di una sezione di tessuto prostatico prelevata mediante agobiopsia transrettale e si considera che rappresenti la più importante lesione pre-neoplastica che precede la diagnosi di CaP clinico. Studi precedenti hanno dimostrato che un anno dopo la diagnosi di HG-PIN, circa il 30% dei pazienti mostra evidenze anatomo-patologiche di CaP clinico dopo biopsia ripetuta. I pazienti portatori di HG-PIN pertanto, pur non mostrando la malattia in modo conclamato al momento dell'individuazione della lesione pre-neoplastica, hanno circa il 30% di probabilità di sviluppare la malattia in forma clinica entro un anno e quindi rappresentano una popolazione ad alto rischio di sviluppo del CaP. Per questa ragione rappresentano un bersaglio selettivo nel quale testare le proprietà antitumorali dell'estratto GTC. Abbiamo quindi reclutato 60 di questi soggetti per lo studio clinico di chemioprevenzione.

A questi pazienti sono stati somministrati 600mg/die di GTC (n = 30) oppure placebo (n = 30) per 1 anno in condizioni di doppio-cieco. L'estratto GTC, virtualmente privo di caffeina e composti correlati, veniva controllato per composizione e purezza mediante HPLC e risulta così composto: EGC 5,5%; EC 12,24%; EGCG 51,88%; ECG 6,12%; catechine totali 75,7%; caffeina < 1%. Alla fine dello studio, solamente 1 tumore è stato diagnosticato fra i soggetti trattati con GTC, mentre 9 cancri sono stati diagnosticati fra i soggetti trattati con placebo. Nessun effetto collaterale o avverso di rilevo è stato registrato nel corso dello studio. Questo risultato è altamente significativo in termini statistici ed equivale ad una inibizione del 90% della progressione del CaP in seguito a somministrazione orale di GTC (2).

Al momento, questo risulta essere il primo studio clinico che dimostra l'efficacia chemiopreventiva della somministrazione di GTC per il trattamento di lesioni pre-maligne prima che il CaP si sviluppi in modo clinicamente evidente. Questo risultato rappresenta quindi un importante risultato di ricerca traslazionale e dimostra che terapie basate sull'uso di sostanze naturali possono essere estremamente efficaci e sicure per la salute umana. E' evidente comunque che questi importanti risultati richiedono una conferma con uno studio su più larga scala, studio che infatti è attualmente in atto negli USA.

Ma rimane ancora un altro importante problema: occorre infatti capire se la progressione del CaP sia stata solo ritardata (effetto citostatico) o se il trattamento sia riuscito a prevenire in modo definitivo la malattia (effetto citotossico). Per rispondere a questa importante domanda, siamo riusciti a convincere approssimativamente il 50% dei pazienti di entrambe i bracci dello studio a sottoporsi ad un altro mapping prostatico mediante agobiopsia 2 anni dopo la sospensione del trattamento con GTC. Abbiamo così potuto diagnosticare 1 ulteriore cancro nei soggetti precedentemente appartenenti alla coorte GTC, contro 2 in quelli che precedentemente appartenevano alla coorte placebo. Così, 3 anni dopo l'inizio dello studio e 2 anni dopo la

sospensione del trattamento con GTC, i risultati finali sono i seguenti: 11 cancri in volontari che rappresentano il braccio di controllo, contro solamente 2 in quelli trattati con GTC per 1 anno. La situazione clinica complessiva dei soggetti non è pertanto variata, suggerendo che l'effetto della somministrazione di GTC sia citotossico e particolarmente efficace nelle fasi precoci di trasformazione neoplastica. In generale, il trattamento con GTC ha quindi portato ad una riduzione complessiva dell'80% della diagnosi di CaP (dal 53% all'11%). Questo risultato suggerisce che, oltre agli ovvi benefici per i pazienti, il nostro approccio clinico può anche portare ad ottenere una importante diminuzione dei costi sanitari (3).

Il fatto che un significativo beneficio sia già comparso dopo un trattamento di soli sei mesi (2) e permanga anche 2 anni dopo la sospensione del trattamento (3) suggerisce un effetto terapeutico dell'estratto GTC sulle lesioni precoci. I nostri dati suggeriscono quindi che lo sviluppo del CaP potrebbe essere interdetto in modo definitivo in soggetti portatori della lesione pre-neoplastica HG-PIN dopo somministrazione di 600mg/die di GTC per un solo anno. Questo approccio originale e innovativo potrebbe quindi cambiare lo scenario complessivo del management clinico di questa malattia estremamente elusiva e refrattaria alle terapie convenzionali. La chemioprevenzione mediante GTC si candida quindi a riempire un importante vuoto terapeutico in pazienti ad alto rischio di sviluppo della malattia, soddisfando inoltre un importante bisogno sanitario e sociale.

Questi risultati ci insegnano anche che studi atti a identificare composti attivi e potenziali farmaci di origine naturale possono essere molto produttivi ed aprire nuovi scenari per approcci clinici nuovi ed efficaci anche per malattie antiche.

- 1. A. Caporali, et al., Carcinogenesis 25, 2217-2224 2004.
- 2. S. Bettuzzi et al., Cancer Res. 66, 1234-1240 2006.
- 3. Brausi, Rizzi e Bettuzzi, Eur. Urol. 54, 472-473, 2008.

RECENT ADVANCES IN POLYPHENOL BIOAVAILABILITY, CATABOLISM AND PUTATIVE MECHANISM OF ACTION

Daniele Del Rio¹, Furio Brighenti¹, Alan Crozier²

¹Human Nutrition Unit, Department of Public Health, University of Parma, Parma, Italy

² Plant Products and Human Nutrition Group, Graham Kerr Building, Division of Environmental and Evolutionary Biology, Faculty of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow

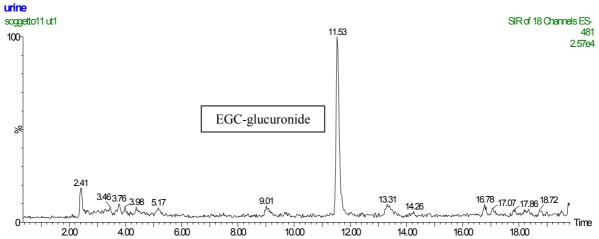
There is considerable evidence supporting the notion that free radicals may act as a catalyst for development of several chronic diseases. Several phytochemical constituents of foods and beverages, in particular a class of compounds termed polyphenols, have been avidly investigated in recent years. A number of intervention studies in human subjects and animals, using polyphenol rich foods and beverages derived from grape, tea, cocoa and berries have demonstrated beneficial effects against the onset and development of these diseases, probably for the ability of these compounds to counteract oxidative stress (1).

However, before conclusions can be drawn on the potential in-vivo effects of polyphenols on human health, a more complete understanding of the mechanisms of absorption, bioavailability and biotransformations occurring to these compounds is necessary. For example, recent studies indicate that following tea consumption catechins are metabolised and circulate within the body as sulphated, methylated or glucuronidated derivatives (2 - 4). Absorption is believed to occur through the small intestine as bacterial degradation within the colon is hypothesised to break down the flavonoids into smaller phenolic acids (5). Similarly, the major site for absorption for flavonols glucosides is believed to be the small intestine where they are hydrolysed by β -glucosidases to the aglycone form which is further conjugated to glucuronic acid or sulphate prior to absorption. (6). Flavonol diglycosides, such as rutin (quercetin-3-rutinoside), are not hydrolysed in the small intestine but pass to the large intestine where small quantities are absorbed with the remainder being subject to catabolism by the colonic microflora yielding to simple phenolic acids, such as 3,4-dihydroxyphenylacetic acid 3-hydroxyphenylacetic acid, which are absorbed into the circulatory system prior to excretion in urine in quantities corresponding to ca. 25% of intake (7).

This presentation will deal with the most recent advances made in the field of polyphenol bioavailability, catabolism and effects, paramount steps to investigate in detail the mechanisms through which these dietary components could protect the human body from several diseases.

Bioavailability should be considered at first, as without knowing the fate of polyphenols after ingestion, the task of defining the putative protective action of such molecules becomes impossible. The HPLC separation coupled with tandem mass spectrometry (Figure 1) has recently become the gold standard for this sort of research. Its application, also, allows researchers to identify chemical modifications occurring at various levels in the human body. In addition, the use of ileostomy

volunteers could help understanding where polyphenols are principally catabolised and which forms are more absorbable.



<u>Figure 1</u>: An example of HPLC-MS chromatogram of a urine sample after green tea intake. The peak represents Epigallocatechin glucuronide and can be easily identified thanks to mass spectrometry.

As a second issue, investigators should consider the actual benefits of polyphenols towards degenerative diseases. This goal could be reached by using appropriate in vitro and in vivo models and by applying physiological doses of phenolics in each experiment (Figure 2). Moreover, the identification of circulating or excreted catabolites is fundamental for basic experimental protocols, as those are the very molecules that should be put in direct contact with cultured cells. However, the misleading habit of putting cultured cell through extremely highconcentrations of unmetabolised polyphenols, perhaps because of its simplicity, remains an entrenched practice.

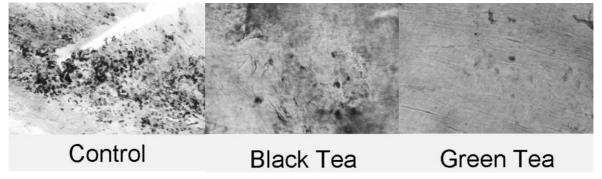


Figure 2: Photomicrographs of hamster aortic arches after 12 weeks on an atherogenic diet (control) and 12 weeks on an atherogenic diet supplemented with physiological doses (equivalent to 275 mL of beverage consumed on a daily base by a 70 kg human) of either green tea or black tea. The micrographs are examples of the aortic arch surface covered by lipid inclusion in the intima with lipids (dark in the black and while picture). Taken from [8].

The case of neurodegenerative disease is a clear example of misleading research, where most of the literature is claiming neuroprotective effects on polyphenols trying to demonstrate their direct access to the central nervous system. In this context we have previously demonstrated that catechins are unable to cross the blood brain barrier at physiological concentration (i.e. after a healthy cup of tea) (Figure 3). However, this observation is not intended to rule out the hypothesis of a putative protective effect of these dietary components towards neurodegenerative diseases, but the mechanisms that should be hypothesised and studied are different.

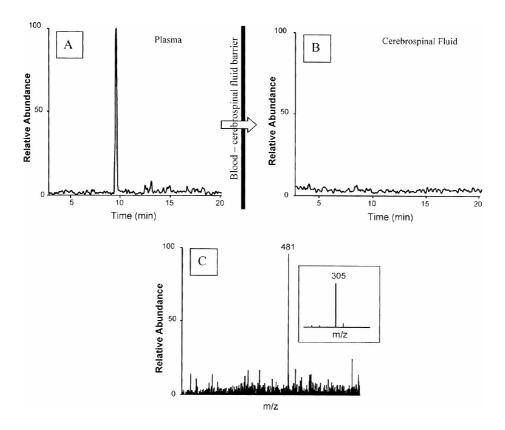


Figure 3: (A) Gradient reversed phase HPLC analysis of an extract of human plasma collected 1 h after green tea consumption with mass spectrometric detection at m/z 481; (B) Mass spectrometric detection (m/z 481) of an extract of CSF collected 2 h following consumption of green tea; (C) MS¹ spectrum of the peak shown in panel A, inset illustrates MS² spectrum confirming the identity of this peak as an (-)-epigallocatechin glucuronide. (Taken from [9]).

Finally, an intriguing new hypothesis is recently winning the day. Based on the observation that the vast majority of plant polyphenols are scarcely or also negligibly absorbed through the small and large intestine, the idea that the unabsorbed fraction could exert some protective effect is gaining attention. One of the possible mechanisms is related to the interaction of polyphenols with the gut microbiota, characterised by an action similar to that of dietary fiber (10).

References

- 1. Sang S, Hou Z, Lambert JD, Yang CS. Redox properties of tea polyphenols and related biological activities. Antioxid Redox Signal. 2005 Nov-Dec;7(11-12):1704-14.
- 2. Piskula MK, Terao J.Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. J Nutr. 1998 Jul;128(7):1172-8.
- 3. Meng X, Sang S, Zhu N, Lu H, Sheng S, Lee MJ, Ho CT, Yang CS. Identification and characterization of methylated and ring-fission metabolites of tea catechins formed in humans, mice, and rats. Chem Res Toxicol. 2002 Aug;15(8):1042-50.
- 4. Lee MJ, Maliakal P, Chen L, Meng X, Bondoc FY, Prabhu S, Lambert G, Mohr S, Yang CS. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002 Oct;11(10 Pt 1):1025-32.
- 5. Kim DH, Jung EA, Sohng IS, Han JA, Kim TH, Han MJ. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Arch Pharm Res. 1998 Feb;21(1):17-23.
- 6. Mullen W, Edwards CA, Crozier A. Absorption, excretion and metabolite profiling of methyl-, glucuronyl-, glucosyl- and sulpho-conjugates of quercetin in human plasma and urine after ingestion of onions. Br J Nutr. 2006 Jul;96(1):107-16.
- 7. Jaganath IB, Mullen W, Edwards CA, Crozier A. The relative contribution of the small and large intestine to the absorption and metabolism of rutin in man. Free Radic Res. 2006 Oct;40(10):1035-46.
- 8. Rouanet M, Décordé K, Del Rio D, Auger C, Borges G, Cristol JP, Lean MEJ, Crozier A. Berry juices, teas, antioxidants and the prevention of atherosclerosis in hamsters. Br J Nutr., *in press*.
- 9. Zini A, Del Rio D, Stewart AJ, Mandrioli J, Merelli E, Sola P, Nichelli P, Serafini M, Brighenti F, Edwards CA, Crozier A. Do flavan-3-ols from green tea reach the human brain? Nutr Neurosci. 2006 Feb-Apr;9(1-2):57-61.
- 10. Tzounis X, Vulevic J, Kuhnle GG, George T, Leonczak J, Gibson GR, Kwik-Uribe C, Spencer JP. Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora.Br J Nutr. 2008 Apr;99(4):782-92.

ANTIOSSIDANTI E ALIMENTAZIONE: RUOLO DEI FATTORI STECHIOMETRICI E CINETICI NEL PREVENIRE DANNI DIRETTI O INDIRETTI GENERATI DALLA PRESENZA DI RADICALI LIBERI ALTAMENTE REATTIVI

De Marco Veronica, Rigo Adelio, Rossetto Monica, Scarpa Marina ¹, Vanzani Paola, Zennaro Lucio

INBB sezione di Padova, Dipartimento di Chimica Biologica, Università degli Studi di Padova, Padova ¹Dipartimento di Fisica Università degli Studi di Trento, Trento.

In questi ultimi anni si è molto dibattuto sul ruolo di alcuni composti appartenenti alla categoria dei polifenoli, quali ad esempio i flavonoidi, nell'aumentare la capacità antiossidante del plasma umano. Questi composti, genericamente classificati come antiossidanti sono presenti in molti alimenti di origine vegetale. Tuttavia poiché la biodisponibilità dei composti fenolici assunti attraverso la dieta è limitata, nel plasma la concentrazione massima è dell'ordine della micromole L⁻¹. Per contro la capacità antiossidante del plasma umano è dell'ordine di circa 1 mmole L⁻¹, appare quindi evidente che l'incidenza dei polifenoli nell'aumentare l'attività antiossidante del plasma è molto limitata (1).

L'azione protettiva dei polifenoli, avvalorata da molti studi epidemiologici, è invece molto importante in altri compartimenti del corpo umano, ad esempio nell'apparato gastro-intestinale (GI). Infatti in questo distretto possono avvenire una serie di processi che coinvolgono radicali altamente reattivi che sono responsabili di danni diretti e indiretti. Alcuni dei danni ossidativi diretti alle strutture del tratto GI, possono portare alla formazione di tumori (2). Fra i danni indiretti si possono considerare la distruzione delle vitamine e carotenoidi (3) presenti negli alimenti, distruzione che incide sulle loro caratteristiche nutrizionali, e la formazione di composti altamente elettrofili che hanno attività cito-tossiche e geno-tossiche (4). Fra questi ultimi i perossidi degli acidi grassi insaturi o loro derivati, che si formano a seguito di reazioni che coinvolgono radicali durante il processo digestivo e possono essere inglobati nei chilomicroni, e conseguentemente nelle VDL e LDL, concorrendo alla formazione delle placche aterosclerotiche e all'insorgenza di patologie cardiovascolari (5). Un' alimentazione ricca di antiossidanti, la cui concentrazione in molti alimenti di tipo vegetale arriva alla decina di □mole/g, può contribuire a ridurre drasticamente e/o a prevenire danni ossidativi nel tratto gastrointestinale grazie all'assenza di problemi di biodisponibilità.

Uno dei processi che determina la formazione dei composti altamente elettrofili sopracitati è la perossidazione lipidica generata dall'interazione fra i lipidi insaturi e tracce di ferro assunti con la dieta, vedi ad esempio la Figura 1. Questa Figura dimostra chiaramente come in presenza di tracce di ferro-eme, anche a concentrazioni dell'ordine delle micromoli L⁻¹, inizia una veloce perossidazione degli acidi grassi insaturi, quali ad esempio l'acido linoleico, che porta

rapidamente alla scomparsa dell'ossigeno presente nel sistema. Questo processo può essere schematizzato nel seguente modo:

1) Fe-Hb-O₂ + - CH₂ - CH = CH -
$$\rightarrow$$
 - C(H) O $^{\circ}$ - CH = CH -

2) - C(H) O° – CH = CH - + - CH₂ – CH = CH -
$$\rightarrow$$
 - C(H)OH – CH = CH - + - CH° – CH = CH -

3)
$$- CH^{\circ} - CH = CH - + O_2 \rightarrow - C(H) OO^{\circ} - CH = CH -$$

4)
$$- C(H) OO^{\circ} - CH = CH - + - CH_2 - CH = CH - \rightarrow - C(H)OOH - CH = CH - + - CH^{\circ} - CH = CH -$$

dove le reazioni 3) e 4) rappresentano una catena cinetica che consuma l'ossigeno molecolare presente nel sistema e porta alla formazione di perossidi degli acidi grassi insaturi.

L'aggiunta al sistema di molecole antiossidanti, come ad esempio flavonoidi, comporta una forte inibizione del processo di perossidazione lipidica grazie all'attività di "chain breaking "tipica dei composti fenolici:

5) - C (H)
$$OO^{\circ}$$
 - CH = CH - + A-OH \rightarrow - C (H) OOH - CH = CH - + A-O $^{\circ}$

dove A-OH è un polifenolo e A-O $^{\circ}$ il corrispondente radicale caratterizzato da una reattività molto più bassa di quella del radicale perossidico - C(H) OO $^{\circ}$ - CH = CH -.

Per valutare correttamente le proprietà degli antiossidanti nell'inibire il processo di perossidazione, e in particolare lo scavenging dei radicali liberi che si formano nelle reazioni a catena (equazioni 3 e 4) si devono considerare due distinti parametri e cioè il numero dei radicali bloccati da una molecola di antiossidante e l'efficienza con cui queste molecole presenti negli alimenti bloccano il processo prima che questi radicali altamente reattivi possano provocare danni a molecole o strutture biologiche fondamentali quali membrane, DNA e proteine. Il primo parametro, legato alla stechiometria del processo, è stato oggetto di numerosissimi studi, mentre il valore del secondo, che dipende dalle costanti cinetiche del processo, non è noto per molti antiossidanti.

Gli alimenti in genere contengono una grande varietà di antiossidanti e sono perciò difficilmente confrontabili anche a causa della difficoltà di valutare l'attività antiossidante di matrici molto diverse fra loro, ad esempio frutta, bevande, verdure. La totalità degli studi compiuti su questo argomento ha avuto come obiettivo la misura della quantità di specie reattive bloccate da ciascun alimento, che si effettua mediante una vera e propria titolazione degli antiossidanti presenti (6) e tutti gli articoli, pubblicati sulla stampa scientifica e non, fanno riferimento solo a questa caratteristica determinata dalla stechiometria del processo di scavenging. Inoltre nella maggior

parte dei casi si utilizzano radicali aventi un tempo di vita estremamente lungo, vedi ad esempio il radicale della difenilpicrilidrazide (DPPH°) o il radicale catione ABTS°⁺, cioè radicali dotati di scarsissima reattività, che quindi hanno ben poco da spartire con i radicali perossidici caratterizzati da tempi di emivita ben inferiori al secondo.

A partire da queste considerazioni abbiamo sviluppato un metodo, che richiede una strumentazione molto semplice, e può essere applicato in condizioni molto simili a quelle presenti nel piccolo intestino, dove avviene la digestione e l'assorbimento di una gran parte dei componenti fondamentali degli alimenti. Sulla base di un modello matematico sviluppato, a partire dalle reazioni sopra-riportate, si è in grado di ottenere, mediante un singolo esperimento, i due parametri che sono legati alla capacità e all'efficienza degli antiossidanti nel bloccare i radicali perossidici. Questi parametri sono stati definiti: PRTC (Peroxyl Radical Trappig Capacity) e PRTE (Peroxyl Radical Trapping Efficiency) (7). In particolare il PRTC rappresenta il numero di radicali bloccati per mole di antiossidante mentre il PRTE rappresenta l'inverso dell' IC₅₀, che è la concentrazione di antiossidante che dimezza la concentrazione dei radicali perossidici.

Sorprendentemente abbiamo constatato che il metodo e il sistema di calcolo da noi sviluppati permettono di ottenere i due parametri sopra definiti praticamente per tutti gli alimenti che contengono composti fenolici. Infatti per questi alimenti, in cui è sempre presente una grande varietà di questi composti aventi generalmente valori di PRTC e PRTE molto diversi fra loro, le equazioni cinetiche sono irrisolvibili dato il grande numero di variabili, e quindi il modello da noi sviluppato basato sulla presenza di un singolo antiossidante in linea di principio non poteva essere impiegato. Tuttavia abbiamo constatato per la quasi totalità degli alimenti presi in considerazione per le loro proprietà antiossidanti, un perfetto fitting (R²>0.99) fra i dati sperimentali e quelli calcolati sulla base del modello sviluppato assumendo la presenza di un solo antiossidante. In altre parole i vari alimenti considerati si comportano come se in essi fosse presente un singolo antiossidante in grado di reagire con i radicali perossidici in accordo ad una cinetica di primo ordine rispetto ai radicali perossidici stessi, la cui concentrazione nello stato stazionario è regolata dalle reazioni di terminazione che avvengono fra i radicali stessi e fra i radicali e gli antiossidanti. Questo comportamento consente di attribuire a ciascun alimento valori ben definiti e caratteristici di PRTC e PRTE, permettendo così la loro comparazione sia su basi stechiometriche che su basi cinetiche.

Come esempio nelle Figure 2 e 3 sono riportate le tracce ossigrafiche relative alla misurazione del PRTC e PRTE di due alimenti, che sono spesso considerati per le loro proprietà antiossidanti, quali il radicchio rosso e il tè, in cui sono presenti svariati tipi di antiossidanti caratterizzati da

differenti valori di PRTC e PRTE. Ad esempio nel caso del radicchio rosso, riportato in Fig. 2, le concentrazioni degli antiossidanti più importanti presenti, espresse come micromole di antiossidante/g di prodotto fresco sono antocianine 1.9, acido gallico 0.9, acido protocatechico 1.7, acido clorogenico 7.1, acido cicorico 0.8 che sono caratterizzati da valori di PRTC compresi fra 3 e 10 e di PRTE compresi fra 0.2 e 7 (8).

Nell'inserto di ciascuna delle due Figure è riportato il risultato della linearizzazione dei dati sperimentali sulla base del modello cinetico da noi proposto per un singolo antiossidante. I valori di R² ottenuti in questo caso, >> di 0.99, indicano chiaramente che dal punto di vista cinetico i due alimenti si comportano come se in essi fosse presente un singolo antiossidante e quindi con valori di PRTC e PRTE tipici. Questo comportamento sembrerebbe indicare che in presenza di radicali estremamente reattivi gli antiossidanti presenti negli alimenti e i loro prodotti di reazione interagiscono mutualmente fino a comportarsi come un unico antiossidante caratterizzato da valori di PRTE che possono essere eguali, maggiori o minori di quelli aspettati in base alla composizione in termini di antiossidanti dell'alimento, e mettendo così in luce eventuali effetti sinergici o antisinergici. Inoltre l'assenza di correlazioni fra i valori di PRTC e PRTE fa si che alcuni alimenti siano caratterizzati da elevati valori di PRTC e bassi valori di PRTE (ad esempio cioccolata) o viceversa (ananas). Sulla base della capacità o dell'efficienza è così possibile ottenere scale di attività antiossidante molto differenti e, in relazione alle condizioni esistenti nell'apparato gastrointestinale, è possibile stabilire l'effetto protettivo dei vari alimenti in base ai valori di PRTC o PRTE che li caratterizzano.

Riferimenti bibliografici

- [1] Scalbert, A.; Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J. Nutr. 130: 2073S-2085S; 2000.
- [2] Kanazawa, A.; Sawa, T.; Maead, H. Dietary lipid peroxidation products and DNA damage in colon carcinogenesis. *Eur. J. Lipid Sci.* **104**: 439-447; 2002.
- [3] Gorelik, S.; Lapidot, T.; Shaham, I.; Granit, R.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J. Lipid peroxidation and coupled vitamin oxidation in simulated and human gastric fluid inhibited by dietary polyphenols: Health implications. *J. Agric. Food Chem.* **53**:3397-3402; 2005.
- [4] Gorelik, S.; Ligumsky, M.; Kohen, R.; Kanner, J. A novel function of red wine polyphenols in humans: prevention of absorption of cytotoxic lipid peroxidation products. *The FASEB J.* **22**: 41-46; 2008.
- [5] Ursini, F.; Zamburlini, A.; Cazzolato, G.; Maiorino, M.; Sevanian, A. Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis *Free Rad. Biol. Med.* **25**: 250-252; 1998.
- [6] Prior, R., Cao, G. In vivo total antioxidant capacity: comaparison of different analytical methods. *Free Rad. Biol. Med.* 27: 1173-1181, 1999.
- [7] Zennaro, L.; Rossetto, M.; Vanzani, P.; De Marco, V.; Scarpa, M.; Battistin, L.; Rigo, A. A method to evaluate capacity and efficiency of water soluble and H-donor antioxidants as peroxyl radical scavengers. *Archiv. Biochem. Biophys.* 462: 38-46; 2007.

[8] Rossetto, M.; Lante, A.; Vanzani, P.; Spettoli, P.; Scarpa, M.; Rigo, A. Red chicories as potent scavengers of highly reactive radicals: a study on their phenolic composition and peroxyl radical trapping capacity and efficiency. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8169-8175; 2005.

Figura 1

Consumo di ossigeno dovuto alla perossidazione lipidica determinata dalla presenza di tracce di Hb (A) e inibizione di questo processo da parte di una antocianina.(B).

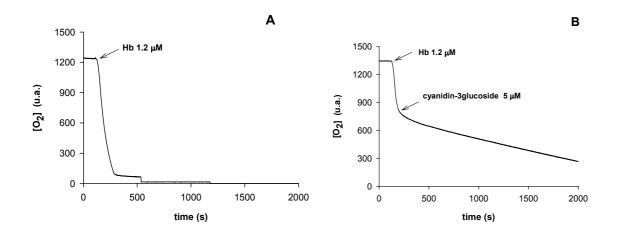


Figura 2

Traccia ossigrafica relativa al consumo di ossigeno in un esperimento che dimostra l'inibizione della perossidazione lipidica determinata dall'iniezione di un estratto di radicchio rosso.

Inserto: linearizzazione dei dati sperimentali sulla base del modello cinetico da noi proposto per un singolo antiossidante.

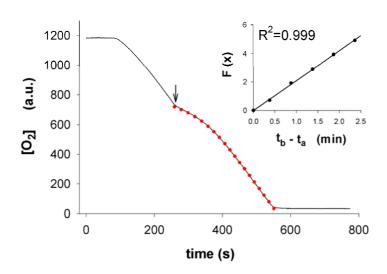
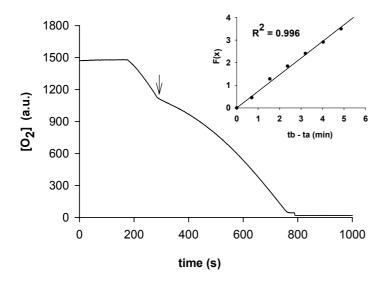


Figura 3

Traccia ossigrafica relativa al consumo di ossigeno in un esperimento che dimostra l'inibizione della perossidazione lipidica determinata dall'iniezione nel sistema di misura di un tè.

Inserto: linearizzazione dei dati sperimentali sulla base del modello cinetico da noi proposto per un singolo antiossidante.



POLYPHENOLS AND APOPTOSIS OF CANCER CELLS

Giuseppe Rotilio*°, Giuseppe Filomeni*, Katia Aquilano*, Maria Rosa Ciriolo*°
*Department of Biology, University of Rome "Tor Vergata", Via della Ricerca Scientifica, 00133 Rome, Italy
°Research Centre IRCCS San Raffaele, Via dei Bonacolsi, 00165 Rome Italy

Polyphenols represent a large class of plant-derived molecules with a general structure that allows acting as potent free radical scavengers. They have long been recognized to possess several therapeutic activities ranging from anti-thrombotic to anti-oxidant. The capability of polyphenols to act as reducing or oxidizing molecules depends on the presence of environmental metals and on the concentrations used. In our laboratory, we have focused on the pro-apoptotic effect of *trans*-resveratrol, which may be relevant to potential chemopreventive activity in carcinogenesis. In one cellular model we demonstrated that *trans*-resveratrol was able to commit human breast cancer MCF-7 to apoptosis by a redox-modulated activation of JNK and p38 MAPK. In another model (AGS human adenocarcinoma gastric cells), we investigated the effects of lower concentrations of *trans*-resveratrol and we demonstrated that it was also able to completely suppress the increase in cell proliferation induced by oxidant stimuli. This property was not due its antioxidant capacity but rather to a specific inhibition of ERK1/2 phosphorylation. These results corroborate a potentially beneficial use of this molecule in chemoprevention of cancer.

FLAVONOIDI COME SILENZIATORI DI STAT1: EFFETTO PROTETTIVO SUI DANNI INDOTTI DA ISCHEMIA/RIPERFUSIONE NEL CUORE

*Alessandra Carcereri de Prati e Hisanori Suzuki.*Sezione di Biochimica, Dipartimento di Scienze Morfologico Biomediche, Università di Verona.

Il tè verde è una delle bevande più antiche e diffusamente consumate nel mondo ed è stata utizzata per lungo tempo come rimedio popolare contro patologie comuni quali mal di testa, dolori diffusi, cattiva digestione, debole depressione e consigliato in generale come detossificante e come elisir di lunga vita. La maggior parte degli effetti benefici dell'assunzione di tè verde è stata attribuita alle proprietà antiossidanti delle catechine quali epigallocatechina-3-gallato (EGCG, il principale polifenolo presente nelle foglie del tè verde), epicatechina (EC), epigallocatechina (EGC) ed epicatechina-3-gallato (ECG). In letteratura, le evidenze che sottolineano l'azione benefica dell'assunzione di tè verde sono in continuo aumento e si potrebbe estendere a patologie quali i disturbi cardiovascolari, il cancro, le malattie della pelle indotte da UV, i danni da ischemia/riperfusione nel cervello, le malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer e di Parkinson, l' obesità, il diabete, l' ipercolesterolemia, l'aterosclerosi e, più in generale, l' infiammazione e l'invecchiamento.

Poiché la patogenesi di queste malattie non sembra correlata esclusivamente ad uno sbilanciamento dello stato redox, sta emergendo l'ipotesi che gli effetti benefici dell'assunzione del tè verde potrebbero non dipendere esclusivamente dalle sue forti proprietà antiossidanti.

Nel 2001 noi riportammo che l'EGCG, ma non le altre catechine presenti nell'estratto di tè verde, inibiva efficacemente la fosforilazione della tirosina 701 indotta da interferone- γ (IFN- γ) e la capacità di legare al DNA il fattore di trascrizione STAT1 in diverse linee cellulari di carcinoma umano (1). L'azione dell'IFN- γ nei macrofagi è quasi esclusivamente mediata da STAT1, che gioca un ruolo chiave nelle prime fasi dell'infiammazione regolando l'espressione di diversi geni in relazione al fenomeno infiammatorio (2).

Le vie intracellulari attivate dopo il riconoscimento dell'IFN-γ da parte dei suoi recettori specifici (IFNGRs) sono ben chiare (3, 4). Brevemente, dopo la dimerizzazione di IFNGR1/2, che segue il legame di IFN-γ, ha luogo l'autofosforilazione delle tirosin chinasi 1 e 2 (JAK1/2). Successivamente, JAK1/2 attivati fosforilano in tirosina IFNGR1/2 e lo STAT1 presente nel citoplasma. Lo STAT1 fosforilato in formazione dimerica entra nel nucleo e si lega specificamente alle sequenze di regolazione per modulare l'espressione dei geni bersaglio. Inoltre, la regolazione dell'attivazione della via JAK/STAT è mediata da almeno tre diverse proteine: STAM (signal-transducing adapter molecules) (5), StIP (STAT-interacting protein) e la famiglia SH2B/Lnk/APS. I regolatori negativi della via JAK/STAT includono SOCS (suppressors of cytokine signalling), PIAS

(protein inhibitors of activated STAT) e PTP (protein tyrosine phosphatases) come SHP-1 (6). Recentemente è stato scoperto che la sumoilazione (7) sembra modificare non solo le proteine PIAS (8), ma anche gli STAT stessi (9). A dispetto di alcuni lavori che indicano il coinvolgimento della variazione dello stato redox nella modulazione dell'attivazione di STAT1 (10), i risultati da noi ottenuti mostrano che, fra tutte le catechine presenti nell'estratto del tè verde, solo l'EGCG è capace di inibire l'attivazione di STAT1, suggerendo che l'EGCG potrebbe esercitare la sua attività non solo utilizzando semplicemente la sua capacità antiossidante.

Comparando la struttura delle catechine presenti nel tè verde sembra che l'attività anti-STAT1 possa essere imputabile alla presenza di tre gruppi idrossilici nelle posizioni 3',4',5' dell'anello B. Comunque, il fatto che l'EGC, che presenta caratteri strutturali simili, non inibisce l'attivazione di STAT1, indica che sono necessarie ulteriori caratteristiche strutturali.

Alcuni nostri lavori preliminari con polifenoli di origine naturale indicano l'importanza del gruppo idrossilico in posizione 3 dell'anello C poiché la sua assenza, come nella tricetina, o la sua glicosilazione, come nella miricitrina o nella mirtillina, annullano la capacità di inibire STAT1. D'altra parte la classica natura antiossidante dei polifenoli richiede la presenza della struttura idrossilica in posizione orto dell'anello B, dell'insaturazione in posizione 2,3 in coniugazione con la funzione cheto in posizione 4 nell'anello C (ad esempio la quercetina). Tenendo conto che la quercetina non inibisce la fosforilazione della Tyr701 ne' l'attività di legame di STAT1 al DNA, questi dati rafforzano l'ipotesi che l'azione inibitoria dell'EGCG non possa essere attribuita semplicemente alla sua capacità antiossidante.

A questo punto sorge una domanda: qual è il meccanismo molecolare dell'azione dell'EGCG nell'inibizione dell'attivazione di STAT1? E' stato riportato che l'attivazione di JAK1 e 2 fosforilati in tirosina sono profondamente coinvolti nella via di trasduzione del segnale di STAT1 e STAT3 (11). Considerando il fatto che l'EGCG non è in grado di inibire l'attivazione di STAT3 (1) indotta da interleuchina-6, la possibilità che JAK1 e 2 siano il bersaglio dell'EGCG nell'inibizione dell'attivazione di STAT1 è piuttosto scarsa. Anche il coinvolgimento delle tirosin fosfatasi sembra essere improbabile poiché esse possono regolare lo stato di fosforilazione di un largo spettro di proteine incluso STAT3. Poiché SOCS1 e 3 smorzano l'attivazione degli STAT, essi potrebbero essere un bersaglio per l'EGCG; tuttavia, il fatto che l'induzione dell'espressione di SOCS sia strettamente regolata da STAT1 stesso rende difficile questa ipotesi. Per questo motivo noi abbiamo ipotizzato che l'azione inibitoria dell'EGCG su STAT1 sia correlata alla sua capacità di interagire specificamente con la proteina STAT1 stessa. Per valutare questa ipotesi abbiamo analizzato, con il metodo della Surface Plasmon Resonance (SPR), l'interazione fra lo STAT1 immobilizzato e l'EGCG o l'EC o la quercetina. Non solo l'analisi mediante SPR indicava che solo l'EGCG

interagiva direttamente con la proteina STAT1, ma anche che il valore della Kd dell'EGCG verso STAT1 era molto inferiore rispetto a quello della EC e della quercetina, indicando che l'azione inibitoria dell'EGCG sull'attività di legame di STAT1 è, almeno in parte, dovuto alla sua capacità di interagire direttamente con essa.

Per valutare la possibilità che solo l' EGCG e non altri gli flavonoidi senza attività anti-STAT1 possano agire con effetti benefici in modelli animali patologici nei quali l'iperattivazione di STAT1 gioca un ruolo deleterio, abbiamo esaminato il loro effetto in modelli di danno da ischemia/riperfusione (I/R) nel cuore di ratto. La morte per apoptosi dei cardiomiociti indotta da I/R è un evento chiave e STAT1 ne è profondamente coinvolto (12). L'EGCG, ma non la quercetina, inibisce efficacemente l'attivazione di STAT1 indotta da I/R e protegge il cuore dai danni funzionali e biochimici. Poiché l'EGCG e la quercetina sono entrambi forti ossidanti, in questo modello animale, l'azione protettiva dell'EGCG dovrebbe essere ascritta alla sua capacità di inibire l'attivazione di STAT1.

Inoltre, l'effetto benefico potenziale del tè verde o dell'EGCG è stato osservato nelle cure cardiovascolari (12), nella protezione della pelle dal danno indotto dalle radiazioni ionizzanti, nel potere neuroprotettivo contro i danni da I/R cerebrale (13), nella cura del morbo di Alzheimer (14) e di Parkinson (15), nelle cure contro l'obesità, nella regolazione dell'espressione dei geni per la sintesi degli acidi grassi, nell'inibizione della ipercolesterolemia e nell'aterosclerosi (16) e più in generale nell'infiammazione (1) e nell'invecchiamento. Poiché tutte quelle patologie contro le quali il tè verde/EGCG mostra un'azione protettiva sono caratterizzate da un'alterata attivazione di STAT1, è probabile che la capacità anti-STAT1 del tè verde/EGCG sia coinvolta nella loro azione benefica.

In conclusione, la saggezza dei popoli antichi che preferivano il tè verde alla miriade di altri prodotti derivati dalle piante (vale la pena ricordare che il tè, Camellia sinensis L., è la bevanda più bevuta nel mondo, dopo l'acqua) potrebbe portare allo sviluppo di nuove strategie per la prevenzione e/o il trattamento di diverse patologie infiammatorie.

Referenze

- 1. Menegazzi, M.; Tedeschi, E.; Dussin, D.; De Prati, A.C.; Cavalieri, E.; Mariotto, S.; Suzuki, H. FASEB J., 2001, 15, 1309.
- 2. Carcereri De Prati, A.; Ciampa, A.R.; Cavalieri, E; Zaffini, R.; Darra, E.; Menegazzi, M.; Suzuki, H.; Mariotto, S. *Curr. Med. Chem.*, 2005, 12, 1623.
- 3. Ihle, J.N. Adv. Immunol., 1995, 60, 1.
- 4. Aaronson, D.S.; Horvath, C.M. Science, 2002; 31, 1653.
- 5. Lohi, O.; Lehto, V.P. FEBS Lett., 2001, 508, 287.
- 6. Greenhalgh, C.J.; Hilton, D.J.; J. Leukooc. Biol, 2001, 70, 348.
- 7. Johnson, E.S.; Gupta, A.A. Cell, 2001, 106, 735.
- 8. Jackson, P.K. Genes. Dev., 2001, 15, 3053.
- 9. Rogers, R.S.; Horvath, C.M.; Matunis, M.J. J. Biol. Chem., 2003, 278, 30091.
- 10. Pawate, S.; Shen, Q.; Fan, F.; Bhat, N.R. J. Neurosci. Res., 2004, 77, 540.
- 11. Leonard, W.J.; O'Shea, J.J. Annu. Rev. Immunol., 1998, 16, 293.
- 12. Stephanou, A. J. Cell. Mol. Med., 2004, 8, 519.
- 13. Takagi, Y.; Harada, J.; Chiarugi, A.; Moskowitz, M.A. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2002, 22, 1311.
- 14. Kitamura, Y.; Shimohama, S.; Ota, T.; Matsuoka, Y.; Nomura, Y.; Taniguchi, T. Neurosci. Lett., 1997, 237, 17.
- 15. Simon, A.R.; Rai, U.; Fanburg, B.L.; Cochran, B.H. Am. J. Physiol., 1998, 275, C1640.
- 16. Wang, X.Q.; Panousis, C.G.; Alfaro, M.L.; Evans, G.F.; Zuckerman, S.H. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002, 22, 5.

Sessione "Cellule staminali"

CELLULE STAMINALI E RIPARAZIONE NEUROLOGICA: FATTI, MISFATTI E PROSPETTIVE

Laura Calzà
Animal Stem Cell Laboratory, INBB, Università di Bologna

La terapia cellulare si qualifica come approccio atto a ripristinare una funzione, attraverso la sostituzione cellulare anche in organi e tessuti costituiti da cellule a bassa, bassissima o nulla capacità rigenerativa nell'adulto. Questa attrazione è tanto più forte per organi e tessuti, quali il nervoso, per i quali non esistono a tutt'oggi terapie in caso di fenomeni degenerative acuti o progressivi. Al contempo, l'ipotesi di utilizzare cellule staminali o indifferenziate per la terapia cellulare che mira alla sostituzione di cellule degenerate è un obiettivo molto lontano, se mai perseguibile per il sistema nervoso centrale.

Fatti. Il sistema nervoso centrale adulto è costituito da cellule neurali postmitotiche e diverse popolazioni di cellule gliali: astrociti, cellule microgliali, oligodendrociti e una popolazione definita al momento per l'espressione di una glicoproteina di superficie (NG2) identificata da alcuni autori con i precursori degli oligodendrociti, cellule capaci di proliferare in caso di lesione, generando quindi oligodendrociti maturi. Accanto a questa popolazione di prevursori non ancora differenziati, esistono almeno due regioni nelle quali si rovano cellule con caratteristiche di staminlità, almeno relativamente alla genesi dei tipi cellulari sopra ricordati: la zona subventricolare (SVZ) telencefalica e il giro dentato dell'ippocampo. Le cellule definite "staminali neurali", presenti in questa zona sono inserite in microambienti anatomicamente definiti da astrociti maturi e da una particolare composizione della matrice extracellulare ("niche"). Queste cellule mantengono la capacità di proliferare e differenziare anche in neuroni maturi. Nella SVZ, garantiscono il rinnovamento del pool e la produzione di cellule figlie destinate a differenziamento (divisione asimmetrica), migrare fino al bulbo olfattorio (OB) in un sistema definito "rostral migratory stream" e costituito da tubi astrogliali. Nel bulbo, la migrazione tangenziale consente la fuoriuscita di precursori neurali che differenziano in specifiche classi di neuroni maturi. Nle giro dentato dell'ippocampo, la neurogenesi costitutiva adulta sembra avere un ruolo anche in fenomeni complessi, quali apprendimento e memoria.

Il nostro laboratorio da molti anni studia le cellule staminali e i precursori presenti nel cervello adulto, sia con tecniche in situ che ex-vivo, attraverso l'allestimento di colture di "neurosfere". Un obiettivo specifico del nostro lavoro è verificare la risposta di queste cellule a lesioni e/o modelli di patologie neurodegenerative, per valutarne e possibilmente stimolarne il potenziale riparativo. Il razionale che guida il tentativo di stimolare la riparazione di lesioni nel SNC adulto deriva

direttamente dall'embriologia: utilizziamo quanto noto sulla regolazione genica ed epigenetica del lineage di cellule staminali e della maturazione di precursori nel corso dello sviluppo.

La nostra attenzione si è in particolare rivolta alla rimielinizzazione in corso di patologie sperimentali infiammatorie/demielinizzanti, modelli della malattia umana sclerosi multipla. La lesione istopatologica più evidente nel corso di sclerosi multipla è quella della guaina mielinica degli assoni del sistema nervoso centrale, che porta alla formazioni di aree anche ampie ("placche") di demielinizzazione, la cui prima conseguenza funzionale è la perturbazione della trasmissione del segnale elettrico assonale. Questa lesione, che lascia l'assone "nudo" rispetto ad un ambiente extracellulare ricco di sostanze proinfiammatorie, è fra i responsabili della patologia assonale, a insorgenza precoce, che ha un ruolo primario nello stabilire la disabilità cronica. É evidente quindi che strategie volte a favorire la rimielinizzazione rappresentano un importante bersaglio per l'approccio terapeutico nella sclerosi multipla. La rimielinizzazione del sistema nervoso centrale nella vita adulta non rappresenta un evento sporadico, si può anzi affermare che la capacità di riparare lesioni della guaina mielinica rappresenta la sola vera capacità riparativa del sistema nervoso adulto, che può condurre ad un completo recupero funzionale. Questa riparazione è operata dai già ricordati precursori degli oligodendrociti (OPCs) che si formano nel corso dello sviluppo (mielinizzazione), migrano nella sostanza bianca e grigia dove rappresentano una popolazione cellulare molto abbondante (5-8% secondo alcuni autori), rimangono silenti nel corso della vita, salvo essere attivati da stimoli lesivi e/o infiammatori, a seguito dei quali attivamente proliferano, aumentando di numero e rimielinizzando eventuali lesioni con un processo cellulare e molecolare che ricapitola quello della mielinizzazione in corso di sviluppo. Nella sclerosi multipla, questa capacità, che pure è presente nelle fasi precoci di malattia, risulta largamente insufficiente, producendo quella che molti autori definiscono "rimielinizzazione abortiva". Gli OPCs proliferano infatti nelle placche fresce di demielinizzazione, aumentando di densità rispetto alle regioni limitrofe, ma restano bloccati prima dello stadio cellulare che garantisce la mielinizzazione. Le ragioni di questa incapacità riparativa non sono note: alcuni autori ritengono che il loro numero sia comunque troppo basso per riparare lesioni estese come quelle che si sviluppano in corso di sclerosi multipla, altri ipotizzano che esista una alterazione dell'OPCs che lo rende incapace di maturare in oligodendrocita mielinizzante, altri che sia il microambiente creato dalla malattia a condizionare la biologia di questa cellula. Questa cellula è comunque riconosciuta un bersaglio ragionevole per la ricerca di strategie atte a potenziare la rimielinizzazione in corso di sclerosi multipla. Il nostro laboratorio sta esplorando la possibilità di favorire il processo di rimielinizzazione nel modello animale di sclerosi multipla (encefalomielite allergica sperimentale indottain ceppi di ratto suscettibili alla malattia) attraverso la somministrazione di ormone tiroideo in una precisa finestra temporale della malattia. Il razionale di questo approccio è molteplice: 1. è riconosciuto il ruolo primario dell'ormone tiroideo nel processo di mielinizzazione nel corso dello sviluppo, dalla regolazione del ciclo cellulare di neural stem cells e OPCs, fino al controllo dell'espressione di geni che codificano per le principali proteine costituenti la guaina mielinica; 2. studi in vitro hanno dimostrato che OPC acquisisce sensibilità all'ormone tiroideo dopo essere andato incontro a un definito numero di cicli replicativi, sotto la spinta di PDGF: solo in presenza di ormone tiroideo OPC esce dal ciclo replicativo e evolve verso oligodendrocita mielinizzante; 3. in corso di EAE (e di sclerosi multipla), OPCs attivamente proliferano in una preciso intervallo temporale; 4 esiste un distiroidismo tissutale in corso di EAE, probabilmente dovuto alle alte concentrazioni locali di citochine, che alterano la conversione locale di T4 in T3 (l'ormone attivo), determinando nella sostanza un ipotiroidismo locale. Abbiamo quindi somministrato ormone tiroideo nella fase acuta di EAE in ratti femmine sucettibili alla malattia (ceppo Lewis e ceppo Dark-Agouty), studiando andamento clinico della malattia, parametri cellulari e biomolecolari relativi al lineage oligodendrogliale a diversi stadi maturativi e parametri biomolecolari e morfologici relativi al decorso temporale della rimielinizzazione. Nel loro complesso, i risultati fin qui ottenuti consentono di affermare che la somministrazione di ormone tiroideo nella fase acuta della malattia, caratterizzata dalla intensa proliferazione di OPCs e neural stem cells (NSCs), facilita la rimielinizzazione, ripristinando parametri biolomolecolari e morfologici alterati in corso di EAE. Questo effetto è probabilmente ottenuto attraverso multipli bersagli cellulari, fra i quali: OPCs, che sono stimolati ed evolvere verso oligodendrociti mielinizzanti; NSCs, rispetto alla quali l'ormone tiroideo facilita il lineage oligodendrogliale; oligodendrociti maturi, nei quali i geni che codificano per myelin basic protein, regulati attraverso i recettori nucleari dell'ormone tiroideo, aumentano la trascrizione; neuroprotezione, attraverso la sintesi di Nerve Growth Factor, aumentata dalla somministrazione di ormone tiroideo

In particolare:

1. Ormoni tiroideo, NSCs e OPCs: abbiamo studiato l'effetto della manipolazione cronica dello stato tiroideo dell'animale sull'espressione di una serie di marcatori del lineage oligodendrogliale, nella zona subventricolare telencefalica (ricca di NSCs), bulbo olfattorio e midollo spinale. Le neurosfere derivate da questa regione esprimono le diverse isoforme del recettore nucleare dell'ormone tiroideo, i il trattamento con T3 aumenta la loro espressione. L'ipotiroidismo cronicamente indotto con somministrazione di propiltiouracile nel ratto adulto induce una significativa riduzione dell'espressione di PDGF α -R e MBP, sia a livello di mRNA che di proteina. L'ipertiroidismo cronicamente indotto con somministrazione di T4 nel ratto adulto non altera nessuno dei parametri indagati. NSCs derivate in vitro ("neurosfere") da animali ipotiroidei

mostrano un rallentamento significativo della maturazione del lineage oligodendrogliale, valutato per l'espressione di markers molecolari e per la maturazione del fenotipo morfologico. Al contrario, neurosfere derivate da animali ipertiroidei mostrano una più rapida maturazione degli oligodendrociti derivati.

- 2. La somministrazione di ormone tiroideo stimola la rimielinizzazione in corso di EAE. In questo studio, effettuato su ratti Lewis e Darke Agouty, abbiamo dimostrato che la somministrazione di ormone tiroideo nella fase acuta della malattia, quando OPCs vanno incontro a intensa profilerazione sulla spinta derivata dal microambiente creato dalla malattia, aumenta l'espressione di PDGFaR, marker di OPCs, ripristina i normali livelli di MBP mRNA e proteina, normalizza i parametri morfometrici delle guaine mieliniche in nervo ottico e midollo spinale. Inoltre, sembra avere un effetto neuroprotettivo, come suggerito dalla normalizzazione del diametro assonale.
- 3. gli esperimenti di cui al punto 2 sono stati ripetuti nel primate non umano marmoset (Callithrix jacchus), ottenendo positivi risultati sull'andamento clinico della malattia, sulla rimielinizzazione e sulla neuroprotezione. In questa specie animale abbiamo anche dimostrato l'alterazione dell'espressione del mRNA per la desiodasi 2, responsabile della produzione dell'ormone attivo, e di una ridotta epressione dei recettori nucelari, alterazioni molecolari completamente corrette dalla somministrazione di T3.
- 4. neurosfere derivate da animali affetti da EAE hanno una ridotta capacità di generare oligodendrociti, e il trattamento in vitro con T3 riprostina questa capacità, favorendo anche la maturazione degli oligodendrociti.

Il complesso di questi risultati indica nelle cellule staminali neurali endogene e nei precursori degli oligodendrociti un obiettivo realistico per approcci terapeutici volti a stimolare la rimielinizzazione attraverso i meccanismi cellulari e molecolari che portano alla mielinizzazione nel corso dello sviluppo. Ovviamente questa possibilità è strettamente legata alle caratteristiche della patologia studiata (sclerosi multipla e suo modello animale) e non automaticamnte estendibile ad altre patologie neurodegenerative.

Misfatti. La relativa facilità nell'isolamento ed espansione di cellule mesenchimali da tessuti adulti (midollo osseo, tessuto adiposo, polpa dentale, parete dei grossi vasi) e di banking di cellule fetali a termine (cordone ombelicale e membrane amniotiche), associata a discussi esperimenti volti a dimostrate capacità di trasdifferenziamento di queste cellule anche verso il lineage neurale, hanno generato un forte interesse circa la possibilità di utilizzare queste cellule per la riparazione neurale. La letteratura scientifica sull'argomento elenca circa 120 lavori degni di menzione sull'animale da laboratorio, riferiti in particolare a modelli di lesione vascolare e traumatica acuta, e alcune

condizioni di degenerazione cronica. La somministrazione di cellule è solitamente locale, ma è utilizzata anche la via endovenosa. In molti di questi lavori il controllo è costituito da iniezione di veicolo (e non di altri tipi cellulari) e si descrivono generici risultati di miglioramento funzionale, con poche indicazioni di differenziamento tissutale di queste cellule, così come di integrazione. In realtà, un punto chiaro da tutti questi lavori è che poche, se non pochissime, delle cellule trapiantate permangono nel tessuto nervoso lesionato.

Prospettive. Esiste però una importante area emersa dagli studi di base sulle cellule mesenchimali, relativa alla possibilità che la vicinanza/contatto di queste cellule con aree degenerate o in corso di degenerazione nel SNC crei una situazione favorente se non addirittura permissiva di fenomeni di rallentamento e/o prevenzione della degenerazione e di autoriparazione, attraverso segnali molecolari specifici (solubili o di membrana) delle cellule staminali sulle neurali e/o oligodendrogliali presenti in situ, operanti in senso autocrino/paracrino. Il nostro laboratorio sta studiando le ceratteristiche paracrine di cellule mesenchimali derivate da tessuti adulti e fetali a termine, con riferimeto in particolare a fattori di crescita quali nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, vascular endothelial growth factor, glial-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, e condizioni di condizionamento di tali cellule (chimiche e/o fisiche) volte alla regolazione dell'espressione del fattore di crescita desiderato. Contestualmente, stiamo studiando la possibilità di sviluppare dispositivi misti cellule-reservoir, basato sull'uso di scaffolds permeabili e impiantabili, nei quali imprigionare cellule mesenchimali al fine di mantenere nei siti di lesione una adeguata concentrazione di cellule.

- Calzà L., Giardino L., Pozza M., Betteli C., Micera A., Aloe L. Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence for a NGF role. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, 95:3209-3214
- Calzà L., Giardino L., Giuliani A., Aloe L., Levi-Montalcini R. Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, 98:4160-5.
- Calza' L., Fernandez M., Giuliani A., Aloe L., Giardino L. Thyroid hormone activates oligodendrocyte precursors, increases a myelin forming protein and NGF content in the spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 3258-3263
- Calza' L., Giuliani A., Fernandez M., Pirondi S., D'intino G., Aloe L., Giardino L. Neural stem cells and cholinergic neurons: regulation by immunolesion, treatment with mitogens, retinoic acid and NGF Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, 100: 7325-7330
- Fernandez M., Pirondi S., Manservigi M., Giardino L., Calzà L. Thyroid hormone participates in the regulation of neural stem cells and oligodendrocyte precursor cells in the central nervous system of adult rat. Eur J Neurosci, 20:2059-2070, 2004

- Calzà 1., Fernandez M., Giuliani A., Pirondi S., D'Intino G., Manservigi M., DeSordi N., Giardino L. Stem cells
 and nervous tissue repair: from in vitro to in vivo. In: NGF and related molecules in health and disease, L. Aloe and
 L. Calzà (eds), Progress in Brain Research, vol. 146, pp 75-91, Elsevier, 2004
- Fernandez M., Giuliani A., Pirondi S., D'intino G., Giardino L., Aloe L., Levi-Montalcini R.. and Calza' L. Thyroid hormone administration facilitates remyelination in chronic experimental demyelinating-inflammatory disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:16363-16368, 2004
- Calzà L., Fernandez M., Giuliani A., D'Intino G., Pirondi S., Sivilia S., Paradisi M., DeSordi N., Giardino L.
 Thyroid hormone and remyelination in adult central nervous system: A lesson from an inflammatory-demyelinating disease. Brain Res Review, 48:339-346, 2005
- Fernández M., Paradisi M, Giardino L. and Calzà L. To Know Neural Stem Properties From Diseased Brain: A critical step for Brain Repair In: Greer EV (eds) Neural Stem Cell Research, Nova Science Publishers Inc, New York pp 77-97, 2006
- D'Intino G., Perretta G., Taglioni A., Calistri M., Falzone C., Barone M, Giardino L and Calzà L. Endogenous stem
 and precursor cells for demyelinating diseases: an alternative for transplantation? Neurological Res 28:513-7, 2006
- Chen BL, Pirondi S, Fernandez, Giuliani A, Vaccari F, Scagliarini A, Giardino L, Calzà L Skin-derived cells from different mammalian species: a tool for developmental, pharmacological and cancer studies In: Devon W. P. (ed), Stem Cells and Cancer, pp. 1-22, Nova Science Publishers Inc, New York, 2007,

APPLICAZIONE TERAPEUTICA DELLE CELLULE STAMINALI MESENCHIMALI **NELLA STENOSI ARTERIOSA**

¹Amalia Forte, ¹Mauro Finicelli, ¹Monica Mattia, ¹Liberato Berrino, ¹Francesco Rossi, ²Marisa De Feo, ²Maurizio Cotrufo, ¹Marilena Cipollaro, ¹Antonino Cascino, ¹Umberto Galderisi

1 - Excellence Research Center for Cardiovascular Diseases, Departments of Experimental Medicine, Second

- University of Naples, Italy
- 2 Cardiothoracic and Respiratory Sciences, Second University of Naples, Italy

OBIETTIVI: La restenosi arteriosa è un processo fisiopatologico che può verificarsi in seguito ad interventi di angioplastica, endoarterectomia o bypass. Le cellule staminali mesenchimali (MSC) presentano diverse caratteristiche che le rendono un potenziale strumento terapeutico in diversi ambiti. Di particolare interesse in ambito cardiovascolare è la loro capacità di differenziarsi in cellule endoteliali e muscolari lisce e la loro potente azione immunomodulatoria.

Il possibile ruolo terapeutico delle MSC nella riduzione della stenosi arteriosa è stato finora poco analizzato ed è ancora controverso. Il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto un modello di arteriotomia della carotide di ratto che induce stenosi arteriosa dovuta prevalentemente a rimodellamento negativo del vaso. Tale modello di stenosi arteriosa è stato ben caratterizzato sia a livello molecolare che morfologico. Nel presente studio abbiamo verificato l'effetto terapeutico della somministrazione sistemica allogenica di MSC sulla stenosi arteriosa indotta da arteriotomia della carotide di ratto.

METODI: Le MSC sono state isolate da midollo osseo di ratti Wistar ed espanse in vitro. Esse sono state quindi analizzate per il loro potenziale differenziativo, per l'espressione di marcatori di specifici antigeni di superficie (immunocitochimica), per il livello di senescenza (TRAP assay e □galactosidase staining) e per la loro attività proliferativa (FACS).

Le MSC espanse in vitro sono state marcate con DiI, un intercalante fluorescente della membrana plasmatica, prima dell'iniezione in vivo.

La stenosi è stata indotta tramite arteriotomia nelle carotidi sx di ratti Wistar maschi. Subito dopo l'intervento, i ratti sono stati trattati con MSC o con il solo mezzo di coltura (DMEM), iniettati via vena caudale. Le carotidi operate e quelle controlaterali non operate sono state prelevate 3 e 7 giorni dopo arteriotomia per analisi dell'homing cellulare e per analisi differenziale dell'espressione genica locale tramite RT-PCR e 30 giorni dopo arteriotomia per analisi morfologica e morfometrica.

RISULTATI: Le MSC isolate da midollo osseo di ratto espanse in vitro sono risultate essere prevalentemente nella fase G1 (50%) ed S (49%) del ciclo cellulare, hanno mostrato una limitata senescenza (23%), sono state in grado di differenziarsi in adipociti ed osteociti ed esprimevano gli antigeni CD73, CD90 e CD105, oltre all'□-actina muscolare liscia. Una volta iniettate *in vivo* dopo arteriotomia, le MSC si sono rapidamente localizzate nel sito di insulto della carotide ma non nella carotide controlaterale non operata. L'analisi morfologica e morfometrica condotta 30 giorni dopo l'intervento di arteriotomia ha rivelato un minore rimodellamento negativo della carotide nei ratti trattati con MSC rispetto a quelli di controllo trattati con DMEM, con una differenza del 37% dell'area del lume della carotide (p=0.016).

L'analisi differenziale di espressione genica ha rivelato una diminuzione dei livelli di espressione locale di IL-1 \Box (p=0.007) e di Mcp-1 (p=0.04) nelle carotidi di ratti trattati con MSC rispetto a quelli di controllo 3 e 7 giorni dopo arteriotomia, accompagnati da un aumento di TGF- \Box nelle carotidi di ratti trattati con MSC rispetto a quelli di controllo (p=0.01).

CONCLUSIONI: Le MSC svolgono un ruolo terapeutico positivo nella riduzione della stenosi in un modello di arteriotomia della carotide di ratto ed influenzano l'espressione locale di geni coinvolti nella risposta infiammatoria. Ulteriori studi saranno necessari per meglio comprendere i meccanismi d'azione delle MSC nella riduzione della stenosi, anche allo scopo di ampliarne le potenzialità terapeutiche.

Referenze:

A Forte, M Cipollaro, A Cascino, U Galderisi (2007). "The pathophysiology of stem cells in restenosis". *Histol Histopathol*, 22(5):547-57.

Giordano A, Galderisi U, Marino IR (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells". *J Cell Physiol* 211(1):27-35.

SMAD GENE EXPRESSION AND SIGNALING DURING CARDIOGENESIS IN MOUSE EMBRYONIC AND HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

Margherita Maioli*, Antonella Pintus**, Andrea Montella**, Pasquale Bandiera **, Silvia Cantoni[§], Claudia Cavallini[§], Francesca Bianchi[§], and Carlo Ventura[§]

From the *Department of Biomedical Sciences/National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Sassari, - Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy, **Department of Biomedical Sciences, University of Sassari, 07100 Sassari, Italy, and \$Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering, National Institute of Biostructures and Biosystems, University of Bologna, I-40138 Bologna, Italy e-mail: mmaioli@uniss.it Key words: stem cells, cardiogenesis, transcription factors, differentiating drug

Pluripotent stem cells differentiate into various cell types and can recapitulate the structural and molecular changes associated with cardiac development (1). Currently, this process is very inefficient and labor intensive. The development of new molecules driving a high-throughput of targeted lineage commitment may be relevant both to establish affordable strategies of cell therapy and allow further mechanistic dissection of stem cell differentiation. We have recently developed hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic acids (HBR), coaxing pluripotent stem cells into cardiovascular fate (2,3). The signaling pathways activated by HBR remain still unclear. Smad proteins are major transcriptional regulators that orchestrate remarkable cardiogenic patterning (4). Here, we investigated whether different Smad proteins (1,3,4,7), playing activating or inhibiting roles in gene transcription, may be involved in HBR-induced cardiogenesis. We demonstrate that both gene and protein expression of Smad1,3, 4, and 7 are significantly affected following exposure to HBR of both mouse embryonic stem cells and human mesenchymal stem cells isolated from term placenta. HBR treatment consistently increased Smad1,3,4 gene expression in both cell types, while simultaneously downregulating the amount of the inhibitory Smad7 mRNA. In each stem cell population, HBR induced a significant increase in the yield of cells expressing Smad1,3, and 4. Moreover, Smad4 upregulation by HBR led to a concomitant increase in the number of cardiac marker-expressing cells. Therefore, HBR is a novel tool for a feasible control of Smad transcription and signaling without viral mediated vectors, and may contribute to further development in stem cell therapy.

References

- 1. Young HE et al. J Cell Mol Med. 2005 Jul-Sep;9(3):753-69. Review
- 2. Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A.. *J Biol Chem. 2004 May* 28;279(22):23574-9. Epub 2004 Mar 24.
- 3. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. *J Biol Chem. 2007 May 11;282(19):14243-52. Epub 2007 Mar 15*.
- 4. Rajarshi P, Aparna K., Stem cells and development 15:29-39 (2006)

STUDIO DEL MECCANISMO D'AZIONE DELLE CELLULE STAMINALI DI MIDOLLO OSSEO NELLA TERAPIA DELL' ARTERIOPATIA OCCLUSIVA PERIFERICA

Gilda Cobellis, Andrea Silvestroni, Stefano Lillo, Chiara Botti, Ciro Maione, Antonietta Coppola e Vincenzo Sica.

Dipartimento di Patologia Generale, Cattedra di Patologia Clinica, Seconda Universita' degli Studi di Napoli, Via L. De Crecchio, 7, 80138, Napoli.

Le cellule staminali del midollo osseo sono cellule altamente indifferenziate con una elevata capacità proliferativa e in grado di differenziarsi in popolazioni cellulari dotate di funzioni specifiche. Il midollo contiene diversi tipi di cellule staminali: le cellule staminali emopoietiche (HSC), che differenziano in tutti i tipi di cellule del sangue, le cellule staminali mesenchimali (MSC), che supportano l'emopoiesi, capaci di differenziare anche in cellule mesenchimali come condrociti, osteociti e adipociti (1). Una popolazione particolare è rappresentata dalle cellule progenitrici endoteliali (EPC) che sono situate nelle lacune del midollo emopoietico e sono presenti in piccola quantità nel sangue periferico (0.5% delle cellule mononucleate presenti in circolo). Questa sottopopolazione è caratterizzata dall'espressione del marcatore di membrana CD34 e rappresentano il compartimento cellulare a più elevata capacità proliferativa e differenziativa. Esse sono capaci di generare nell'adulto il continuo ricambio degli elementi figurati del sangue, ma anche di transdifferenziare in cellule specializzate in processi di rigenerazione tissutale (1).

Recenti studi hanno dimostrato che in individui con danni tissutali di tipo ischemico, le cellule staminali normalmente residenti nel midollo osseo sono state ritrovate negli organi danneggiati quando trapiantate per via arteriosa (2-4).

L'ipotesi che ne consegue, quindi, è che nei processi di riparazione del danno tissutale nel soggetto adulto possano intervenire non soltanto le cellule staminali residenti nel tessuto stesso, ove presenti, ma anche cellule staminali che potrebbero essere richiamate in loco ('homing') al verificarsi di un danno locale. Il danno tissutale è un pre-requisito fondamentale per la partecipazione delle cellule staminali circolanti ai processi di rigenerazione dei tessuti extra-ematologici.

Topi e ratti con infarto miocardico indotto sperimentalmente mostrano un recupero significativo in seguito all'innesto di cellule staminali midollari direttamente nell'area infartuata, ovvero, più recentemente, in seguito alla mobilizzazione delle cellule staminali nel sangue periferico tramite la somministrazione di fattore di crescita granulocitario (granulocyte colony stimulating factor – GCS-F) e di fattore di crescita delle cellule staminali (stem cell factor – SCF) (2).

Secondo questa ipotesi, ogni tessuto danneggiato sarebbe in grado di secernere una importante quantità di fattori di crescita e citochine capaci di indirizzare il differenziamento di precursori staminali a formare i tipi cellulari più appropriati. Il danno tissutale determina il rilascio in circolo

di fattori solubili (chemochine, citochine, fattori di crescita, molecole ad azione proinfiammatoria) in grado di richiamare le cellule staminali a livello dell'organo danneggiato (homing).

In uno studio del 2003 (3) è stato ipotizzato che il fattore di derivazione stromale (stromal derived factor- SDF1) sia il fattore solubile alla base dei processi di ricircolo di elementi staminali dai tessuti periferici al midollo osseo e viceversa.

Altri fattori imputati nei processi di homing sono l'HGF e la forma solubile della metalloproteasi della matrice (matrix metalloprotease type 9 – MMP9) le cui concentrazioni in circolo aumentano in diversi modelli sperimentali di danno epatico in cui è stato dimostrato un ripopolamento da parte di cellule staminali (4).

Una delle sfide di questo studio è quella di definire esattamente le varie classi di molecole implicate nell''homing' al fine di migliorare tale processo a scopo terapeutico e comprendere quali stimoli più di altri siano responsabili del loro rilascio in circolo.

Infatti, se in ciascun organo esistesse una popolazione di cellule staminali in grado di coadiuvare la rigenerazione dei tessuti danneggiati, perchè esse non si mobilitano fisiologicamente e si attivano in risposta ad un evento patologico?

Il nostro gruppo di ricerca ha studiato gli effetti determinati dal trapianto autologo di cellule staminali prelevate da midollo in pazienti affetti da arteriopatia ostruttiva periferica con l'obiettivo di comprendere i meccanismi d'azione del reclutamento delle cellule staminali residenti nel midollo nei tessuti danneggiati da ridotto flusso sanguigno.

Risultati

Il nostro gruppo di studio ha condotto un trial clinico teso a valutare gli effetti benefici della terapia con cellule staminali midollari in pazienti affetti da arteriopatia periferica ostruttiva (approvato con delibera 186 del 1-3-2005 da parte del Comitato etico della Seconda Università di Napoli).

In questo protocollo di studio abbiamo utilizzato un protocollo sperimentale innovativo basato sulla duplice somministrazione di sangue midollare autologo intra-arterioso, a distanza di 45 giorni, in una casistica selezionata di pazienti affetti da tale patologia. La coorte dei pazienti arruolati per questo studio prevede: 63 pazienti complessivi (45 maschi, di cui 21 diabetici e 24 non diabetici, e 18 donne, di cui 10 diabetiche e 8 non diabetiche) tutti affetti da arteriopatia ostruttiva periferica in stadio avanzato con sintomi classificabili in fase III e IV della classificazione di Leriche Fontaine. Di questi 63 pazienti, 50 hanno già ricevuto la prima e la seconda infusione, mentre i restanti 13 sono in attesa di ricevere la seconda infusione. Attualmente i pazienti in III stadio avanzato e quelli in IV stadio non hanno alternative terapeutiche curative e subiscono, di regola, l'amputazione dell'arto, per evitare la cancrena tissutale e il decesso. La sintomatologia è caratterizzata da dolore a

riposo dell'arto colpito, cianosi, ulcere trofiche. Le terapie alternative sono solo modesti palliativi: terapie mediche massimali con vasodilatatori, intervento chirurgico con finalità palliative di tipo antalgico, sebbene, dopo breve periodo, esse siano destinate al fallimento. Unica soluzione per salvare la vita al paziente è l'amputazione dell'arto colpito (spesso la patologia è bilaterale).

I risultati ottenuti sin ora con un gruppo di 11 pazienti trattati che hanno raggiunto il traguardo di 12 mesi dal trapianto ha dimostrato indiscutibili benefici clinici soggettivi ed oggettivi (Cobellis G. et al, Bone Marrow Transplantation, 2008, in corso di stampa). Il principale risultato di questo studio è che un sostanziale miglioramento dei sintomi clinici si e' verificato nel 80% dei pazienti, controllati a distanza di 6 e 12 mesi dal trapianto. Il risultato positivo è determinato dal ripristino della perfusione sanguigna degli arti trattati, dalla formazione di nuovi capillari, dalla rinnovata capacità deambulatoria, supportato ciò da opportune analisi strumentali, nessuno dei pazienti trattati ha subito amputazione degli arti affetti.

Il trattamento ha quindi consentito di evitare l'amputazione degli arti ed ha migliorato notevolmente la qualità di vita dei pazienti. Tali notevoli miglioramenti si sono registrati e mantenuti nel corso dei 12 mesi di monitoraggio successivi all'infusione.

L'esame mediante Laser Doppler ha dimostrato un miglioramento notevole del flusso basale (LDBO), del reflusso veno-arteriolare (LDBP) oltre ad un'attivazione della vasodilatazione (LD44°) (Tabella 1). L'esame mediante videocapillaroscopia ha dimostrato l'incremento dei capillari di nuova formazione (figura 1) e le ulcere trofiche, li dove presenti nei pazienti in stadi avanzati della malattia, risultano drasticamente ridotte entro 6 mesi dall'inizio del trattamento, per scomparire del tutto entro dodici mesi. Tale valutazione empirica dimostra chiaramente un ritorno del flusso ematico normale e un ripristino della regolare funzionalità dei vasi di nuova formazione(5).

E' evidente che con il successo della terapia con sangue midollare autologo si ottengano grandi vantaggi sociali ed economici. In Italia vi sono circa 150.000 persone, diabetiche e non, che nell'arco di 4-5 anni devono essere amputate. Questi pazienti sono sottoposti a diversi tipi di terapie mediche costose e terapie chirurgiche palliative, ma il risultato è, quasi inevitabilmente, l'amputazione. Il successo riportato da noi ed altri studi dimostra che la terapia con sangue midollare autologo è efficace, poco invasiva e soprattutto gli effetti benefici permangono almeno fino ad un anno.

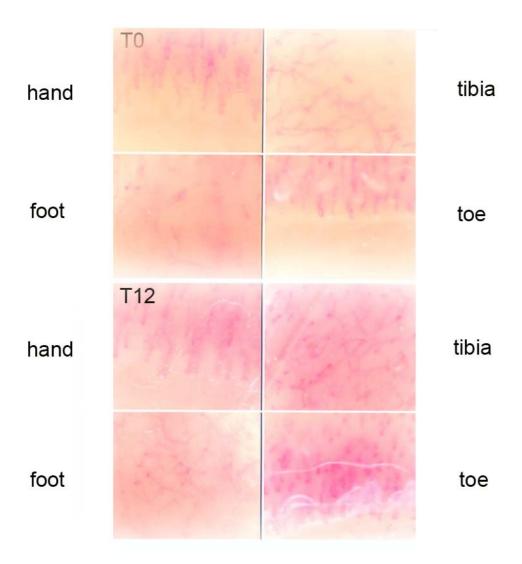
Bibliografia

- 1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, and Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143–147, 1999.
- 2.Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc Natl Acad Sci U S A 2001;98:10344-9.
- 3. Kollet O, Shivtiel S, Chen Y-Q, et al. HGF,SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced CD34+ stem cell recruitment to the liver. J Clin Invest 2003;112:160-9.
- 4. Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. Int J Hematol. 2002 Aug;76 Suppl 1:144-
- 5. Cobellis G., Silvestroni A., Lillo S., Sica G., Botti C., Maione C., Schiavone V., Rocco S., and Sica V. (2008). Long-term effects of repeated autologous transplantation of bone marrow cells in patients affected by peripheral arterial disease. Bone Marrow Transplantation (in stampa).

Tabella 1: Risultati degli esami effettuati mediante LaserDoppler nel gruppo di 11 pazienti affetti da arteriopatia ostruttiva a 6 mesi ed ad un anno dal trattamento.

	Basal Test	6-months later		1 Year later	
	(PU ± SD)	(PU ± SD)	P-value	(PU ± SD)	P-value
LDBO	27.68 ± 12,41	50,18 ± 43,62	0,05	59.90 ± 34.3	0,001
LDBP	22.91 ± 12.69	37,56 ± 30,11	0,07	54.04 ± 55.47	0,01
LD44°	74.59 ±41,38	141,53 ± 101,35	0,01	164.42 = 100.34	±0,002
LDPT	222,40 ± 168.26	386,53 ± 190,43	0,01	233.84 = 117.82	±NS
LDPF	144.78 ± 75.94	280,67 ± 168,72	0,005	311.69 = 201.55	±0.003

Figura1: Videocapillaroscopia di un paziente dopo 12 mesi dal trattamento.



CELLULE STAMINALI E NUOVE MOLECOLE DI SINTESI PER LA RIPARAZIONE CARDIOVASCOLARE

Carlo Ventura*#

*Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi (INBB), presso il Dipartimento Cardiovascolare dell'Università di Bologna.

#Bioscience Institute, San Marino

Le cellule staminali sono elementi pluripotenti responsabili sia dello sviluppo di organi ed apparati durante la vita embrionale, sia del mantenimento dell'integrità morfo-funzionale di alcuni tessuti nell'individuo adulto. La morte cellulare insorgente nel contesto di patologie degenerative acute o croniche comporta conseguenze cliniche in buona parte dipendenti dalle capacità rigenerative del tessuto danneggiato.

Le potenzialità differenziative e di "autorinnovamento" delle cellule staminali hanno recentemente suggerito un nuovo approccio al danno tissutale, quello della "terapia cellulare". Il successo della terapia cellulare dipenderà dall'individuazione dei meccanismi molecolari responsabili dell'induzione e del mantenimento di differenziamenti specifici nelle cellule staminali. La maggior parte di tali meccanismi resta attualmente sconosciuta. Un'area di ricerca in rapido sviluppo è rappresentata dalla comprensione degli effetti indotti da modificazioni epigentiche quali l'acetilazione di istoni e la metilazione del DNA sull'attività trascrizionale e sul rimodellamento della struttura e della funzione della cromatina. L'isolamento e la caratterizzazione di molecole chiave coinvolte in tali modificazioni epigenetiche indica che una varietà di fattori cooperano nella costruzione di vasti complessi che dirigono l'assemblaggio di specifiche conformazioni dei nucleosomi, capaci, a loro volta, di regolare l'attivazione o la repressione trascrizionale.

In questo contesto, abbiamo recentemente sviluppato esteri misti di acido ialuronico con acidi butirrico e retinoico (HBR), che sono risultati essere in grado di indurre l'attivazione di profili di espressione genica responsabili del differenziamento cardiaco in cellule embrionali staminali totipotenti murine (Ventura C, et al., J Biol Chem 279:23574-23579, 2004). Questi risultati ci hanno spinto a verificare se l'HBR potesse avere un potenziale cardio/vasculogenetico anche in cellule staminali umane adulte multipotenti. Tali cellule, in particolare le staminali mesenchimali (hMSCs), esprimono un potenziale differenziativo assai più ampio di quanto inizialmente ipotizzato. Le hMSCs manifestano infatti la capacità di esprimere markers dei tre foglietti embrionali e numerose evidenze sperimentali indicano anche un loro potenziale cardiogenetico. Tuttavia, l'uso di hMSCs isolate dal midollo osseo (BMhMSCs) presenta molteplici problemi legati alla invasività del prelievo, all'invecchiamento cellulare ed alla difficoltà di espansione in vitro con il progressivo invecchiamento del donatore. Fonti alternative di hMSCs apparentemente prive di tali

problematiche sono rappresentate dalla polpa dentale (DPhMSCs) e dalle membrane fetali della placenta a termine (FMhMSCs). Quest'ultima popolazione cellulare sembra essere più ancestrale e dotata di capacità proliferative e di autorinnovamento particolarmente spiccate. In tutte le popolazione di hMSCs studiate (BMhMSCs, DPhMSCs, FMhMSCs), l'HBR ha indotto una elevata resa di differenziamento sia in senso miocardico che vascolare. In particolare, l'estere dell'acido ialuronico ha causato un aumento della trascrizione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5, essenziali nella cardiogenesi di diverse speci animali, uomo incluso, assieme ad un incremento dell'espressione di geni cruciali per la vasculogenesi, quali quelli codificanti per il "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)", per il suo recettore KDR, e per l'"Hepatocyte Growth Factor (HGF)".

Come mostrato nella Figura 1, è ormai chiaro che le capacità riparative delle cellule staminali, in particolare delle hMSCs, risiedono, oltre che nel loro spettro differenziativo, anche nella secrezione di fattori "trofici" che agiscono in maniera "paracrina" nel tessuto ricevente la staminale stessa, innescando risposte di tipo angiogenetico, antiapoptotico ed antifibrotico (essenziale nella "rimozione" di una parte considerevole della cicatrice infartuale e della disfunzione diastolica ad essa associata). Di notevole interesse la scoperta che l'HBR abbia indotto, in ciascuna popolazione di hMSCs, un significativo aumento della secrezione di tali fattori ad attività paracrina, quali il VEGF e l'HGF (Ventura C, et al., J Biol Chem 282:14243-14252, 2007). In questo contesto, l'HBR si configura come una molecola complessa, multifattoriale e multitarget al tempo stesso, basata sia su una logica differenziativa che paracrina (Figura 1). La sua azione è dovuta all'integrazione di una molteplicità di effetti e segnali molecolari, quali: la capacità dell'acido ialuronico di essere internalizzato dal suo recettore specifico CD44 (altamente espresso nelle hMSCs), fungendo sia da carrier per gli altri componenti della molecola (acidi butirrico e retinoico), sia da elemento di ancoraggio per proteine specifiche (hyaladerins) che agiscono come kinasi e fattori di trascrizione tessuto-specifici; l'azione permissiva a livello trascrizionale mediata dall'inibizione delle istone deacetilasi da parte del butirrato; l'attività cardio/vasculogenetica dell'acido retinoico (Figura 2).

Nel complesso, gli effetti indotti *in vitro* dall'HBR erano marcatamente più pronunciati nelle FMhMSCs rispetto alle altre popolazioni di hMSCs. In studi condotti *in vivo*, in ratti sottoposti ad infarto miocardico sperimentale, il trapianto di FMhMSCs precondizionate *ex vivo* con HBR ha condotto alla normalizzazoine dell'attività contrattile e ad una riduzione estremamente significativa dell'area infartuale (Ventura C, *et al., J Biol Chem* 282:14243-14252, 2007). Questo effetto "riparativo" era dovuto sia al differenziamento miocardico e vascolare delle cellule staminali, sia ad una risposta "paracrina" del tessuto ricevente ai fattori di crescita secreti dagli elementi trapiantati.

Pur trattandosi di uno xenotrapianto, il particolare tipo di cellule staminali umane è stato ottimamente tollerato, senza dover fare ricorso ad immunosoppressori. Questa caratteristica è

estremamente interessante perché consentirà in un immediato futuro di studiare le potenzialità differenziative e riparative di cellule staminali umane in modelli sperimentali animali di danno d'organo.

Nel complesso, i risultati ottenuti indicano che l'uso combinato di hMSCs e di molecole innovative a "logica" differenziativa e paracrina potrebbe aprire nuove prospettive nello sviluppo della medicina rigenerativa (Figura 3).

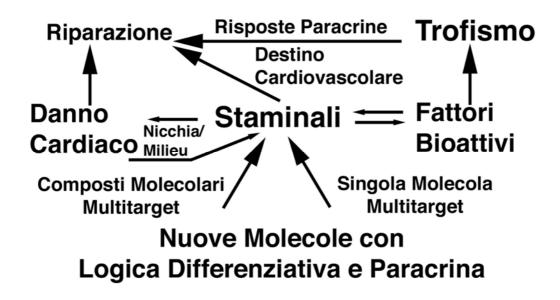


Figura 1. La terapia cellulare e la medicina rigenerativa si possono concepire come un complesso contesto in cui la cellula staminale è al centro di un crocevia in cui si intersecano capacità differenziative, secrezione di fattori trofici ad azione paracrina e la stessa ultrastruttura di specifiche aree del tessuto ricevente (nicchia). Il successo della terapia cellulare dipenderà largamente dalla possibilità di modulare ed orientare questa pluralità di eventi con molecole innovative di sintesi a logica differenziativa e paracrina. Al momento, gli sforzi sono orientati verso lo sviluppo di molecole "multicomponent-multitarget", come l'HBR. In futuro, risposte integrate di tipo differenziativo e paracrino potranno essere gestite da molecole caratterizzate dal paradigma "onecompound-multiple targets".

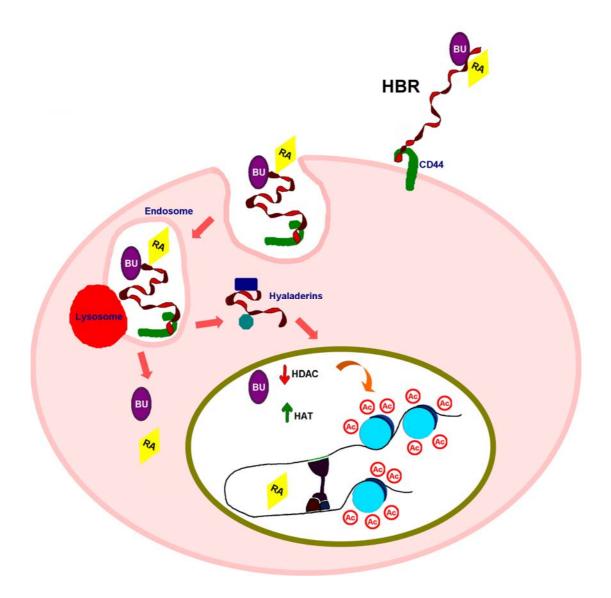


Figura 2. Esteri misti dell'acido ialuronico con acido butirrico e retinoico (HBR) agiscono come composti molecolari multitarget. Il recettore dello ialuronato CD44 è altamente espresso in cellule staminali embrionali e mesenchimali umane adulte. L'acido ialuronico che viene internalizzato grazie a questo recettore agisce anche da "carrier" per composti sintetici coniugati con l'acido ialuronico. Molecole intracellulari in grado di legare l'acido ialuronico ("hyaladerins") traslocano nel nucleo, agendo da substrati o attivatori per importanti kinasi o fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della crescita e del differenziamento cellulare. Il butirrato (BU) inibisce le "istone deacetilasi (HDAC)", un effetto che altera la struttura della cromatina, aumentando l'accessibilità di fattori di trascrizione per specifici siti di interazione (AC, gruppi acetilici). L'acido retinoico (RA), gli inibitori di HDAC, e i coattivatori dotati di attività "istone acetiltransferasica (HAT)" interagiscono con complessi di fattori di trascrizione, innescando un rimodellamento della cromatina. Il risultato è che l'HBR incrementa il destino cardiovascolare di cellule staminali, come anche l'espressione genica e la secrezione di mediatori trofici.

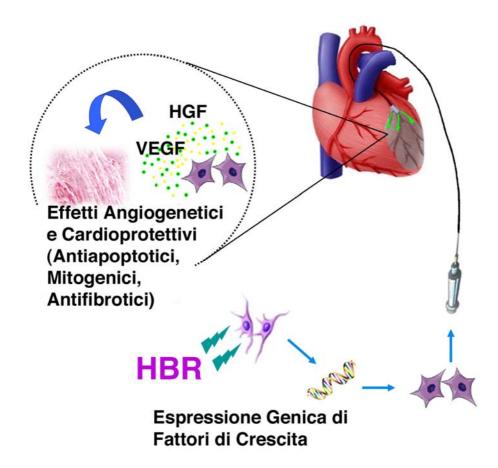


Figura 3. Il trattamento di cellule staminali multipotenti umane con HBR aumenta notevolmente l'espressione genica ed il rilascio di fattori angiogenetici, antiapoptotici ed antifibrotici, quali il "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)" e l'"Hepatocyte Growth Factor (HGF)". Dopo infusione *in vivo* di staminali precondizionate con HBR in modelli animali di infarto miocardico, i fattori di crescita secreti agiscono in maniera paracrina nel miocardio ricevente, portando ad una consistente riduzione dell'area e della cicatrice infartuale.

Sessione "Folding e misfolding di proteine: sperimentazione e computazione"

PROTEIN DESTABILIZATION AND THE DISEASOME

Rita Casadio, Remo Calabrese, Emidio Capriotti*, Piero Fariselli, Pier Luigi Martelli Laboratory of Biocomputing, Department of Biology, University of Bologna, via Irnerio 42, 40126 Bologna, Italy. * now at: Structural Genomics Unit, Department of Bioinformatics, Centro de Investigacion Principe Felipe, Autopista del Saler 16, 46013 Valencia, Spain.

contact: casadio@biocomp.unibo.it; Fax: +39 051 242576.

Synopsis

Human genetic variation is mainly due to Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), accounting for about 90% of overall variations (Collins et al., 1998). One of the main interests of Bioinformatics in relation to SNPs is the understanding of mechanisms responsible for the insurgence of pathologic phenomena related to genetic mutations (Risch et al 1996, Collins et al., 1997). In general, mutations occurring in coding regions may have a greater dramatic impact on the gene functionality (Cargill et al 1999) and for this reason we focus our attention on those SNPs, called missense SNPs (mSNPs) that cause changes in the protein sequence. Mutations can impair proteins when the mutation is directed towards functional residues, and more generally acting on protein stability and/or affecting protein-protein interactions patches. In a recent work, in order to simplify the problem of disease ontology, a network of disorders and disease linked genes [about 2000] was generated on the basis of known disorder–gene associations (the human Diseasome, Goh et al. 2007). The network indicates that the vast majority of disease related genes are nonessential and show no tendency to encode for hub proteins in the human interactome. When mutations occur in essential genes, these are mainly responsible of cancer insurgence (Goh et al. 2007).

A major problem in disease related mutations is also at which extent the mutation is affecting protein stability. The protein stability issue relating to human disease is well established for proteins involved in the phenomena of protein aggregation leading to the formation of amyloid fibers in maladies of dramatic social impact such as Alzheimer, Parkinson and Creutzfeldt-Jakob diseases (Chiti and Dobson, 2006). It is therefore relevant to ask the question as to whether and to which extent mutations, diseases and protein misfolding are related starting from the data of polymorphisms that are presently available. In this paper we will focus on how to predict protein destabilization and accordingly we will discuss some extent of correlation among protein destabilization and specific mutations, suggesting that protein destabilization is a major feature common to several diseases in the Diseasome.

The data base of disease related mutations

First of all we start collecting information from the available data bases. Our dataset is derived from the release 55.2 (April 2008) of the Swiss-Prot database (Boeckmann et al., 2003) containing the OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man references. OMIM is a catalog of human genes and genetic disorders (McKusick 1998).

The protein chains and their mutations were retrieved from Swiss-Prot, with the following constraints:

- i) the protein source is *Homo sapiens*;
- ii) the mutations are related to genetic diseases or neutral polymorphisms (no Unclassified cases are considered);

iii)the data are relative to single point protein mutations (no deletion and insertion mutations are taken into account).

We ended up with an up-to-date, quite large and almost unbiased dataset of single point protein mutations (Table 1). In a recent work it was also suggested that the best dataset for human mSNPs on which learning methods can be trained to predict damaging mutations is that of the Swiss-Prot annotated variants "Disease" and "Polymorphism" (Care et al., 2007).

Table 1. The data set of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

	Only Disease	Both Disease related and	Only Neutral	Total
	related	Neutral SNPs	SNPs	
No of Proteins	606	768	5,977	7,351
No of SNPs	5,174	14,235	14,906	34,315
Disease related	5,174	11,156	0	16,330
Neutral	0	3,079	14,906	17,984

Results and Discussion

Which are the most frequent mutations in our data set?

A statistical analysis in our data set of mutations (Table 2) indicates that the composition of disease-related mutations is different from that of neutral polymorphisms. Some amino acid substitutions are more frequent in the Disease set with respect to the Neutral set. In particular mutations like L-P, G-R, R-C, R-W, are more abundant in the Disease set, while substitutions like A-T, V-I, A-V, I-V, are more abundant in the Neutral set; the R-Q substitution is distributed quite uniformly among the

Disease and Neutral data set.

From our analysis, another interesting result is that direct mutations of functional residues are quite a rare event in genetic maladies. In fact using information extracted from Swiss-Prot "Feature Table" annotations, less than 1% of position regarding "Active Site", "Binding Site", "Site", "Posttranslational Modification", etc., are the same annotated as to be Disease related. The mutational events occurring in the disease insurgence are therefore other that those involving directly important residues for protein function (data not shown).

Table 2. Top scoring mutation in SNPs dataset

	Only Disease	Both Disease related and	Only Neutral SNPs
	related	Neutral SNPs	
Top scoring	L-P 210	G-R 457	R-Q 470
substitutions	G-R 188	R-C 394	A-T 467
	R-W 165	L-P 361	V-I 423
	R-C 163	R-H 345	A-V 401
	R-Q 147	R-Q 344	I-V 378

How to predict protein destabilization upon mutation

The question of how mutations affect protein stability may be addressed starting from sequence and/or from structure (Capriotti et al., 2005a). In proteomics and genomics studies prediction of protein stability free energy change ($\Delta\Delta G$) upon single point mutation may also help the annotation process. The experimental $\Delta\Delta G$ values are affected by uncertainty as measured by standard deviations. Most of the $\Delta\Delta G$ values are nearly zero (about 32% of the $\Delta\Delta G$ data set ranges from -0.5 to 0.5 kcal/mole) and both the value and sign of $\Delta\Delta G$ may be either positive or negative for the same mutation blurring the relationship among mutations and expected $\Delta\Delta G$ value. In order to overcome this problem we recently described a new predictor that discriminates between 3 mutation classes: destabilizing mutations ($\Delta\Delta G$ <-1.0 kcal/mole).

We then developed the I-Mutant Suite that incorporates different machine learning algorithms to predict the effects of non synonymous Single Nucleotide Polymorphism (nsSNPs) in coding regions (Capriotti et al., 2008).

The effect of nsSNPs can be studied considering two main aspects: folding stability and protein functionality loss (affecting human health, Capriotti et al., 2006). I-Mutant Suite provides predictions for both aspects, integrating and improving previously developed predictors. In

particular the new version of I-Mutant- $\Delta\Delta G$ predicts both the sign and the value of the free energy change ($\Delta\Delta G$) upon single point protein mutations, scoring in the classification task with a 80% accuracy and with a correlation coefficient of 0.70 to experimentally detected $\Delta\Delta G$ values, when structure is adopted as input. Furthermore, to better grading the stability predictions, I-Mutant3.0 also provides the capability of discriminating between 3 classes, namely destabilizing, neutral and stabilizing ($\Delta\Delta G$ >0.5 Kcal/mol), scoring with an accuracy of 64% and 68% when protein sequence and structural information are considered, respectively.

The I-Mutant Suite also includes I-Mutant-Disease, a new SVM-based predictor able to discriminate between neutral and disease-related polymorphisms. The predictor is endowed with 74% overall accuracy and with a correlation coefficient of 0.48. I-Mutant Suite is the first web server that integrates in a unique framework the predictions of the folding free energy changes and disease-related effects upon single point protein mutation. Our method improves the quality of the prediction of the free energy change due to single point protein mutations by adopting a hypothesis of thermodynamic reversibility of the existing experimental data.

I-Mutant Suite Predictor of effects of single point protein mutation				
Prediction of protein stability changes upon single point mutation from:				
O Protein Structure (if available)				
Protein Sequence				
Prediction of Disease associated single point mutation from				
O Protein Sequence				
Enter				

Fig1. Home page of the I-Mutant Suite at www.biocomp.unibo.it

By this we both recast the thermodynamic symmetry of the problem and balance the distribution of the available experimental measurements of free energy changes. This eliminates possible overestimations of the previously described methods trained on an unbalanced data set comprising a number of destabilizing mutations higher than stabilizing ones (Capriotti et al., 2008).

Disease and destabilization

We found that the L-P mutation is the most prominent in proteins, harboring only Disease mutations (210 mutations in 104 different sequences, Table 2) and corresponding to 110 types of Disease. Furthermore the L-P mutations is predicted highly destabilizing in 165 cases out of 210. In Table 3 proteins with such mutations are listed together with the predicted value of destabilization with both IMutant3.0 (Capriotti et al. 2008) and I-Mutant2.0 (Capriotti et al. 2005a) and the corresponding reported malady, as annotated in the OMIM data base (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=omim).

Table 3. Some L-P mutations involved in different diseases and their predicted destabilization effect.

Protein	Mutation	OMIM	I-Mutant3.0	I-Mutant2.0
O00116	L469P	Rhizomelic chondrodysplasia punctata type 3 (RCDP3) [MULTIPLE]	-1	0
O15020	L253P	Spinocerebellar ataxia 5 (SCA5) [NEUROLOGICAL]	-1	0
O15287	L71P	Fanconi anemia (FA) [MULTIPLE]	-1	0
O95140	L76P	Charcot-Marie-Tooth disease type 2A2 (CMT2A2) [NEUROLOGICAL]	-1	0
P00492	L41P	Lesch-Nyhan syndrome (LNS) [METABOLIC]	-1	0
P06213	L260P	Leprechaunism [DEVELOPMENTAL]	-1	0
P06280	L32P	Fabry disease (FD) [METABOLIC]	-1	0
P11217	L116P	Glycogen storage disease type 5 (GSD5) [METABOLIC]	-1	0
P40337	L89P	Von Hippel-Lindau disease (VHLD) [CANCER]	-1	0
P78363	L1250P	Stargardt disease type 1 (STGD1) [OPHTHAMOLOGICAL]	-1	0

Protein: the protein accession number in Swiss-Prot; Mutation: the position of the mutation along the protein sequence with only annotated Disease substitutions; OMIM: Disease name definition mapped on Goh et al. classification; Predictions are performed with I-Mutant3.0 and I-Mutant2.0, respectively. It must be noticed that -1 (Decrease) of the three output predictor correspond to the 0 (Decrease) of the two output predictor.

Acknowledgments

R. Casadio acknowledges the receipt of the following grants: a FIRB 2003 LIBI - International Laboratory of Bioinformatics and the support to the Bologna node of the Biosapiens Network of Excellence project within the European Union VI Framework Programme. R.Calabrese is supported by a FIRB 2003-LIBI grant and a Biosapiens grant, respectively.

References

- Capriotti, E, Fariselli, P, Casadio R. (2005a). I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. Nucleic Acids Res. 33, W306-10.
- Capriotti, E., Fariselli, P., Calabrese, R., Casadio, R. (2005b). Predicting protein stability changes from sequences using support vector machines. Bioinformatics, 21 (Suppl 2), ii54-ii58.
- Capriotti, E., Calabrese, R., Fariselli, P., Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. Bioinformatics, 22, 2729-2734.
- Capriotti, E, Fariselli, P, Rossi, I, Casadio, R.A (2008). three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. BMC Bioinformatics. 26, Suppl 2:S6.
- Care M.A., Needham C.J., Bulpitt A.J., Westhead D.R. (2007). Deleterious SNP prediction: be mindful of your training data! Bioinformatics 23, 664-672.
- Cargill, M., Altshuler D, Ireland J, Sklar P, Ardlie K, Patil N, Shaw N, Lane CR, Lim EP, Kalyanaraman N, Nemesh J, Ziaugra L, Friedland L, Rolfe A, Warrington J, Lipshutz R, Daley GQ, Lander ES. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. Nat. Genet., 22, 231–238.
- Chiti, F., Dobson, CM. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Ann. Rev. Biochem., 75, 333-66.
- Collins, F.S., Guyer, M.S., Charkravarti, A. (1997). Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. Science, 278, 1580–1581
- Collins, F.S. et al. (1998). A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res., 8, 1229–1231.
- Goh, K., Cusick M.E., Vallet D., Childsl B., Vidal M., Barabasi L. (2007). The human disease network. Proc. Natl. Acad. Science 104, 8685-8690.
- McKusick, V.A. (1998). Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition).

AGGREGATION PROPENSITY OF THE HUMAN PROTEOME

Elodie Monsellier, Matteo Ramazzotti, Niccolò Taddei and Fabrizio Chiti Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli studi di Firenze, Viale Morgagni, 50, 50134 Firenze, Italy

Introduction

The conversion of peptides and proteins into insoluble fibrillar aggregates is the hallmark of *ca*. 40 human diseases [1-2]. It is now clear, however, that the formation of such well-organized fibrillar aggregates, generally referred to as amyloid fibrils when deposition occurs extracellularly, is not a characteristic of the few unfortunate sequences associated with protein deposition diseases, but a generic property of polypeptide chains [3]. This novel concept has raised the question as to how protein aggregation is prevented effectively in living organisms. Molecular chaperones and several dedicated cellular quality control mechanisms can fulfill this requirement [4-5]. However, it has also emerged that proteins have evolved numerous sequence and structural adaptations to counteract their natural tendency to aggregate into amyloid-like fibrils [6].

The generality of amyloid fibril formation has also suggested that this phenomenon may be governed by simple and rationalizable physicochemical factors, leading to the development of algorithms capable of predicting aggregation parameters of unstructured polypeptides directly from their amino acid sequence [7-14]. Computational methods based on atomistic description and/or molecular dynamics were also developed [15-20]. These algorithms have the potential to predict a number of aggregation-related parameters, including the aggregation rate or aggregation propensity of a polypeptide chain, the regions of the sequence that promote aggregation and the effect of mutations on the aggregation behavior.

The simplicity of the sequence-based algorithms allowed their application to the systematic analysis of all the protein sequences composing the proteomes of one or more living organisms [21-25]. By using this strategy, Serrano and co-workers demonstrated that intrinsically disordered proteins have a lower aggregation propensity than globular proteins [21]. The same group also showed that positions at the sides of aggregation-promoting regions of proteins from *E. coli* are enriched with residues with a low aggregation propensity, such as proline, arginine, lysine, glutamate and aspartate [22]. Interestingly, when the analysis is restricted to the most highly aggregation-promoting regions, only proline, lysine and arginine become dominant at these flanking positions [22]. Their over-representation at these positions can result from the physicochemical properties of these residues, as well as from their ability to be recognized by *E. coli* co-translational chaperones when associated with hydrophobic stretches [22].

In another work the entire proteomes of *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* and *C. elegans* were analyzed [23]. Proteins normally forming oligomeric complexes were found to have an aggregation

score lower than those operating in a free form in all three organisms [23]. This was explained by considering that oligomer-forming proteins are at risk for aggregation as they constantly interact with other polypeptide chains. In addition, essential proteins were found to have a lower aggregation score than non-essential proteins, emphasizing the evolutionary pressure that has acted on the former to minimize their aggregation propensity [23]. Using another independently developed algorithm, Tartaglia and co-workers demonstrated that the average aggregation propensity of a proteome correlates inversely with the complexity and longevity of the related organism [24]. The same authors found that in the yeast proteome proteins related to different functions have very different aggregation potentials [25].

Methodology/Principal Findings

In this work we use a previously developed algorithm [8,11,26] to analyze the 34,180 protein sequences of the human proteome. The algorithm is based on simple characteristics of the primary sequence, such as hydrophobicity, β -sheet propensity and charge, previously recognized to be important determinants of the aggregation process [7]. It predicts the fibril elongation rate of an initially unstructured polypeptide chain as well as the regions of the sequence that promote its aggregation, and has been extensively validated against experimental data [8,11,26]. This algorithm represents therefore a valid and straightforward computational tool to quantify the intrinsic aggregation propensity and identify the aggregation-promoting regions of a large quantity of protein sequences.

We show that long proteins have, on average, less intense aggregation peaks than short ones. Proteins with different sub-cellular localizations have different aggregation propensities, in relation to the various efficiencies of quality control mechanisms. Human proteins involved in amyloidoses *in vivo* do not differ extensively from the rest of the proteome, further demonstrating the generality of protein aggregation. We were also able to reproduce some of the results obtained with other algorithms, demonstrating that the results obtained do not depend on the type of computational tool employed. For example, membrane proteins, intrinsically disordered proteins and folded proteins were confirmed to have very different aggregation propensities, as a consequence of their different structures and cellular microenvironments. In addition, gatekeeper residues at strategic positions of the sequences were found to protect human proteins from aggregation.

Conclusions/Significance

The application of this computational tool to the human proteome enabled us to recognize unprecedented features, including an inverse correlation between aggregation propensity and protein length, and a discrepancy between the aggregation propensities of proteins taking the secretory pathway (operating in the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes and extracellular media) and those operating in other intracellular compartments (nucleus, mitochondria, ribosomes, cytoskeleton). We were also able to reproduce some of the results obtained with other algorithms, demonstrating that the results obtained do not depend on the type of computational tool employed, and cross-validating the different existing algorithms. Our results show that different structural subpopulations of the human proteome have actually different average aggregation propensities, whereas proteins involved in amyloid diseases *in vivo* do not differ extensively from the human proteome taken at a whole in terms of aggregation propensity. Taken together, these results lend further support to the view that modulation of the aggregation propensity has been a driving force in protein evolution. It also helps identify the categories of human proteins that are at risk for aggregation and need a more strict control by the cellular machinery.

The results of these comparative analyses highlight the existence of intimate links between the propensity of proteins to form aggregates with β -structure and their biology. In particular, they emphasize the existence of a negative selection pressure that finely tune protein sequences in order to adapt their aggregation propensity to their biological context.

References

- 1. Selkoe DJ (2003) Folding proteins in fatal ways. Nature 426: 900-904.
- 2. Chiti F and Dobson CM (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. Annu Rev Biochem 75: 333-366.
- 3. Dobson CM (1999) Protein misfolding, evolution and disease. Trends Biochem Sci 24: 329-332.
- 4. Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 781-791.
- 5. Bukau B, Weissman J, Horwich A (2006) Molecular chaperones and protein quality control. Cell 125: 443-451.
- 6. Monsellier E and Chiti F (2007) Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. EMBO Rep 8: 737-742.
- 7. Chiti F, Stefani M, Taddei N, Ramponi F, Dobson CM (2003) Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. Nature 424: 805-808.
- 8. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, et al. (2004) Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. J Mol Biol 341: 1317-1326.
- 9. Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. Nat Biotechnol 22: 1302-1306.

- Tartaglia GG, Cavalli A, Pellarin R, Caflisch A (2004) The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. Protein Sci 13: 1939-1941.
- Pawar AP, DuBay KF, Zurdo J, Chiti F, Vendruscolo M, et al. (2005) Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. J Mol Biol 350: 379-392.
- 12. Tartaglia GG, Cavalli A, Pellarin R, Caflisch A (2005) Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments in polypeptide sequences. Protein Sci 14: 2723-2734.
- 13. de Groot NS, Aviles FX, Vendrell J, Ventura S (2006) Mutagenesis of the central hydrophobic cluster in Abeta42 Alzheimer's peptide. Side-chain properties correlate with aggregation propensities. FEBS J 273: 658-668.
- 14. Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X, et al. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. BMC Bioinformatics 8: 65.
- 15. Yoon S and Welsh WJ (2004) Detecting hidden sequence propensity for amyloid fibril formation. Protein Sci 13: 2149-2160.
- 16. Galzitskaya OV, Garbuzynskiy SO, Lobanov MY (2006) Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains. PLoS Comput Biol 2: e177.
- 17. Saiki M, Konakahara T, Morii H (2006) Interaction-based evaluation of the propensity for amyloid formation with cross-beta structure. Biochem Biophys Res Commun 343: 1262-1271.
- 18. Thompson MJ, Sievers SA, Karanicolas J, Ivanova MI, Baker D, et al. (2006) The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 4074-4078.
- 19. Trovato A, Chiti F, Maritan A, Seno F (2006) Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins. PLoS Comput Biol 2: e170.
- 20. Zhang Z, Chen H, Lai L (2007) Identification of amyloid fibril-forming segments based on structure and residue-based statistical potential. Bioinformatics 23: 2218-2225.
- 21. Linding R, Schymkowitz J, Rousseau F, Diella F, Serrano L (2004) A comparative study of the relationship between protein structure and b-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. J Mol Biol 342: 345-353.
- 22. Rousseau F, Serrano L, Schymkowitz JW (2006) How evolutionary pressure against protein aggregation shaped chaperone specificity. J Mol Biol 355: 1037-1047.
- 23. Chen A and Dokholyan NV (2008) Natural selection against protein aggregation on self-interacting and essential proteins in yeast, fly and worm. Mol Biol Evol. In press.
- 24. Tartaglia GG, Pellarin R, Cavalli A, Caflisch A (2005) Organism complexity anti-correlates with proteomic beta-aggregation propensity. Protein Sci 14: 2735-2740.
- 25. Tartaglia GG and Caflisch A (2007) Computational analysis of the S. cerevisiae proteome reveals the function and cellular localization of the least and most amyloidogenic proteins. Proteins 68: 273-278.
- 26. Monsellier E, Ramazzotti M, Polverino de Laureto P, Tartaglia GG, Taddei N, et al. (2007) The distribution of residues in a polypeptide sequence is a determinant of aggregation optimized by evolution. Biophys J 93: 4382-4391.

INTERMEDI DI REFOLDING DI B2-MICROGLOBULINA E FIBRILLOGENESI

Corazza A.¹, Rennella E.¹, Mimmi M.C.¹, Shanda P.², Fogolari F.¹, Viglino P.¹, Giorgetti S.³, Raimondi S.³, Stoppini M.³, Bellotti V.³, Brutscher B.² and Esposito G.¹

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, Università di Udine, P.le Kolbe, 4 - 33100 Udine - Italy

La proteina β 2-microglobulin (β 2-m) è la catena leggera non polimorfica del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I. La sua deposizione in forma fibrillare è associata alla amiloidosi da emodialisi (Gejyo et al., 1985), una patologia che insorge in individui con insufficienza renale cronica dopo trattamento emodialitico prolungato. Lo studio della cinetica di refolding di β 2-m mediante motodologia stopped-flow (Chiti et al., 2001) ha chiaramente evidenziato la comparsa di un intermedio lento, denominato I₂, caratterizzato da una costante di conversione alla forma nativa di circa 10³ s¹. La recente caratterizzazione del mutante Trp60Gly di β 2-m, in cui l'introduzione di glicina riduce la flessibilità conformazionale, l'associazione dinamica e la capacità di formare fibrille in 20% TFE (Esposito et al., 2008), ha suggerito di intraprendere lo studio comparato della cinetica di refolding della proteina naturale e del mutante, ad un livello di definizione puntuale mediante NMR. L'analisi è stata condotta con un metodo NMR bidimensionale in tempo reale, l'esperimento SOFAST (Selective Flip Angle Short Transient), in grado di produrre spettri con risoluzione temporale di pochi decimi di secondo. I risultati mostrano che il processo di refolding è più complesso di quanto riportato in precedenza ed implica più di un singolo intermedio lento, offrendo nuovi elementi per l'interpretazione della fibrillogenesi.

Riferimenti

Chiti, F., Mangione P., Andreola A., Giorgetti S., Stefani M., Dobson C.M., Bellotti V. and Taddei N. (2001) J. Mol. Biol. 307, 379-391.

Esposito, G., Ricagno S., Corazza A., Rennella E., Gümral D., Mimmi M.C., Betto E., Pucillo C.E., Fogolari F., Viglino P., Raimondi S., Giorgetti S., Bolognesi B., Merlini G., Stoppini M., Bolognesi M. and Bellotti V. (2008) J. Mol. Biol. 378, 885-895.

Gejyo F., Yamada T., Odani S., Nakagawa Y., Arakawa M., Kunitomo T., Kataoka H., Suzuki M., Hirasawa Y., Shirahama T., Cohen A.S. and Schmid K.(1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 129, 701-706.

² Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), Centre National de la Recherche Scientifique, Université Joseph Fourier, Grenoble – France

³ Dipartimento di Biochimca, Università di Pavia, Via Taramelli 3b - 27100 Pavia - Italy

MISFOLDING AND AMYLOID AGGREGATION OF APOMYOGLOBIN

*Ivana Sirangelo, Silvia Vilasi, Clara Iannuzzi, Gaetano Irace*Dipartimento di Biochimica e Biofisica, Seconda Università degli Studi di Napoli

A growing number of diseases appear to be caused by aggregation of misfolded proteins forming insoluble amyloid fibrils that are deposited in the extra- and intracellular space (1-4). The characteristics of fibrils, namely structure and morphology, observed by electron microscopy and X-ray diffraction appear to be similar. In fact, they display a core cross-β-sheet structure in which continuous β -sheets run perpendicular to the long axis of the fibrils (5). Fibril formation occurs after a defined period of time, called the lag time, during which protein monomers associate forming soluble oligomers. These oligomers serve as nuclei for fibril elongation (6,7). The propensity to form amyloid fibrils is now believed to be a generic property of the polypeptide chain and varies from protein to protein depending on the experimental conditions used to perturb the native structure (3,8,9). The conversion of globular proteins into insoluble fibrillar aggregates requires significant conformational changes that in most cases are facilitated by amino acid mutations that destabilize the native state and increase the structural flexibility of the peptide chain. However, other proteins are amyloidogenic in the wild-type form (10,11). Amyloid fibril formation is known to be driven both by hydrophobic and electrostatic interactions. "In vitro", the process is generally initiated when the native state of a protein is slightly destabilized, originating partially folded intermediates that are more prone to aggregation. High-denaturant concentration does not favor the formation of protein aggregates, because denaturant-protein interactions prevent contacts among protein molecules. Similarly, the establishment of intermolecular interactions in strongly acidic conditions is avoided by the electrostatic repulsion among positively charged groups. Therefore, the in vitro formation of amyloid fibrils is favored in conditions in which partially folded conformations are populated (4). More recently, a growing interest has been turned to the study of aggregation under experimental conditions not drastically different from the natural setting, in which proteins are initially in a native-like conformation (12,13).

Myoglobin is a highly soluble globular protein whose native state properties, i.e., the overall α -helical structure, do not lead us to hypothesize any predisposition to forming amyloid fibrils. In fact, most of its amino acid sequence is organized in well defined α -helices with few or no elements of β -sheets. Recently, we have shown that the apomyoglobin mutant W7FW14F at physiological pH and room temperature forms amyloid fibrils by a population of prefibrillar aggregates in about 15 days (14,15). These fibrils share several morphological, structural, and tinctorial features typical of amyloids, including increased thioflavin T fluorescence and yellow-

green birefringence under cross-polarized light upon Congo Red binding. Atomic force microscopy of the fibrils indicated an average fibril diameter of about 3–5 nm and a length of >1000 nm (16).

In the present study, we analyze the apomyoglobin aggregation in the earliest stages of the process. The results show that the conformational state of the amyloid-forming apomyoglobin at physiological pH presents, at the beginning of the aggregation process, only minor structural modifications compared with the native form of the wild-type protein. This was probed by examining the time dependence of far UV CD activity, FTIR spectroscopy, Soret absorption, and Soret rotational strength. The following similarities at pH 7.0 between amyloid-forming apomyoglobin and wildtype protein were detected: (1) the content of helical structure is quite similar, i.e., 56% and 65%, respectively; (2) the amide I maximum in FTIR spectra is positioned at 1647 cm⁻¹, a wavenumber typical of helical structures, (3) both proteins bind the prosthetic group with similar spectroscopic properties. Despite these similarities, the W7FW14F apomyoglobin rapidly aggregates forming amyloid fibrils.

Recently, it has been reported that the 1–36 N-terminal fragment of wild-type apomyoglobin displays a high level of β -structure and forms macroscopic aggregates when the pH gets closer to neutrality (17). The W-F substitutions at positions 7 and 14 certainly contribute to increase the hydrophobicity and the β -propensity of the N-terminal region (15), thus making the protein more prone to aggregate under physiological conditions. Moreover, a recent report showed that the mutations that play a critical role in the rate-determining step of apomyoglobin aggregation are those located within the N-terminal region of the molecule (18). These observations strongly suggest that aggregation of W7FW14F apomyoglobin could start through the association of the N-terminal regions of natively folded molecules.

Similarly to what was observed with amyloidogenic proteins, mature fibrils formed by W7FW14F are not cytotoxic, whereas prefibrillar aggregates are (15,16).

The identification of molecules that inhibit protein deposition or reverse fibril formation may be a critical step toward a better understanding of the pathophysiology of deposits and their discovery could open new avenues for therapeutic intervention. Numerous compounds have been shown to inhibit specific amyloid aggregation in vitro. We focused our attention on tetracycline and trehalose which have been reported to inhibit aggregation in several amyloid disorders. Our results demonstrate that both compounds inhibit W7FW14F apomyoglobin fibrillogenesis but do not cause disaggregation of existing fibrils. Moreover, these compounds produce highly toxic intermediate species, thus suggesting that "amyloid fibril inhibitors" could lead to more pronounced pathology owing to the accumulation of soluble disease-associated oligomers. The

term "aggregation inhibition" can be misleading because amyloid aggregation is a complex nucleation-polymerization process that begins with toxic oligomeric precursors and continues with their assembly into harmless mature fibrils. Evaluation of potential antiaggregating drugs as therapeutic agents must therefore take into account the entire aggregation process, not only the formation of fibrils.

References

- 1. Kelly, J.W. 1998. The alternative conformations of amyloidogenic proteins and their multi-step assembly pathways. Curr. Opin. Struct. Biol. 8: 101–106.
- 2. Sigurdsson, E.M., Wisniewski, T., and Frangione, B. 2002. Infectivity of amyloid diseases. Trends Mol. Med. 8: 411–413.
- 3. Dobson, C.M. 2003. Protein folding and misfolding. Nature 426: 884-890.
- 4. Uversky, V.N. and Fink, A.L. 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: The importance of being unfolded. Biochim. Biophys. Acta 1698: 131–153.
- 5. Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B., and Blake, C.C. 1997. Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. J. Mol. Biol. 273: 729–739.
- Booth, D.R., Sunde, M., Bellotti, V., Robinson, C.V., Hutchinson, W.L., Fraser, P.E., Hawkins, P.N., Dobson, C.M., Radford, S.E., Blake, C.C., et al. 1997. Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis. Nature 385: 787–793.
- 7. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M., and Stefani, M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding disease. Nature 416: 507–511.
- 8. Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G., and Dobson, C.M. 1999. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. 96: 3590–3594.
- 9. Fandrich, M., Forge, V., Buder, K., Kittler, M., Dobson, C.M., and Diekmann, S. 2003. Myoglobin forms amyloid fibrils by association of unfolded polypeptide segments. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 15463–15468.
- 10. Stefani, M., and Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution, *J. Mol. Med.* 81, 678-699.
- 11. Stefani, M. (2004) Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world, *Biochim. Biophys. Acta 1739* (1), 5-25.
- 12. Marcon, G., Plakoutsi, G., Canale, C., Relini, A., Taddei, N., Dobson, C.M., Ramponi, G., and Chiti, F. 2005. Amyloid formation from HypF-N under conditions in which the protein is initially in its native state. J. Mol. Biol. 347: 323–335.
- 13. Sambashivan, S., Liu, Y., Sawaya, M.R., Gingery, M., and Eisenberg, D. 2005. Amyloid-like fibrils of ribonuclease A with three-dimensional domainswapped and native-like structure. Nature 437: 266–269.
- Sirangelo, I., Malmo, C., Casillo, M., Mezzogiorno, A., Papa, M., and Irace, G. 2002. Tryptophanyl substitutions in apomyoglobin determine protein aggregation and amyloid-like fibril formation at physiological pH. J. Biol. Chem. 277: 45887–45891.

- 15. Sirangelo, I., Malmo, C., Iannuzzi, C., Mezzogiorno, A., Bianco, M.R., Papa, M., and Irace, G. 2004. Fibrillogenesis and cytotoxic activity of the amyloid-forming apomyoglobin mutant W7FW14F. J. Biol. Chem. 279:13183–13189.
- 16. Malmo, C., Vilasi, S., Iannuzzi, C., Tacchi, S., Cametti, C., Irace, G., and Sirangelo, I. 2006. Tetracycline inhibits W7FW14F apomyoglobin fibril extension and keeps the amyloid protein in a pre-fibrillar, highly cytotoxic state. FASEB J. 20: 346–347.
- 17. Chow, C.C., Chow, C., Raghunathan, V., Huppert, T.J., Kimball, E.B., and Cavagnero, S. 2003. Chain length dependence of apomyoglobin folding:Structural evolution from misfolded sheets to native helices. Biochemistry 42: 7090–7099.
- 18. Vilasi, S., Dosi, R., Iannuzzi, C., Malmo, C., Parente, A., Irace, G., and Sirangelo, I. 2006. Kinetics of amyloid aggregation of mammal apomyoglobins and correlation with their amino acid sequences. FEBS Lett. 580: 1681–1684.

METALLI ED ALZHEIMER

*Enrico Rizzarelli*Dipartimento di Scienze Chimiche, Università di Catania

La malattia di Alzheimer(AD) è caratterizzata dalla presenza nel cervello di placche senili extracellulari e da "gomitoli" neurofibrillari intracellulari.(1,2) I principali costituenti delle placche sono peptidi amiloidi (A β) che contengono da 39 a 43 residui amminoacidici generati per azione proteolitica da una glicoproteina (APP) di membrana.(3,4) A β forma oligomeri solubili e fibrille amiloidi insolubili con un elevato contenuto di β -sheets.(5) Tuttavia non vi è accordo circa la natura della genesi di A β e dei suoi aggregati; differenti tipi di aggregati di A β esplicano diversa tossicità verso le cellule. Secondo alcuni, gli oligomeri A β inibiscono la vitalità neuronale in misura dieci volte superiore a quella delle fibrille in cellule di neuroblastoma,(6) mentre, secondo altri sono gli aggregati fibrillari di A β , ma non i suoi aggregati amorfi, la causa della morte neuronale.(7) Di conseguenza, è il livello e la tipologia dell'aggregazione del peptide che determina il grado di neurotossicità, suggerendo che l'aggregazione di A β rimane l'evento essenziale nella patogenesi di AD.

Poiché il processo di aggregazione è ritenuto l'evento determinante della patologia, i fattori che concorrono all'aggregazione dell'Aβ sono stati oggetto di intensi studi.(8,9) In questo contesto, l'ipotesi più diffusa è rappresentata dall'Amyloid Cascade Hypothesis, (10) secondo la quale la patologia di Alzheimer origina a valle dell'eccessivo accumulo di Aβ nel SNC. Recentemente, è stato dimostrato che l'innalzamento dei livelli di Aβ non può costituire la sola causa della patologia, sebbene il ruolo centrale di Aβ in AD non sia stato messo in discussione.(11) Se la elevata concentrazione di Aß fosse la sola causa della formazione di aggregati tossici, sarebbe difficile spiegare le ragioni per cui i depositi amiloidi siano localizzati solo a livello cerebrale quando sia APP che Aβ sono espressi anche in altri compartimenti. Inoltre, attribuire l'accumulo di placche alla presenza del peptide A β (1-42), solamente, non trova fondamento nel fatto che tale molecola è un normale componente del FCS. Infine, mentre la formazione di placche amiloidi aumenta con l'aumentare dell'età, non vi sono evidenze che tale incremento coinvolga anche Aβ. conseguenza, quelle variazioni che sono correlate con l'invecchiamento e che generalmente precedono la formazione degli aggregati molto probabilmente giocano ruoli determinanti negli eventi biochimici e nelle reazioni che causano l'accumulo di Aß nelle specifiche aree cerebrali coinvolte nella patologia di Alzheimer. D'altra parte è stato accertato che i livelli dei metalli del blocco d e delle loro proteine di trasporto e di deposito variano significativamente con l'età.(12) E' stato anche riportato che, in piccoli animali, i livelli di Mn, Fe, Cu e Zn aumentano con

l'invecchiamento, mostrando una variabilità compartimento-specifica all'interno del cervello.(13) Poiché l'invecchiamento è il maggior fattore di rischio in AD, le alterazioni nella distribuzione e nel livello degli ioni metallici con l'età potrebbero esser rilevanti nella patogenesi della malattia. Recentemente, è stata avanzata l'ipotesi che sia l'interazione di $A\beta$ con specifici ioni metallici (rame e zinco) all'origine della patogenicità di $A\beta$ ed è stata avanzata una nuova ipotesi denominata *The Metal Hypothesis of Alzheimer*.(14)

E' dalla metà degli anni novanta che è stato dimostrato che l'interazione di $A\beta(1-40)$ ed $A\beta(1-42)$ con Zn²⁺ e Cu²⁺ può indurre l'aggregazione dei peptidi (15,16) e il contemporaneo aumento delle concentrazioni di ioni del blocco d nelle placche amiloidi dei malati di Alzheimer.(17) Recenti risultati indicano che la disomeostasi nel cervello degli ioni di transizione è associata ad AD: 1) lo zinco(II) endogeno sinaptico contribuisce alla deposizione cerebrale del peptide amiloide (18) mentre la soppressione dello specifico trasportatore dello zinco(II), Zn-T3, porta ad una riduzione della formazione delle placche in modelli animali;(19) 2) placche amiloidi e deficit cognitivo si originano in animali che utilizzano acqua contenente tracce di rame(II).(20) Al contrario, livelli elevati di rame nella dieta riducono la concentrazione di Aβ in vivo(21) e inibiscono l'aggregazione di AB(1-42) in vitro.(22) Come il rame(II), anche lo zinco(II) esplica un duplice effetto su AB, mostrando anche un ruolo protettivo nei riguardi della tossicità del peptide amiloide.(23) Analogamente al contrastante scenario biologico, risultati contraddittori sono stati riportati per quanto attiene a: a) stechiometria, b) affinità, c) modi di coordinazione degli ioni metallici, d) variazioni conformazionali da essi indotte, e) intorno di coordinazione nei monomeri e negli oligomeri.(24-28) L'esigenza di ottenere una determinazione affidabile delle specie formate dagli ioni di transizione con AB, la loro stabilità termodinamica e le loro caratteristiche di coordinazione appaiono ulteriormente avvalorate visto che dai dati di letteratura sembra emergere che l'azione protettiva o tossica degli ioni metallici dipende non solo dal livello delle loro concentrazioni, ma anche dal rapporto metallo/peptide.(29) Le differenti specie formate sarebbero responsabili di differenti morfologie con diversa tossicità, correlabile con la specifica tipologia di coordinazione.(30)

La regione N-terminale del peptide $A\beta(1-42)$, comprendente i residui amminoacidici 1-16, è stata individuata come il luogo di interazione degli ioni metallici; anche se il frammento peptidico $A\beta(1-16)$ è più solubile del peptide intero, la stechiometria, l'affinità e le caratteristiche di coordinazione dei metalli di transizione sono state limitate allo studio del sistema in cui il rapporto metallo/legante era 1:1 a causa della formazione di precipitato a rapporti più elevati. La sintesi del coniugato dell' $A\beta(1-16)$ con polietilenglicole (PEG) ha permesso di superare i limiti di solubilità prima indicati e di poter utilizzare una tecnica affidabile come la potenziometria per una accurata indagine

termodinamica, ottenendo la speciazione dei complessi sia del rame(II) che dello zinco(II) e le relative costanti al variare sia del pH che del rapporto metallo/legante.(31) Per la prima volta è stato possibile determinare: a) che l'A β può legare 4 equivalenti di rame(II) e tre equivalenti di zinco(II) e b) i valori di costanti di affinità per le singole specie; i diversi contributi dei differenti complessi spiegano la grande variabilità riscontrabile in letteratura. Infatti i valori delle costanti di dissociazione (K_D) dei complessi dello zinco(II) riportati sia per $A\beta$ (1-40) che per i frammenti $A\beta$ (1-28) e $A\beta$ (1-16) cadono nell'ampio intervallo compreso tra 100 nmol/L e 300 μ mol/L,(32) mentre quelli relativi ai complessi del rame mostrano valori compresi tra 0,1 nmol/L e 10 μ mol/L. Differenti motivazioni sono state riportate per spiegare questa enorme variabilità (competizione con il tampone, presenza di differenti aggregati, etc); emerge in ogni caso una ingiustificata identificazione di *binding sites* con specie complessa. Si identificano siti di legame ad alta affinità ed a bassa affinità (con relativi valori di K_D) senza tener conto che uno stesso sito di legame può dar origine a differenti specie complesse (protonate, neutre e deprotonate); queste possono esistere nello stesso intervallo di pH, anche se in diversa percentuale, come evidenziato dai grafici di distribuzione delle specie.(31)

Differenti modelli di coordinazione sono stati proposti per rame(II) e zinco(II) riguardanti gli atomi donatori coinvolti, la geometria di coordinazione, il carattere intramolecolare o intermolecolare di interazione degli ioni metallici, il permanere od il variare delle caratteristiche di coordinazione tra i complessi con i monomeri e quelli con gli oligomeri. Per determinare la struttura delle diverse specie complesse dell'A β (1-16)PEG, si è fatto ricorso ad uno studio comparativo mediante l'utilizzo di una serie di frammenti più corti e/o contenenti una singola mutazione. Così il peptide "wild-type" A β (1-16), il relativo analogo con l'alanina al posto della tirosina A β (1-16)Y10A ed i frammenti A β (1-4), A β (1-6), Ac-A β (1-6) ed Ac-A β (8-16)Y10A, ammidati al C-terminale, sono stati impiegati per assegnare il coinvolgimento nel legame agli ioni metallici del gruppo amminico N-terminale, dei gruppi carbossilici dei differenti residui Asp e Glu, come dei gruppi imidazolici delle tre istidine e dell'OH della tirosina.

Il combinato approccio termodinamico e spettroscopico (UV-vis, CD, EPR e NMR) ha permesso di evidenziare:1) la presenza di macrochelati con coinvolgimento delle istidine e dei gruppi carbossilici a pH inferiore a 7 e per rapporti substechiometrici; 2) la formazione di specie con lo ione metallico ancorato alle istidine con contemporanea deprotonazione degli azoti peptidici nell'intervallo di pH fisiologico ed in presenza di equivalenti crescenti di rame(II) e zinco(II); 3) il mancato coinvolgimento dell'OH della tirosina; 4) la preferenza del rame(II) ad interagire con la regione N-terminale (residui 1-6), dove il gruppo amminico rappresenta il sito di ancoraggio, e quella dello zinco(II) per il dominio C-terminale che vedono come gruppi leganti gli imidazoli delle

istidine (residui 13 e 14). Sulla base di questa diversa tendenza è stato possibile, per la prima volta, caratterizzare complessi a metallo misto formati da rame(II) e zinco(II) con $A\beta$.(33), in analogia con quanto recentemente riportato per la proteina prione.(34)

In aggiunta al suo ruolo nei processi di aggregazione dei peptidi amiloidi, vi sono evidenze che indicano che il rame(II) legandosi ad Aβ induce processi redox con conseguente neurotossicità.(35) Studi in vitro hanno mostrato che lo ione Cu²⁺ in presenza di Aß forma specie reattive dell'ossigeno via reazione di Fenton.(36) Pertanto, per il trattamento di AD, è stata proposta una strategia basata sulla chelazione degli ioni metallici.(37,38) In questo contesto, è stato riportato che il cliochinolo (5-iodio,7-cloro, 8-idrossichinolina) é in grado non solo di diminuire la formazione di aggregati proteici in topi trasgenici, (39) così come qualche altro legante lipofilo, DP-109, (40) ma anche di ritardare il deficit cognitivo.(41) Più recentemente, sono stati progettati nuovi chelanti multifunzionali capaci non solo di coordinare gli ioni metallici, ma anche di esplicare attività antiossidante e di attraversare la barriera ematoencefalica.(42) I principali markers dello stress ossidativo nelle patologie neurodegenerative sono rappresentati da: a) aumentata ossidazione lipidica e proteica; b) nitrazione proteica dovuta a perossinitrito;c) aumentata concentrazione di 4idrossinonenale; d) ossidazione di DNA nucleare e mitocondriale; e) diminuita utilizzazione del glucosio. Un dipeptide naturale, la carnosina (β-alanil-L-istidina) e suoi analoghi possiedono attività antiossidante, capacità di chelare sia il rame(II) che lo zinco(II) e di inibire la glicosilazione enzimatica delle proteine.(43) Questi peptidi, sintetizzati enzimaticamente dalla non carnosinsintetasi nel bulbo olfattivo(44) e degradati dalle carnosinasi,(45) si trovano in elevate concentrazioni nel cervello nel FCS(46) mostrando alterazioni correlate con l'invecchiamento.(47) E' stato anche ipotizzato che tali peptidi possano svolgere un ruolo nei riguardi di AD e altre patologie neurodegenerative. (48,49) Recentemente, é stato dimostrato che il dipeptide previene la *up-regulation* dell'NO-Sintasi che può essere indotta da stress nitrosativo.(50) Inotre, abbiamo potuto dimostrare la correlazione diretta tra protezione cellulare e capacità della carnosina di agire da scavenger del radicale NO per l'abilità del dipeptide di dare addotti stabili con detto radicale in esperimenti *cell-free*.(51) La carnosina mostra anche attività antiapoptodiche(52) ed antiossidanti(53) in modelli animali. Questi risultati indicano che il dipeptide ed i suoi analoghi possono essere utilizzati come agenti multifunzionali per la prevenzione e/o il trattamento di patologie neurodegenerative, qualora si trovi il modo di bloccare l'attività degradativa della carnosinasi specifica che agisce nel cervello. Per rendere efficaci questi potenziali farmaci sono stati sintetizzati dei glicoconiugati della carnosina e dei suoi analoghi(54) che hanno mostrato attività chelante, (55) scavenger verso ROS e RNS, (53,56) antiaggregante (57); inoltre, tali coniugati si sono resistenti all'attacco della carnosinasi specifica (58) Ulteriori indagini sono in corso per correlare il livello della carnosinasi cerebrale con l'invecchiamento e quindi con la patologia di Alzheimer.

Riferimenti bibliografici

- 1. D.J. Selkoe, Neuron, 1991, 6, 487.
- 2. R.A. Lesile, Trends Neurosci., 2002, 25, 232.
- 3. G.G. Glenner, C.W. Wong, Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984, 120, 885.
- 4. D.J. Selkoe, Physiol. Rev., 2001, 81, 741.).
- 5. R.B. Knowles, C. Wyart, S.V. Buldyrev, L. Cruz, B. Urbanc, M.E. Hasselmo, H.E. Stanley, B.T. Hyman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999, 96, 5274.
- 6. K.N. Dhalgren, A.M. Manelli, W.B. Stine, L.K. Baker, G.A. Kraft, M.J. LaDu, J. Biol. Chem., 2002, 277, 32046.
- 7. A. Lorenzo, B.A. Yankner, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994, 91, 12243.
- 8. K. Blennow, M.J. de Leon, H. Zetterberg, Lancet, 2006, 368, 387.
- 9. C. Haass, D.J. Selkoe, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2007, 8, 101.
- 10. J.A. Hardy, G.A. Higgins, Science, 1992, 256, 184.
- 11. J.S. Whitson, D.J. Selkoe, C.W. Cotman, Science, 1989, 243, 1488.
- 12. P.A. Adlard, A.I. Bush, J. Alzheimer's Dis., 2006, 10, 145.
- 13. T. Tarohda, M. Yamamoto, R. Amamo, Anal. Bioanal. Chem., 2004, 380, 240.
- 14. A.I. Bush, R.E. Tanzi, Neurotherapeutics, 2008, 5, 421.
- 15. A.I. Bush, C.L. Masters, R.E. Tanzi Science 1994, 265, 1464.
- 16. C.S. Atwood, R.D. Moir, X. Huang, R.C. Scarpa, N.M. Bacarla, D.M. Romano, M.A. Hatshorn, R.E. Tanzi, A.I. Bush, J. Biol. Chem., 1998, 273, 12817.
- 17. M.A. Lovell, J.D. Robertson, W.J. Teesdale, W.R. Markesbery, J. Neurol. Sci., 1998, 158, 47.
- 18. C.J. Frederickson, A.I. Bush, Biometals, 2001, 14, 353.
- 19. J.Y. Lee, T.B. Cole, R.D. Palmiter, S.W. Suh, J.Y. Koh, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2002, 99, 7705.
- 20. D.L. Sparks, B.G. Schreurs, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100, 11065.
- 21. T.A. Bayer, S. Schafer, S. Simons, A. Kemmling, T. Kamer, R. Tepest, A. Eckert, K. Schussel, O. Eikenberg, C. Sturchler-Pierrat, D. Abramowski, M. Staufenbiel, G. Multhaup, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100, 14187.
- 22. J. Zou, K. Kajita, N. Sugimoto, Angew. Chem. Int. Ed., 2001, 40, 2274.
- 23. M.P. Cuajungco, K.Y. Faget, Brain Res. Rev., 2003, 41, 44.
- 24. L.Q. Hatcher, L. Hong, W.D. Bush, T. Carducci, J.D. Simon, J. Phys. Chem. B 2008, 112, 8160.
- 25. V. Tougu, A. Karafin, P. Palumaa, J. Neurochem., 2008, 104, 1249.
- 26. V. Minicozzi, F. Stellato, M. Comai, M. Dalla Serra, C. Potrich, W. Meyer-Klauchke, S. Morante, J. Biol. Chem., 2008, 283, 10784.
- 27. T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, Biochemistry, 2000, 39, 7024.
- 28. J.W. Karr, V.A. Szalai, Biochemistry, 2008, 47, 5006.
- 29. C. Talmard, L. Guilloreau, Y. Coppel, H. Mazarguil, P. Faller, ChemBioChem, 2007, 8, 163.
- 30. J. Dong, J.M. Canfield, A.K. Mehta, J.E. Shokes, B. Tian, W. Seth Childers, J.A. Simmons, Z. Mao, R.A. Scott, K. Warncke, D.G. Lynn, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2007, 104, 13313.
- 31. C.A. Damante, K. Osz, Z. Nagy, G. Pappalardo, G. Grasso, G. Impellizzeri, E. Rizzarelli, I. Sovago, Inorg. Chem., 2008, in stampa.
- 32. C. Talmard, A. Bouzan, P. Faller, Biochemistry, 2007, 46, 13658.

- 33. C.A. Damante, K. Osz, Z. Nagy, G. Pappalardo, E. Rizzarelli, I. Sovago, Inorg. Chem., 2008, sottomesso per la pubblicazione.
- 34. E.D. Walter, D.J. Stevens, M.P. Visconte, G.L. Millhauser, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 15440.
- 35. G.F.Z. da Silva L.J. Ming, Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 3337.
- 36. X.D. Huang, C.S. Atwood, M.A. Hartshorn, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, M.P. Guajungco, D.N. Gray, J. Lim, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, Biochemistry, 1999, 38, 7609.
- 37. J. Hardy, D.J. Selkoe, Science, 2002, 297, 353.
- 38. F. Molina-Holgado, R.C. Rider, A. Gaeta, R. Williams, P. Francis, Biometals, 2007, 20, 639.
- 39. R.A. Cherny, C.S. Atwood, M.E. Xilinas, D.N. Gray, W.D. Jones, C.A. McLean, K.J. Barnham, I. Volitakis, F.W. Fraser, Y.S. Kim, X.D. Huang, L.E. Goldstein, R.D. Moir, J.T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, Neuron, 2001, 30, 665.
- 40. J.Y. Lee, J.E. Friedman, I. Angel, A. Kozak, J.Y. Koh Neurobiol. Aging, 2004, 25, 1315.
- 41. C.W. Ritchie, A.I. Bush, A. Mackinnon, S. Macfarlane, M. Mastwyk, L. MacGregor, L. Kiers, R. Cherny, Q.X. Li, A. Tammer, D. Carrington, C. Mavros, I. Volitakis, M. Xilinas, D. Ames, S. Davis, K. Beyreuther, R.E. Tanzi, C.L. Masters, Arch. Neurol., 2003, 60, 1685.
- 42. T. Storr, M. Merkel, G.X. Song-Zhao, L.E. Scott, D.E. Green, M.L. Bowen, K.H. Thompson, B.O. Patrick, H.J. Schugar, C. Orvig, J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 7453.
- 43. P.J. Quinn, A.A. Boldyrev, V.E. Formazuyk, Mol. Aspects Med., 1992, 13, 444.
- 44. A. Bakardjiev, Neurosci. Lett., 1997, 227, 115.
- 45. M.V. Teufel, V. Saudek, J.P. Ledig, A. Bernhardt, S. Boularand, A. Carreau, N.J. Cairns, C. Carter, D.J. Cowley, D. Duverger, A.J. Gauzhorn, C. Guenet, B. Heintzelmann, V. Laucher, C. Sauvage, T. Smirnova, J. Biol. Chem., 2003, 278, 6521.
- 46. S.H. Snyder, Science, 1980, 209, 976.
- 47. A.R. Hipkiss, Mech. Ageing Dev., 2005, 126, 1034.
- 48. A.R. Hipkiss, Biogerontology, 2005, 6, 147.
- 49. A.R. Hipkiss, J. Alzheimer's. Dis., 2007, 11, 229.
- 50. V.C. Calabrese, C. Colombrita, E. Guagliano, M. Sapienza, A. Lavagna, V. Cardile, G. Scapagnini, A.M. Santoro, A. Mangiameli, D.A. Butterfield, A.M. Giuffrida, E. Rizzarelli, Neurochem. Res., 2005, 85, 2239.
- 51. V.G. Nicoletti, A.M. Santoro, G. Grasso, L.I. Vagliasindi, M.L. Giuffrida, C. Cuppari, V. Spina Purrello, A.M. Stella Giuffrida, E. Rizzarelli, J. Neurosci. Res. 2007, 85, 2239.
- 52. S. Cuzzocrea, T. Genovese, M. Failla, G. Vecchio, M. Fruciano, E. Mazzon, R. Di Paola, C. La Rosa, N. Crimi, E. Rizzarelli and C. Vancheri, AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2007, 292, L 1095.
- 53. V. Calabrese, C. Mancuso, M. Calvani, E. Rizzarelli, D.A. Butterfield, A. M. Giuffrida Stella, Nature Rev. Neurosci., 2007, 8, 766.
- 54. D. La Mendola, S. Sortino, G. Vecchio, E. Rizzarelli Helvetica Chim. Acta 2002, 85, 1633.
- 55. R.P. Bonomo, V. Bruno, E. Conte, G. De Guidi, D. La Mendola, G. Maccarrone, F. Nicoletti, E. Rizzarelli, S. Sortino, G. Vecchio, J. Chem. Soc. Dalton, 2003, 4406.
- 56. A.M. Amorini, F. Bellia, V. Di Pietro, B. Giardina, D. La Mendola, G. Lazzarino, S. Sortino, B. Tavazzi, E. Rizzarelli, G. Vecchio, Eur. J. Med. Chem., 2007, 42, 910.
- 57. F. Attanasio, C. Cascio, S. Fisichella, V. G. Nicoletti, B. Pignataro, A. Savarino, E. Rizzarelli Biochem. Biophys. Res. Comm. 2007, 354, 899.
- 58. F. Bellia, A.M. Amorini, D. La Mendola, G. Vecchio, B. Tavazzi, B. Giardina, V. Di Pietro, G. Lazzarino, E. Rizzarelli Eur. J. Med. Chem. 2008, 43, 373.