

**ABSTRACTS PRESENTATI DA
RICERCATORI NON STRUTTURATI**

REALIZZAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI NANOSTRUTTURE D'ORO PER LO SVILUPPO DI BIOCENSORI DI AFFINITA'

Francesca Berti^{1,2}, Andrea Ravalli², Monica Revenga Parra², Giovanna Marrazza², Marco Mascini^{1,2}

¹*I.N.B.B., Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi - via delle Medaglie d'Oro, 305, 00136 Roma*

²*Dipartimento di Chimica, Università di Firenze*

via della Lastruccia 3, 50019 Sesto Fiorentino (FI)

francesca.berti@unifi.it

L'introduzione delle nanoparticelle d'oro nella sensoristica ha evidenziato, negli ultimi anni, la possibilità di ottenere sistemi analitici caratterizzati da elevati livelli di sensibilità, selettività e affidabilità. Ciò è dovuto a una peculiare combinazione di caratteristiche elettroniche, ottiche e catalitiche che, unita alla semplicità dei metodi di sintesi, alla stabilità e alla scala dimensionale nanometrica (1-100 nm di diametro), ha permesso la realizzazione di sensori altamente versatili e miniaturizzabili. Inoltre, quando applicate alla realizzazione di biosensori, le particelle d'oro offrono l'ulteriore vantaggio di fornire un'estesa area superficiale disponibile per l'immobilizzazione del biorecettore (anticorpi, peptidi, acidi nucleici) e una relativamente semplice chimica di funzionalizzazione (ad esempio utilizzando molecole tiolate).

In questo lavoro sono state sviluppate e caratterizzate nanoparticelle d'oro per la realizzazione di biosensori ottici ed elettrochimici per la determinazione di marker tumorali. In seguito a una caratterizzazione morfologica tramite spettroscopia UV, sono state studiate varie strategie di stabilizzazione in soluzione e funzionalizzazione con enzimi, anticorpi, sequenze di DNA.

Inoltre, superfici nanostrutturate sono state realizzate modificando elettrodi stampati d'oro con le nanoparticelle al fine di ottenere biosensori elettrochimici più sensibili rispetto ai sistemi tradizionali. A tale scopo, sono state studiate diverse strategie di modifica dell'elettrodo di lavoro: chemisorbimento, elettrodeposizione, elettropolimerizzazione con anilina. La stabilità e le caratteristiche elettrochimiche di queste superfici nanostrutturate sono state caratterizzate mediante spettroscopia di impedenza elettrochimica. Successivamente le loro prestazioni analitiche sono state verificate funzionalizzandole con sequenze oligonucleotidiche tiolate per la realizzazione di un genosensore. In seguito alla reazione di ibridazione con il DNA target, l'ibrido è stato marcato con il coniugato enzimatico straptavidina-alcalin fosfatasi e il prodotto enzimatico, elettroattivo, è stato quantificato mediante voltammetria differenziale a impulsi (DPV) e spettroscopia di impedenza. Per la realizzazione del biosensore e la trasduzione del segnale sono stati utilizzati elettrodi stampati per via serigrafica sia a singola cella, che array a 8 elettrodi di lavoro che offrono l'ulteriore vantaggio della gestione parallela di più superfici elettrodiche.

ESPOSIZIONE PERINATALE A BISFENOLO A DI TOPI *BALB-C* E : A) DETERMINAZIONE DELLA SUA CONCENTRAZIONE IN DIFFERENTI TESSUTI; E B) INSORGENZA DI ENDOMETRIOSI.

Bianco M.^{1,2}, *Mita D.G.*^{1,2}, *Baldi A.*³, *Signorile P.G.*³, *Portaccio M.*^{1,2}, *Di Tuoro D.*^{1,2}, *Caiazza M.A.*^{1,2}, *Monaco C.*^{1,2}, *Pierantoni R.*^{1,2}, *Sica V.*^{1,2}, *Mita L.*^{1,2}

1) *INBB, Consorzio Interuniversitario, Viale delle Medaglie d'Oro, 305 - 00136 Roma*

2) *Seconda Università di Napoli, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Via Costantinopoli, 16 - 80138 Napoli*

3) *Fondazione Italiana Endometriosi, Rome, Italy.*

In questo studio abbiamo determinato l'esistenza di un accumulo differenziale di Bisfenolo A (BPA) in differenti tessuti di topi *Balb-c* esposti a tale interferente endocrino durante esperimenti finalizzati a verificare la possibile correlazione fra esposizione prenatale ed insorgenza di endometriosi.

Gli Interferenti Endocrini sono sostanze esogene, capaci di alterare la funzionalità del sistema endocrino. La nostra attenzione si è focalizzata sul BPA un componente base di un'ampia serie di prodotti di plastica e caratterizzato da una presenza ubiquitaria e da una lunga persistenza nell'ambiente.

Il BPA, così come anche altri xenoestrogeni, sembra svolgere un importante ruolo nell'insorgenza del cancro (ai testicoli, alla prostata, al seno, all'utero, all'ovaio), causare problemi di fertilità (riduzione della conta e della qualità spermatica) ed altri problemi correlati all'interferenza di queste sostanze con il sistema endocrino (Vandenberg et al., 2007 mettere sotto la bibliografia completa).

L'endometriosi è una malattia cronica ginecologica caratterizzata dalla crescita di tessuto endometriale al di fuori della cavità uterina. Tale patologia mostra un'insorgenza rilevante sulla popolazione femminile (20%).

Gruppi di 20 animali femmine gravide sono stati trattati con 100 e 1000 mg BPA/kg/W per tutta la durata della gestazione e per i primi 7 giorni dopo il parto. Per la somministrazione il BPA è stato sciolto in etanolo e poi risospeso in soluzione fisiologica e somministrato mediante iniezioni sottocutanee. Ai topi controllo le soluzioni iniettate erano prive di bisfenolo.

Alla fine della gestazione e dopo un breve periodo di allattamento le madri sono state sacrificate per estrarre i tessuti di interesse: muscolo, fegato, cervelletto e corteccia cerebrale per determinare l'eventuale accumulo di BPA.

La prole, sia maschile che femminile, è stata invece svezzata e sacrificata dopo 3 mesi, per verificare se vi era anche in questo caso un accumulo di BPA negli organi di interesse.

Allo scopo di valutare la presenza di BPA nei tessuti è stato messo a punto, mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) un metodo di rivelazione ed una curva di taratura utilizzando gli standards commercialmente disponibili (Fluka).

I risultati ottenuti hanno dimostrato un accumulo medio di BPA dose dipendente e che l'accumulo nei differenti tessuti è anche "genere" dipendente. In particolare si è constatato un accumulo preferenziale nel fegato e nel muscolo delle madri. Nella prole, invece, l'accumulo è stato diverso nei due generi: nelle femmine ha interessato preferenzialmente fegato e muscolo, mentre nei maschi la corteccia e il cervelletto.

Per quel che riguarda l'insorgenza di endometriosi, i risultati hanno dimostrato: la presenza di un 5% (1/20) di tessuto endometrioso-like nei topi controllo non esposti, mentre il 30% (6/20) di endometriosi nei topi esposti alla dose di 100 mg BPA/kg/W e del 35% (7/20) nei topi esposti alla dose di 1000 mg BPA/kg/W.

Questo lavoro è stato svolto nell'ambito di una convenzione tra INBB e Fondazione Italiana Endometriosi.

EFFETTI PROTETTIVI DELLA SOLUZIONE DI D-RIBOSIO E KHCO_3 SULLA LINEA CELLULARE MAMMARIA HTB125 NON TUMORALE IRRAGGIATO CON RAGGI X.

Bruni L.^{1,2,3}; Babarinde N.A.A.^{1,4}; Ortalli I.^{1,2}; Croci S.^{1,2}.

1 Dipartimento di Sanità Pubblica, Sezione di Fisica, Università di Parma

2 INBB, Roma

3 Fondazione Valsé Pantellini, Oviedo Asturias, Spagna

4 Dipartimento di Scienze Chimiche, Olabisi Onabanjo University, Ago-Iwoye, Nigeria

Questo studio preliminare, volto a mimare una seduta di radioterapia, è focalizzato sugli effetti della soluzione acquosa di D-Ribosio e KHCO_3 (K:D-Rib) sulla linea cellulare di epitelio mammario umano non tumorale (HTB-125) inseguito ad irraggiamento con raggi X. Il D-Ribosio è un componente essenziale di macromolecole biologiche come RNA, ATP ed altre macromolecole biologiche ed è una potenziale fonte di energia. Prima d'entrare nel metabolismo il D-Ribosio è fosforilato D-Ribosio-5-fosfato, precursore di istidina, triptofano e nucleotidi⁽¹⁾. Il potassio è uno ione chiave per la vita della cellula, in quanto è coinvolto in importantissimi processi tra cui la regolazione dell'apoptosi^(2,3) ed il folding dei G-Quadruplex, strutture secondarie presenti nei telomeri. In condizioni fisiologiche la concentrazione intracellulare di K^+ è di circa 150 mM, mentre quella extracellulare è di circa 5 mM. La radioterapia consiste nell'utilizzare le radiazioni ionizzanti per il trattamento delle patologie tumorali. Molteplici sono i fattori che condizionano l'esito della radioterapia tra cui le caratteristiche genetiche del tumore, quelle del paziente e la scelta della dose impiegata nel trattamento radioterapico⁽⁴⁾. Gli effetti delle radiazioni ionizzanti sono diversi e molteplici in relazione al bersaglio considerato: nucleo, citoplasma, organelli e membrana plasmatica. 2 Gy, la dose da noi utilizzata, è la stessa dose solitamente somministrata come frazionamento delle dosi totali impiegate durante il trattamento radioterapico^(4,5). La linea cellulare HTB-125 (epitelio mammario umano non tumorale) rappresenta la controparte tissutale non tumorale che durante una seduta di radioterapia risente comunque degli effetti del trattamento. Le cellule sono state trattate con una soluzione acquosa 5mM di K:D-Rib per 7 gg. Il giorno seguente la semina, le cellule sono state irraggiate con raggi X con una ad una dose complessiva di 2 Gy, per un tempo pari a 2 min. Come indicatori del danno si sono considerate la proliferazione e la presenza anomalie morfologiche. Al termine del trattamento le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4%, e colorate con *Giemsa*. Le immagini digitali acquisite al microscopio invertito sono state analizzate tramite software *ImageJ*. Le cellule *HTB-125 irraggiate* mostrano rispetto al controllo evidenti cambiamenti morfologici ed un rallentamento significativo della proliferazione cellulare mentre le *HTB-125 trattate con K:D-Rib (5mM)* non mostrano ne rallentamento della proliferazione ne cambiamenti morfologici rispetto al controllo, confermando i risultati precedentemente ottenuti⁽⁶⁾. Le *HTB-125 irraggiate e trattate con K:D-Rib (5mM)* mostrano un rallentamento della proliferazione cellulare ma non mostrano cambiamenti morfologici rispetto al controllo. La soluzione K:D-Rib potrebbe agire proteggendo la membrana cellulare dall'effetto delle radiazioni, evitandone così un danneggiamento ed una conseguente perdita della morfologia fibroblastica, caratteristica di questa linea cellulare. Rimane da chiarire se il rallentamento della proliferazione cellulare è connesso con un'eventuale protezione della membrana plasmatica al danno da radiazione oppure se è dovuto effettivamente ad un blocco della proliferazione cellulare dovuto a danni di diversa natura ad esempio nucleare oppure mitocondriale.

1. Ida Lager, Marcus Fehr, Wolf B. Frommer, Sylvie Lalonde. *FEBS Letters* 553: 85-89, 2003.

2. Carl D. Bortner, John A. Cidlowski. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462: 176-188, 2007.

3. Francis M. Hughes, Jr., Carl D. Bortner, Geoffrey D. Purdy and John A. Cidlowski: *The Journal of Biological Chemistry*. 272 (48): 30567-30576, 1997.

5. Louis B. Harrison, Manjeet Chadha, Richard J. Hill, Kenneth Hu. *The Oncologist*. 7: 492-508, 2002.

6. M.A. Hill. *Radiation Protection Dosimetry*. 112 (4): 471-481 2004.

7. L. Bruni, I Ortalli, S. Croci: IX convegno nazionale INBB 2009-Roma 10-11 Novembre.

ORIENTARE LA TRASDUZIONE MOLECOLARE DEL SEGNALE IN CELLULE STAMINALI PER UNA EFFICIENTE RIGENERAZIONE CARDIOVASCOLARE

C. Ventura¹, S. Cantoni¹, C. Cavallini¹, F. Bianchi¹, V. Lionetti², E. Olivi¹, I. Frascari¹, F. Bonavita¹, V. Vaccari¹, R. Tassinari¹, F.A. Recchia², S. Valente¹, G. Pasquinelli¹

¹Laboratorio di Biologia Molecolare e Bioingegneria delle Cellule Staminali, Università di Bologna; ²Settore di Medicina, Scuola Superiore S. Anna, Pisa.

Premesse- Sebbene le cellule staminali adulte possano rappresentare una speranza per la rigenerazione cardiovascolare, tale attesa resta ancora a livello ipotetico a causa di una serie di ostacoli quali la scarsa vitalità cellulare, l'incerto destino differenziativo *in vivo*, la necessità di espansione *ex vivo* e un'efficienza di somministrazione tissutale estremamente bassa. Queste problematiche comportano un sensibile ritardo nel trapianto degli elementi staminali rispetto all'insorgenza di un danno miocardico.

Metodi e Risultati- Per mezzo di Risonanza Magnetica, Tomografia ad Emissione di Positroni e approcci di immunoistochimica abbiamo dimostrato che una molecola dai noi sintetizzata, un estere misto di acido ialuronico, butirrico e retinoico (HBR), era in grado di per sé di agire come “segnale di lunga vita” per l'attivazione di risposte angiogenetiche ed antiapoptotiche intrinseche in seguito ad iniezione diretta nel miocardio di ratti sottoposti ad infarto miocardico acuto. L'HBR era capace di trasformare rapidamente l'ambiente ostile del tessuto ischemico in un “contesto” più incline al reclutamento di cellule staminali endogene Stro-1 positive, aumentando la densità capillare, ripristinando un normale assetto metabolico (uptake di ¹⁸F-FDG) e diminuendo il numero di cardiomiociti apoptotici. In cardiomiociti isolati di ratto (RCm) e in cellule Stro-1 positive l'HBR ha aumentato la trascrizione di VEGF, HGF, KDR, Akt e Pim-1, assieme alla secrezione di VEGF e HGF. Un incremento della capillarogenesi è stato indotto *in vitro* con un mezzo di coltura ottenuto da cellule esposte ad HBR. In estratti tissutali ricavati da miocardio infartuato, come anche in RCm e cellule Stro-1 positive, l'HBR ha indotto un incremento della acetilazione dell'istone H4.

Conclusioni- Una efficiente riparazione cardiovascolare può essere ottenuta con HBR senza dover ricorrere al trapianto di cellule staminali o a strategie di trasferimento genico mediante vettori virali. L'analisi molecolare delle dinamiche innescate dall'HBR potrà anche essere utilizzata per migliorare la comprensione dei meccanismi di trasduzione molecolare del segnale che sottendono ad un orientamento differenziativo e paracrino delle cellule staminali ottimale per una riparazione cardiovascolare.

SCAFFOLDS NANOCOMPOSITI CONTENENTI NANOPARTICELLE DI IDROSSIAPATITE INDUCONO IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOGENICO DELLE CELLULE STAMINALI ADULTE E DELLE CELLULE STAMINALI PLURIPOTENTI INDOTTE

F. D'Angelo¹, I. Armentano², M. Quattrocelli^{1,3}, C. Del Gaudio⁴, U. Reale⁵, S. Montesano¹, R. Tiribuzi¹, M. Dottori², A. Bianco⁴, L. Visai⁶, G.G. Cerulli⁵, M. Sampaolesi³, J.M. Kenny², S. Martino¹ e A. Orlacchio¹.

¹Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Perugia, Via del Giochetto, Perugia; ²Centro di Ingegneria dei Materiali, UdR INSTM, NIPLAB, Università degli Studi di Perugia, Terni; ³Translational Cardiology S.C.I.L. K.U.Leuven, Belgium; ⁴Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, Università di Roma "Tor Vergata"; ⁵Dipartimento di Ortopedia e Traumatologia, Università degli Studi di Perugia, Perugia; ⁶Dipartimento di Biochimica and Centro di Ingegneria Tissutale (C.I.T.), Università di Pavia, Pavia. orly@unipg.it

L'ingegneria tissutale è diventato un settore della ricerca scientifica in rapida espansione, in quanto offre un approccio promettente per la riparazione e rigenerazione dei tessuti. L'ingegneria del tessuto osseo rappresenta un modello ideale per studiare come le cellule staminali possano agire come unità mecano-sensitive in risposta alla stimolazione meccanica della matrice extracellulare attraverso le adesioni focali e le variazioni nell'organizzazione del citoscheletro.

A tale scopo abbiamo fabbricato degli scaffolds nanocompositi elettrofilati a base polimerica (acido polilattico, PLLA) contenenti diverse percentuali di nanoparticelle di idrossiapatite (1wt.% e 8 wt.%, idrossiapatite, HAp) e abbiamo investigato l'effetto osteoinduttivo degli scaffolds (PLLA, PLLA/1%d-HAp, PLLA/8%d-HAp) su cellule staminali mesenchimali ed inoltre abbiamo valutato se l'effetto osteoinduttivo fosse limitato a questo tipo di cellule staminali.

Per valutare il ruolo osteoinduttivo degli scaffolds abbiamo coltivato le cellule staminali mesenchimali (hBM-MSCs) su PLLA/1%d-HAp, PLLA/8%d-Hap PLLA in presenza/assenza di terreno osteogenico. I nostri risultati hanno dimostrato che gli scaffolds nanocompositi contenenti idrossiapatite (PLLA/d-HAp), anche in assenza di terreno di coltura osteogenico, inducono le hBM-MSCs a differenziare verso il lineage osteogenico.

Per verificare se l'effetto osteoinduttivo fosse limitato alle hBM-MSCs abbiamo valutato il medesimo differenziamento nelle cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) murine. Come controllo, esperimenti simili sono stati condotti utilizzando cellule staminali embrionali (ES) murine. I dati in nostro possesso indicano che gli scaffolds contenenti idrossiapatite sono in grado, in vitro, di indurre il differenziamento osteogenico anche in cellule embrionali (iPS e ES) senza l'utilizzo di terreni differenziativi specifici. I risultati del presente studio indicano che gli scaffolds elettrofilati contenenti idrossiapatite esercitano una forte attività osteoinduttiva indipendentemente dal tipo di cellula staminale. Il nostro lavoro propone l'impiego degli scaffolds contenenti idrossiapatite (PLLA/d-Hap) per la medicina rigenerativa del tessuto osseo senza somministrazione di induttori osteogenici.

Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato da Fondazione Cassa di Risparmio di Perugia (prog. n. 2009.020.0050 coordinatore Prof. Aldo Orlacchio), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (prog.: FIRB Idea Progettuale n. RBIP06FH7J_002 e PRIN n. 20084XRSBS_001 coordinatore Prof. Aldo Orlacchio), Ministero della Sanità progetto n. RF-UMB-2006339457 e Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi.

β-ESOSAMINIDASI E LIVELLI DI GANGLIOSIDE GM3 NELLA NEUROPROTEZIONE DELLA REGIONE SUBVENTRICOLARE DEL CERVELLO: IMPLICAZIONI PER LA TERAPIA DELLE GM2 GANGLIOSIDOSI

*di **Girolamo I.**¹, Cavazzin C.², Tatò F.¹, Gritti A.², Martino S.¹ & Orlacchio A.¹*

1 Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Perugia, Perugia, Italia.

2 San Raffaele Telethon Institute for Gene Therapy (HSR-TIGET), Milano, Italia.

Le GM2 gangliosidosi sono un gruppo di malattie genetiche da accumulo metabolico lisosomale (LSD) causate dalla mancanza dell'enzima β-Esosaminidasi. Come conseguenza, il ganglioside GM2 ed altri substrati naturali, non sono degradati e sono accumulati principalmente nel sistema nervoso centrale. Ciò genera una progressiva neurodegenerazione che, nei casi più gravi, porta alla morte degli individui affetti dalla patologia nei primi anni di vita. Attualmente non esistono terapie per LSD con coinvolgimento neurologico come le GM2 gangliosidosi. Questo deriva in larga parte dalla limitata conoscenza della patofisiologia della malattia.

Stiamo svolgendo studi volti allo sviluppo di approcci terapeutici per queste malattie basati sulla combinazione di terapia genica e terapia cellulare con cellule staminali. In particolare gli sforzi sono rivolti alla delucidazione dei meccanismi molecolari che sono alla base dell'insorgenza dei fenomeni neurodegenerativi associati alle GM2 gangliosidosi.

Abbiamo investigato il ruolo della β-Esosaminidasi nell'omeostasi del sistema nervoso centrale, attraverso un'attenta analisi molecolare dell'enzima nelle diverse fasi di sviluppo del cervello in toto, nella regione subventricolare (SVZ) e nelle cellule staminali neurali da essa isolate. Particolare attenzione è stata rivolta all'analisi dell'effetto che lo squilibrio del metabolismo del ganglioside GM2 (substrato naturale della β-Esosaminidasi) produce nella nicchia neurogenerativa.

I risultati hanno dimostrato che:

1- le cellule staminali neurali rappresentano un modello ideale per lo studio degli enzimi lisosomali, in quanto il pattern isoenzimatico di attività esosaminidasica, la composizione degli isoenzimi, l'espressione dei geni ed il metabolismo gangliosidico osservati durante lo sviluppo del cervello embrionale e postnatale sono ricapitolati durante le fasi progressive di differenziamento *in vitro* delle cellule staminali neurali ¹;

2- lo squilibrio del metabolismo gangliosidico derivante dall'assenza dell'enzima si traduce in una modulazione alterata di alcune vie di trasduzione del segnale nelle aree cerebrali neurodegenerate, ma non altera l'omeostasi della nicchia neurogenerativa di cervelli murini adulti affetti dalla patologia.

Infatti lo studio contestuale dell'SVZ *in vivo* e delle cellule staminali neurali *in vitro* ha contribuito alla conoscenza della fisiologia della nicchia delle cellule staminali neurali adulte nei modelli murini presi in esame, dimostrando, per la prima volta, che la mancanza di β-Esosaminidasi A (HexA) e/o β-Esosaminidasi B (HexB) non perturba il potenziale neurogenerativo della nicchia stessa. Questo studio, individuando una finestra temporale di intervento terapeutico e identificando un nuovo meccanismo patogenetico correlato all'insorgenza della malattia, ha dato un notevole contributo alla definizione di parametri utili per lo sviluppo di una terapia efficace.

¹ Martino S, di Girolamo I, Cavazzin C, Tiribuzi R, Galli R, Rivaroli A, Valsecchi M, Sandhoff K, Sonnino S, Vescovi A, Gritti A, Orlacchio A. Neural precursor cell cultures from GM2 gangliosidosis animal models recapitulate the biochemical and molecular hallmarks of the brain pathology. *J Neurochem.* 2009 Apr;109(1):135-47.

Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato da Ministero della salute (prog. n. RF- UMB-2006-339457 coordinatore Prof. Aldo Orlacchio), Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca (PRIN n. 20084XRSBS_001 coordinatore Prof. Aldo Orlacchio), Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi.

DEVELOPMENT OF A DRUG DELIVERY SYSTEM BASED ON POLYMERIC MICRO/NANOPARTICLES

Donizetti A.^{1,2}, Menale C.^{1,3}, Favicchia I.¹, Aruta M.G.¹, Crispi S.¹, Diano N.^{1,2,3}, Mita D.G.^{1,2,3}

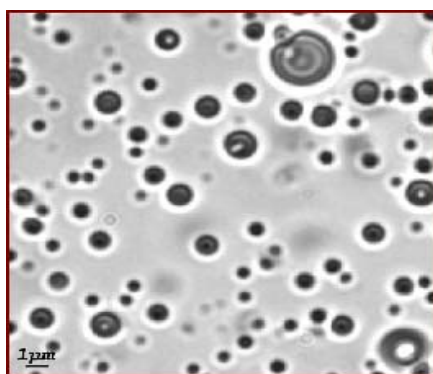
¹*Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Via Pietro Castellino 111, 80131 Naples, Italy*

²*National Institute of Biosystems and Biostructures (INBB), Via le Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy*

³*Department of Experimental Medicine, Second University of Naples, Via S. M. di Costantinopoli 16, 80138 Naples, Italy*

In recent years, the use of polymers as biomaterials has seen a rapid evolution and expansion in various fields of application, including medical therapeutics. One of the main advantages of polymers is related to their biocompatibility and to the possibility to modify their physical-mechanical properties by extensive composition modification. Biodegradable polymers are frequently used to obtain controlled drugs release (drug-delivery system) with a significant improvement in drug treatment related to increasing of bioavailability, solubility, and drug retention-time. Currently, several polymeric molecules can be used as vehicle systems in the form of micro- or nanoparticles. To date, numerous drugs associated with nanoparticles are being used in clinical trials –at various stages - for AIDS, diabetes, tuberculosis, and cancer (1). The effectiveness of this approach is influenced by both the characteristics of nanoparticles and the nature of the drug, which can influence bioavailability, retention time, and intracellular penetration (2).

Our research activity aims to prepare micro/nanoparticles to be used as a drug delivery system in cancer therapy. We have chosen the cisplatin (CDDP), a platinum-based compound, as drug for our experiments. This compound determines irreversible genomic DNA damage and interferes with normal cell replication, thus inducing programmed cell death (apoptosis). The use of micro/nanoparticles is a promising technology to overcome different problems associated with the use of platinum-based compounds, such as nephrotoxicity and drug resistance. To generate micro/nanoparticles with encapsulated cisplatin we used the poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) as starting material, one of the best polymers used for hydrophobic compounds (2, 3). In addition, to obtain a good dispersion of the different phases generated in the procedure, and to stabilize the emulsion, we adopted polyvinyl alcohol (PVA) as surfactant. For micro/nanoparticles preparation, we performed two methods based on compound microencapsulation by solvent evaporation. The first method is characterized by a “single emulsion” procedure and consists of 4 steps: 1) dissolution of CDDP in dichloromethane containing the PLGA; 2) emulsification by magnetic stirring and sonication, in the aqueous phase in the presence of PVA; 3) solvent extraction by evaporation; 4) recovery of micro/nanoparticles by lyophilization. The second method, which is a derivation of the first one, is based on a “double emulsion” procedure, in which the first emulsion is dispersed in a second aqueous solution to obtain a second emulsion. Using the first procedure we obtained well-rounded micro/nanoparticles with a mean size of about 0.5 μm ; whereas, smaller micro/nanoparticles were obtained using the second procedure.



Photomicrograph of micro/nanoparticles

References

- [1] Kumari et al. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 75:1–18.
- [2] Li et al. 2008. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int J Pharm*. 363:26-39.
- [3] Moreno et al. 2009. Biopharmaceutic and pharmacodynamic modeling of the in vitro antiproliferative effect of new controlled delivery systems of cisplatin. *Eur J Pharm Sci*. 37:341-50.

IL MODELLO DI DEPRESSIONE “ FORCED SWIMMING TEST” COME PROCESSO DI AGGIORNAMENTO DELL'OUTPUT MOTORIO NELLE RISPOSTE FINALIZZATE

Adriana Galistu^{1,2}, Mauro Mannoni¹, Sara Piana¹, Paolo S. D'Aquila¹

¹Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Sassari, ²INBB Osilo-Sassari

Sulla base dell'osservazione degli effetti degli antagonisti dei recettori D1-like e D2-like della dopamina sulla microstruttura dell'ingestione di saccarosio, abbiamo ipotizzato che (i) l'attivazione delle risposte finalizzate alla ricompensa sia mediata da recettori D1-like e (ii) il livello di tale attivazione venga aggiornato sulla base di un processo mediato da recettori D2-like, che valuterebbe il costo energetico appropriato per quella ricompensa nelle condizioni date (D'Aquila, 2010. *Neuropharmacol.* 58, 1085-96). In questo lavoro abbiamo testato questa ipotesi studiando l'effetto degli antagonisti D1-like SCH23390 e D2-like raclopride su un comportamento finalizzato energeticamente dispendioso e che rivela un aggiornamento misurabile dell'output motorio: la risposta al modello sperimentale di depressione “forced swimming test”. I ratti sono stati trattati con una singola dose di antagonista 30' prima di una sessione di nuoto forzato di 15' (S1), e sono stati sottoposti -senza ulteriori trattamenti- a una seconda sessione di 5' dopo 24h (S2). Inoltre, abbiamo esaminato l'effetto dell'antidepressivo imipramina somministrato prima di S1. SCH23390 e raclopride hanno ridotto l'output motorio in S1. In S2, il gruppo trattato con SCH23390 non differiva dal controllo, ma l'output motorio del gruppo trattato con raclopride era ancora ridotto. Inoltre, il corso temporale dell'effetto del blocco dei recettori D2-like in S1 era sovrapponibile a quello osservato nel comportamento ingestivo. Il trattamento con imipramina ha incrementato l'output motorio nel corso di entrambe le sessioni. Gli effetti osservati in S2 non si sono manifestati quando i soggetti sono stati trattati con gli antagonisti o con imipramina 24h prima di una singola sessione di nuoto forzato, dimostrando che gli effetti da noi osservati in S2 richiedono la pre-esposizione alla condizione del test. Questi risultati sono in accordo con l'ipotesi proposta e suggeriscono che i recettori D2-like della dopamina siano coinvolti in un processo di percezione valutativa psicopatologicamente rilevante in questo modello di depressione. Secondo questa interpretazione, la riduzione dell'output motorio che si osserva negli animali sottoposti a nuoto forzato -e che viene contrastata dal trattamento con antidepressivi- potrebbe essere il risultato di una (corretta) valutazione negativa dell'efficacia della risposta di fuga. Sulla base di questi risultati e delle evidenze sperimentali che mostrano il coinvolgimento della neurotrasmissione dopaminergica nell'effetto degli antidepressivi in questo test (oltrechè nel loro effetto terapeutico) si può ipotizzare che l'effetto di imipramina qui osservato possa dipendere da un potenziamento del processo di percezione valutativa dell'efficacia della risposta da noi suggerito.

BIOSENSORE AMPEROMETRICO PER LA DETERMINAZIONE DEI POLIFENOLI

Elena Gregoris¹, Mariangela Bertelle¹, Fabio Vianello², Roberto Stevanato¹

¹*Dipartimento di Chimica Fisica, Università Ca' Foscari di Venezia, Dorsoduro 2137, 30123 Venezia – Italia*

²*Dipartimento di Chimica Biologica, Università di Padova, viale G. Colombo 3, 35121 Padova – Italia*

Nel presente periodo storico, in cui si fa sempre più generale la tendenza all'uso di sostanze naturali, o prodotte secondo tecniche naturali e tradizionali, in campo alimentare, farmaceutico, cosmetico, ecc., gli antiossidanti contenuti negli alimenti assumono un ruolo importante per la loro capacità di ridurre i danni cellulari causati dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS).

I polifenoli sono la classe di antiossidanti più abbondante nei costituenti della nostra dieta: sono presenti in frutta, vegetali, cereali, olive, legumi secchi, cioccolato e bevande, come tè, caffè e vino. Sono molecole formate da uno o più anelli benzenici contenenti uno o più gruppi fenolici, facilmente ossidabili a radicali fenossilici secondo il seguente schema semplificato di reazione:

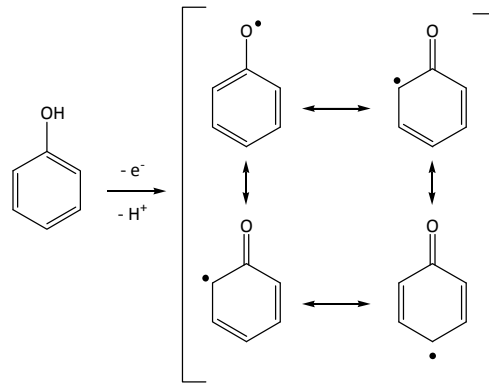


Figura 1. Schema di reazione della formazione di radicali fenossilici.

La delocalizzazione dell'elettrone spaiato nell'anello benzenico conferisce a questi radicali una stabilità tale da rallentare o fermare la catena radicalica della perossidazione lipidica. Risulta quindi evidente l'importanza di studi che permettano di quantificare, in modo semplice e celere, l'azione antiossidante dei polifenoli, soprattutto in alimenti e bevande. Oltre alle metodiche già consolidate, talune messe a punto anche dal nostro gruppo di ricerca, che richiedono però strumentazione adatta, manualità specializzata e congrui tempi di esecuzione, appare interessante l'utilizzo di biosensori per il loro facile utilizzo, i tempi rapidi di risposta e la loro facile automazione.

Oggetto del presente lavoro è la messa a punto di un biosensore per la misura delle proprietà antiossidanti di soluzioni contenenti polifenoli. Si tratta della prima fase di un più ampio progetto che ha come obiettivo finale la determinazione dei polifenoli direttamente nella matrice alimentare. Come elemento biologico è stato scelto l'enzima laccasi (*laccase from *Rhus vernificera* – E. C. 1.10.3.2*), che catalizza l'ossidazione mono-elettronica dei polifenoli. La trasduzione è di tipo amperometrico.

La messa a punto del sistema è stata effettuata utilizzando la coppia redox idrochinone/benzochinone: l'idrochinone dapprima viene ossidato enzimaticamente a benzochinone; successivamente il benzochinone viene ridotto ad idrochinone. La conseguente variazione di intensità di corrente elettrica è una misura della quantità di benzochinone ridotto ovvero di idrochinone ossidato.

Le prove preliminari, condotte in assenza di enzima, hanno portato alla scelta di diversi importanti fattori:

- a) il potenziale di lavoro, che deve determinare una riduzione immediata e quantitativa del benzochinone all'elettrodo;
- b) la molecola "immobilizzatore", che deve avere delle caratteristiche specifiche: deve possedere sufficiente affinità per la superficie elettrodica da legarsi covalentemente all'elettrodo, fornendo un gruppo funzionale adatto alla successiva immobilizzazione dell'enzima, senza interferire con il segnale amperometrico.
- c) condizioni operative, quali tampone, pH ed elettrolita di supporto. Questo aspetto è particolarmente delicato in quanto è necessario trovare un compromesso tra le condizioni ideali per la reazione enzimatica e quelle necessarie per ottenere un segnale ottimale all'elettrodo.

Le migliori condizioni sperimentali sono risultate: tampone sodio acetato, pH 5.0, con sodio nitrato quale elettrolita di supporto; -400 mV; acido 3-mercaptopropionico come immobilizzatore.

È stata tentata l'immobilizzazione della laccasi con N-etil-N'-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide idrocloruro (EDC) e N-idrossisuccinimide (NHS), ma i risultati migliori si sono ottenuti utilizzando chitosano e glutaraldeide. La concentrazione ideale di laccasi per l'immobilizzazione è 10^{-4} M.

In queste condizioni si è ottenuta una buona retta di calibrazione mediante iniezioni successive di idrochinone. La risposta è sempre immediata e lineare fino ad una concentrazione di 200 μ M (Figura 2). Il lavoro sta proseguendo con misure sperimentali su campioni reali di alimenti contenenti polifenoli.

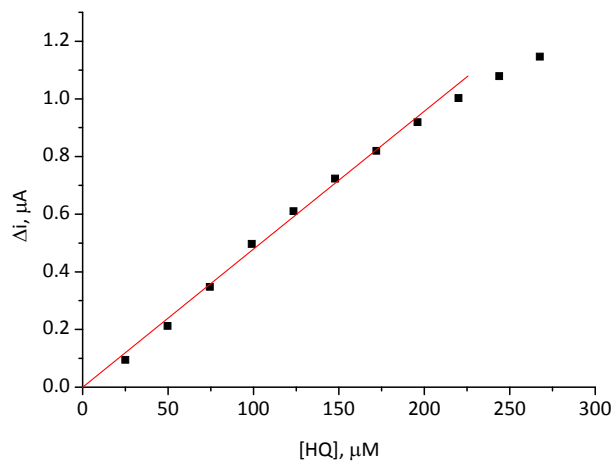


Figura 2. Retta di calibrazione dell'idrochinone.

ANALISI MOLECOLARE DELL'ESPRESSIONE DI GENI MODIFICATORI DURANTE LA CARDIOMIOPATIA IPERTROFICA: STUDIO SU SANGUE PERIFERICO DI UNA POPOLAZIONE SARDA

*Margherita Maioli**, *Sara Santaniello***, *Gianfranco Pigliaru***, *Sara Gualini ***, *Anna Sini[§]*, *Carlo Ventura[§]* e *Antonello Ganau^{§§}*

**Dipartimento di Scienze Biomediche/Isituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università di Sassari, - Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, ** Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari,- [§]Laboratory of Molecular Biology and Stem Cell Engineering, National Institute of Biostructures-*

§§ Cattedra e Scuola di Specializzazione in Cardiologia, Università di Sassari e-mail: mmaioli@uniss.it

La cardiomiopatia ipertrofica (CMI) è una patologia su base genetica, caratterizzata da ispessimento delle pareti ventricolari, aumentato volume e disorganizzazione dei cardiomiociti e fibrosi. La CMI presenta marcata eterogeneità genotipica (molti geni possono causarla) e fenotipica (una stessa mutazione può dare quadri di ipertrofia molto diversi). Da un punto di vista molecolare si manifesta con una riattivazione dell'espressione di geni normalmente attivi durante il periodo fetale, cui segue una graduale compromissione della funzionalità cardiaca (1,2). La comprensione dei complessi sistemi di regolazione e di attivazione di questo rimodellamento molecolare può sicuramente essere utile nel rallentamento della totale perdita della funzionalità cardiaca, evento culmine di questi processi tipici della cardiomiopatia ipertrofica. I geni codificanti per i fattori di trascrizione GATA-4 ed Nkx-2.5 e per la prodinorfina, gene orchestratore del processo di cardiogenesi sembrano anch'essi coinvolti nelle alterazioni molecolari e nel rimodellamento del cuore ipertrofico in modelli animali (3,4).

Partendo dal presupposto che tutti i soggetti di uno stesso ceppo familiare siano portatori della stessa mutazione genetica e avendo evidenziato negli affetti una differente espressione fenotipica della malattia, abbiamo eseguito ricerche per studiare eventuali anomalie dell'espressione di geni coinvolti nel processo della cardiogenesi. (possibili geni modificatori) e verificare l'associazione con il fenotipo ipertrofia della CMI. Per escludere gli effetti confondenti della variabilità genetica lo studio è stato effettuato sia su pazienti CMI tipizzati geneticamente e portatori di una stessa mutazione, sia su pazienti CMI non tipizzati geneticamente ma appartenenti ad uno stesso nucleo familiare. I pazienti sono stati sottoposti a visita cardiologica, ECG ed ecocardiogramma e al prelievo di campioni ematici per gli studi genetici e di espressione genica. Lo studio molecolare è stato condotto complessivamente su sangue periferico di 55 pazienti affetti da CMI e di 20 soggetti normali. L'espressione dei geni cardiogenici e correlati al rimodellamento miocardico (GATA4, Nkx, Prodinorfina, Smad1, Smad3, Smad4, BMP4 e myc) e dei geni correlati a processi apoptotici (Bad e Bcl2) è stata rilevata mediante real-time PCR e calcolo del Delta D-Ct (4). I valori dell'espressione genica sono stati suddivisi in base al sesso ed in gruppi in base all'età. I nostri risultati sperimentali dimostrano una alterata espressione dei geni implicati nel processo cardiogenico e nell'apoptosi nei pazienti affetti da CMI rispetto ai controlli sani, con differenze nei livelli di sovraespressione legate al sesso e all'età del paziente. I nostri risultati riguardanti l'alterata espressione di un pattern genico associato alla CMI è in perfetto accordo con diversi studi condotti sia su modelli animali, che su tessuto cardiaco umano (5,6,7)

La correlazione positiva da noi riscontrata tra profili di espressione genica nel sangue circolante e CMI fa emergere la possibilità di utilizzare, attraverso un semplice prelievo ematico, dei marcatori precoci di una patologia cardiaca di rapida e subdola insorgenza, e di identificare così i pazienti a maggior rischio di complicanze.

Bibliografia

1. Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 2001;104(4):557–567.
2. Maron BJ, Seidman JG, Seidman CE. Proposal for contemporary screening strategies in families with hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44(11):2125–2132.
3. Eijssen LM, van den Bosch BJ, Vignier N, Lindsey PJ, van den Burg CM, Carrier L, Doevendans PA, van der Vusse GJ, Smeets HJ. Altered myocardial gene expression reveals possible maladaptive processes in heterozygous and homozygous cardiac myosin-binding protein C knockout mice. *Genomics*. 2008 Jan;91(1):52-60.
4. Maioli M., Asara Y., Pintus A., Ninniri S., Bettuzzi S., Scaltriti M., Galimi F., Ventura C. Creating prodynorphin-expressing stem cells alerted for a high-throughput of cardiogenic commitment. *Regenerative Medicine*, March 2007, Vol. 2, No. 2, Pages 193-202
5. Ventura C, Maioli M, Pintus G, Posadino AM, Tadolini B. Nuclear opioid receptors activate opioid peptide gene transcription in isolated myocardial nuclei. *J Biol Chem*. 1998 May 29;273(22):13383-6.
6. Oka T, Maillet M, Watt AJ, Schwartz RJ, Aronow BJ, Duncan SA, et al. Cardiac-specific deletion of *Gata4* reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res* 2006
7. Hannenhalli S, Putt ME, Gilmore JM, Wang J, Parmacek MS, Epstein JA, et al. Transcriptional genomics associates FOX transcription factors with human heart failure. *Circulation* 2006;114:1269– 76.,

CAMPI RADIOELETTRICI CONVOGLIATI SONO IN GRADO DI MODULARE L'ESPRESSIONE DI GENI E PROTEINE COINVOLTI NEL PROCESSO DI DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI EMBRIONALI MURINE.

*Margherita Maioli**, *Sara Santaniello***, *Gianfranco Pigliaru***, *Sara Gualini ***, *Vania Fontani **, *Alessandro Castagna**, *Salvatore Rinaldi* and Carlo Ventura[§]*

**Dipartimento di Scienze Biomediche/Isituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università di Sassari, - Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy, ** Dipartimento di Scienze Biomediche, Università di Sassari, - Viale San Pietro 43/B, 07100 Sassari, Italy * Istituto Rinaldi Fontani, Viale Belfiore 43, 50144 Firenze, 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*

Parole chiave: cellule staminali, radiofrequenze, espressione genica

L'orientamento differenziativo (commitment) delle cellule staminali, il processo attraverso il quale esse "scelgono" il loro destino, è regolato non soltanto da stimoli chimici, ma anche da segnali fisici e dalla stessa forma cellulare (1, 2). In questo contesto, forze esterne ed interne modificano la forma delle cellule staminali creando un habitat complesso e ancora poco definito: la "nicchia cellulare".

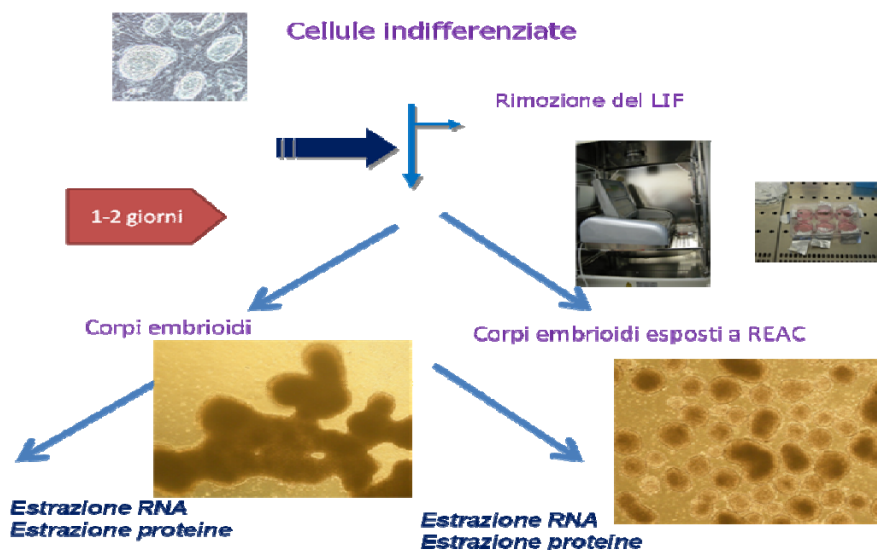
Un campo di indagine assolutamente innovativo e molto promettente riguarda pertanto l'identificazione di stimoli fisici in grado innescare specifici percorsi differenziativi in cellule multipotenti e la successiva analisi dei meccanismi molecolari responsabili delle risposte cellulari a tali stimoli. In studi precedenti abbiamo dimostrato come l'applicazione di un campo magnetico sinusoidale a frequenza estremamente bassa (50 Hz, 0.8 mTrms) a cellule staminali embrionali murine (linea GTR1) provocasse l'espressione dei geni GATA-4 ed Nkx-2.5 (6), codificanti per fattori di trascrizione essenziali per la cardiogenesi in diverse specie animali, uomo incluso. Il campo magnetico induceva anche l'espressione del gene della prodinorfina, nonché la sintesi e la secrezione di dinorfina B nel mezzo di cultura (3). Studi di "nuclear run off" in nuclei isolati hanno dimostrato come tali effetti venissero indotti a livello trascrizionale (3). Questi risultati sono di particolare rilievo in considerazione del ruolo del gene della prodinorfina nell'induzione del processo di cardiogenesi (4) e della scoperta di recettori nucleari della dinorfina B accoppiati all'attivazione di specifiche isoforme nucleari della protein chinasi C e alla trascrizione di geni cardiogenetici (5). Il Radio-Electric-Asymmetric-Conveyer (REAC) è un'apparecchiatura elettromedicale di nuova generazione. E' costituita a seconda dei modelli da uno o più emettitori a microonde (a 2,4; 5,8 ; 10,5 Ghz), e da una antenna accoppiata a ciascun emettitore, secondo un sistema brevettato (6). Scopo dell'antenna è quello di concentrare l'interazione che si viene a creare: tra il campo elettromagnetico emesso dal REAC e quello emesso dal corpo del soggetto in trattamento. Questa interazione concentrata dall'antenna genera nell'organismo (ed in particolare nel punto del corpo ove è appoggiata l'antenna) una micro corrente a radiofrequenza che determina una risposta Biologica di tipo terapeutico (7, 8). Lo strumento utilizzato nello studio è il modello CRM; ASMED, Firenze, Italia.

Nel presente lavoro abbiamo utilizzato il REAC come generatore di radiofrequenze collegando le antenne (probe) alle piastre in cui sono state coltivate cellule R1 nella fase di corpi embrioidi (primi 3 giorni), e cellule R1 adese, in una fase successiva del loro processo di differenziamento (10 giorni). L'analisi dell'espressione genica è stata condotta su RNA totale estratto da entrambi i gruppi di cellule esposti o no alle radiofrequenze. Mediante real time PCR sono stati valutati i livelli di espressione dei geni implicati nel processo di differenziamento cardiaco (Nkx-2.5, GATA-4 e prodinorfina) neuronale (neurogenina 1) muscolare scheletrico (myoD e miogenina), nonché l'espressione dei geni della famiglia delle SMAD, trasduttori del segnale (Smad1, 3, 4, 5 e 7) capaci di mediare il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali embrionali; a tale riguardo abbiamo inoltre valutato l'espressione dei geni SOX3 e Oct4, la cui espressione viene normalmente correlata con lo stato indifferenziato. Abbiamo inoltre valutato l'espressione di specifici markers di

differenziamento tissutale (alpha sarcomeric actinin, myoD) allo scopo di valutare l'influenza del campo elettromagnetico a bassissima frequenza sulla resa dei diversi fenotipi cellulari.

Gli studi di espressione genica confermano un significativo incremento dei geni orchestratori dei processi di differenziamento verso il fenotipo cardiaco, muscolare scheletrico e neuronale in cellule R1 esposte alle radiofrequenze. A conferma di un potenziale ruolo differenziativo di tale campo elettromagnetico a bassissima frequenza anche l'espressione delle proteine markers dei processi di cardiogenesi, miogenesi e neurogenesi era maggiore nelle in cellule esposte al campo.

L'espressione delle Smad 1,3,4,5, determinata a livello genico e proteico, subiva un aumento significativo in seguito ad esposizione alle radiofrequenze, indicando comunque un coinvolgimento di questa via di trasduzione del segnale in seguito a stimolazione con questo tipo di campo elettromagnetico. I geni Sox2 ed Oct4, attivamente espressi in cellule staminali allo stato indifferenziato sono normalmente inibiti durante il processo di differenziamento; l'esposizione alle radiofrequenze determina una riduzione notevole dell'espressione di tali geni, rispetto a quanto si osserva nei controlli. Gli studi attuali rappresentano un notevole passo avanti nella direzione di un orientamento fenotipico di cellule staminali, senza l'ausilio di tecnologie di trasferimento genico o di manipolazioni chimiche.



Bibliografia

1. Roskelley CD, Desprez PY, Bissell MJ. Extracellular matrix-dependent tissue-specific gene expression in mammary epithelial cells requires both physical and biochemical signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Dec 20;91(26):12378-82.
2. McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS. Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev Cell* 2004 Apr;6(4):483-95.
3. Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Mesirca P, Remondini D, et al. Turning on stem cell cardiogenesis with extremely low frequency magnetic fields. *FASEB J* 2005 Jan;19(1):155-7.
4. Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Fadda M, Maioli M. Protein kinase C signaling transduces endorphin-primed cardiogenesis in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res* 2003 Apr 4;92(6):617-22.
5. Ventura C, Zinellu E, Maninchedda E, Maioli M. Dynorphin B is an agonist of nuclear opioid receptors coupling nuclear protein kinase C activation to the transcription of cardiogenic genes in GTR1 embryonic stem cells. *Circ Res* 2003 Apr 4;92(6):623-9.
6. Rinaldi S, Fontani V, inventor Rinaldi S, Fontani V, assignee. Radioelectric Asymmetric Conveyer for therapeutic use patent EP1301241 (B1). 2000 October 11, 2006.
7. Collodel G, Moretti E, Fontani V, Rinaldi S, Aravagli L, Sarago G, et al. Effect of emotional stress on sperm quality. *Indian Journal of Medical Research* 2008 Sep;128(3):254-61.
8. Rinaldi S, Fontani V, Aravagli L, Mannu P. Psychometric evaluation of a radio electric auricular treatment for stress related disorders: a double-blinded, placebo-controlled controlled pilot study. *Health and Quality of Life Outcomes* 2010;8:31.

MICROPATTERN DI CARBONIO AMORFO IDROGENATO PER L'ADESIONE E IL DIFFERENZIAMENTO DI CELLULE STAMINALI

S. Mattioli¹, I. Armentano¹, F. D'Angelo², S. Martino², A. Orlacchio², J.M. Kenny¹

1. Laboratorio di Scienza e Tecnologia dei Materiali e Unità di Ricerca INBB

Università di Perugia, Terni, Italy

2. Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy.

e-mail: samanthamattioli@gmail.com

Nel campo della medicina rigenerativa la comprensione delle interazioni tra cellule staminali e biomateriali costituisce un elemento fondamentale per meglio progettare materiali adatti all'ingegneria tissutale. Le proprietà chimico-fisiche del carbonio amorfo e la sua nota emocompatibilità lo rendono un candidato adatto a tale scopo. L'obiettivo di questo studio è stato quello di indagare l'effetto della geometria superficiale sul comportamento di cellule staminali del midollo osseo. Film di carbonio amorfo sono stati realizzati su vetro tramite deposizione chimica da fase vapore attivata da un plasma a radiofrequenza. Il metano è stato usato come gas precursore e si sono ottenuti dei film di carbonio amorfo idrogenato con spessori che variano da 24 a 100 nm in funzione dei parametri di deposizione in termini di tempo e potenza della radiofrequenza. Sono stati depositati film con diverse geometrie superficiali: uniformi e *patternizzati*, utilizzando come maschere griglie per microscopia elettronica.

Sono state studiate le caratteristiche chimico-fisiche superficiali e le proprietà di adesione, proliferazione e differenziamento di cellule staminali delle superfici ottenute.

Sono quindi stati realizzati film di carbonio amorfo uniforme, con quadrati regolari di 40 e 20 μm di lato (400M e 600M) distanziati rispettivamente di 20 e 10 μm e con canali paralleli di dimensioni larghezza canale/distanza 80/40 μm (200P), 40/30 μm (300P) e 30/20 μm (400P). Il film uniforme di carbonio amorfo ha mostrato un angolo di contatto rispetto all'acqua deionizzata di $77\pm 1^\circ$ e rispetto al diiodometano di $19\pm 1^\circ$ che attraverso il metodo di Owens-Wendt, hanno permesso di calcolare una energia superficiale di 51.15 mN/m (48.16 mN/m e 2.99 mN/m componente dispersiva e polare, rispettivamente), mentre tutte le configurazioni *patternizzate* hanno mostrato un'energia superficiale di 53.79 mN/m (48.07 e 5.72 mN/m componente dispersiva e polare rispettivamente), tale valore è stato ottenuto con l'angolo di contatto per l'acqua calcolato in $69\pm 1^\circ$ e quello per il diiodometano in $19\pm 1^\circ$. Gli esperimenti di assorbimento proteico effettuati hanno evidenziato come i film di carbonio amorfo presentino valori più alti, sia rispetto al vetro che alle plastiche per colture cellulari, confermando le buone proprietà di emocompatibilità del carbonio amorfo depositato. Nel caso del film omogeneo i valori sono maggiori rispetto a quelli ottenuti per le varie configurazioni di *pattern*. Le superfici *patternizzate* invece hanno mostrato gli stessi livelli di assorbimento proteico, indipendentemente dalla geometria e dalla dimensione dei *pattern*. Gli esperimenti di adesione e proliferazione di cellule staminali umane del midollo osseo hanno dimostrato la buona citocompatibilità delle superfici prodotte con valori di BrdU⁺ e XTT simili a quelli delle superfici di controllo; mantenendo, inoltre la capacità di differenziamento verso tessuto osseo e adiposo. Lo studio della morfologia cellulare ha evidenziato come le cellule depositate su geometria a canali hanno un fattore di elongazione da 3.4 ± 0.2 per i 200P a 6.2 ± 0.4 per i 300P mentre è 1.2 ± 0.5 per il film uniforme, 1.1 ± 0.2 per la plastica e circa 0.6 ± 0.2 per la geometria a quadrati. L'allineamento cellulare è stato misurato al 60% per i canali 200P e 400P, del 70% per i 300P mentre nel caso del film uniforme è risultata del 25%. Gli esperimenti di differenziamento neurale con e senza l'ausilio di un induttore chimico hanno dimostrato come solo una determinata geometria (300P) sia in grado di stimolare le cellule a manifestare i caratteri neuronali.

Riferimenti bibliografici

1. Narayan, R.J. Nanostructured diamondlike carbon thin films for medical applications. *Mater Sci Eng C* 25, 405, 2005.
2. Curtis, A., Wilkinson, C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 18, 1573, 1997.
3. Martino S, D'Angelo F, Armentano I, Tiribuzi R, Pennacchi M, Dottori M, Mattioli S, Caraffa A, Cerulli G G, Kenny J M, Orlacchio A Hydrogenated amorphous carbon nanopatterned film designs drive human bone marrow mesenchymal stem cell cytoskeleton architecture. *Tissue Eng Part A* 15 3139, 2009.
4. Popov C, Vasilchina H, Kulisch W, Danneil F, Stuber M, Ulrich S, Welle A, Reithmaier J.P Wettability and protein adsorption on ultrananocrystalline diamond/amorphous carbon composite films. *Diamond & Related Materials* 18, 895, 2009.

RECETTORI DEGLI ESTROGENI NEI LINFOCITI DEL SANGUE PERIFERICO UMANO

Maselli A.^(1,2), Pierdominici M.⁽³⁾, Colasanti T.⁽³⁾, Giammarioli A.M.⁽²⁾, Delunardo F.⁽³⁾, Vacirca D.⁽³⁾, Sanchez M.⁽³⁾, Giovannetti A.⁽⁴⁾, Malorni W.⁽²⁾, Ortona E.⁽³⁾, Franconi F.⁽¹⁾.

1) *Laboratorio Nazionale dell'Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi, Osilo (SS)*

2) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

3) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

4) *Dipartimento di Medicina Clinica, Università "La Sapienza", Roma*

Introduzione. Gli estrogeni svolgono un ruolo importante nella regolazione del sistema immunitario, in particolare nel mantenimento dell'omeostasi linfocitaria. Gli effetti biologici degli estrogeni sono mediati dal loro legame a specifici recettori intracellulari (recettori degli estrogeni, ER) appartenenti alla superfamiglia dei recettori nucleari dei fattori di trascrizione: ER α ed ER β . Riguardo ER α sono state identificate due isoforme principali, una di 66 kDa (ER α 66) e l'altra di 46 kDa (ER α 46). Recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di recettori degli estrogeni a livello della membrana plasmatica (mER), strutturalmente simili a quelli intracellulari, che attivano la cascata di trasduzione del segnale attraverso varie proteine chinasi. Risultati contrastanti sono stati riportati riguardo all'espressione e alla funzione dei recettori intracellulari ER α ed ER β nelle varie sottopopolazioni linfocitarie, mentre la presenza e la funzionalità di tali recettori a livello della membrana plasmatica linfocitaria sono state scarsamente indagate.

Metodi. In questo studio abbiamo valutato l'espressione, intracellulare e di membrana, di ER α e ER β , nei linfociti isolati dal sangue periferico umano, mediante tecniche di citometria statica e a flusso e mediante Western Blot. A tale scopo abbiamo utilizzato cinque differenti anticorpi commerciali che riconoscono epitopi diversi del recettore.

Risultati. I dati ottenuti hanno mostrato che sia ER α sia ER β sono espressi a livello intracellulare nei linfociti T (CD4+ e CD8+), nei linfociti B e nelle cellule *natural killer* (NK); in particolare la variante ER α 46 risulta essere quella espressa in modo più significativo. La presenza di ER α 46 è stata dimostrata anche a livello della membrana plasmatica linfocitaria. Inoltre, il trattamento dei linfociti con estradiolo coniugato alla BSA, così da impedirne il passaggio attraverso la membrana cellulare, ha indotto una rapida fosforilazione della proteina chinasi ERK (Extracellular Regulated Kinase), una proliferazione significativa dei linfociti T, e la produzione di IFN- γ da parte delle cellule NK, suggerendo l'espressione di un ER di membrana funzionale.

Conclusioni. In conclusione, i risultati ottenuti potrebbero fornire un importante contributo alla conoscenza dei meccanismi con cui gli estrogeni modulano il sistema immunitario. Inoltre l'identificazione della via di segnale mediata da mER α potrebbe portare a strategie terapeutiche innovative per un ampio spettro di patologie umane.

INTERACTION OF CYTOCHROME-C WITH MONOOLEIN LIQUID CRYSTALS MESOPHASES

Mazzoni, S.¹; Barbosa, L.R.S.²; Itri, R.²; Mariani, P.¹

¹ *SAIFET " Dipartimento di Scienze Alimentari, Agro-Ingegneristiche, Fisiche, Economico-Agrarie e del Territorio. Ancona, Italy*

² *Instituto de Física - Universidade de São Paulo – Brasil*

Phase behaviour and structural properties of monoacylglycerides in water have been investigated for a long time, due to their extended polymorphism. In particular, monoolein (MO) in water shows several mesophases, characterized by a high disordered conformation of the hydrocarbon chains. At such conditions, an embedded protein can influence the physical properties of the lipid matrix, depending on the protein size and polarity. We take advantage of the structural properties of monoolein and cytochrome-c to extensively study the temperature effects on the cubic transition from Pn3m to Im3m by means of small-angle X-ray scattering technique (SAXS) and electronic absorption spectroscopy (EAS). To do so, we made samples composed of monoolein (50 mg/ml) in the presence of 1, 10 and 50 mg/ml of cytochrome-c. Ours preliminary SAXS results indicate that cyto-c is able to change the monoolein water channels, from cubic Pn3m to Im3m. Moreover, such kinetic behaviour is too slow, taking place within some days. EAS measurements indicate that the incorporation of cyto-c within the Monoolein water channels begins after two or three days (after the sample preparation). Besides, after one week of sample preparation the amount of cyto-c within the Monoolein water channels is equal to 60 % and 34% for 1 and 10 mg/ml of cyto-c, respectively. Interestingly, increasing the temperature, the unity cell parameter decreases, indicating that water is going out from the unity cell and the symmetry of the liquid crystal phase can changes to another cubic or to hexagonal, depending on the temperature and the sample composition. We believe that these results could bring more insights on the protein-liquid crystal interaction.

BIOREMEDIATION OF WATER POLLUTED BY CHLORINATED PHENOLS USING IMMOBILIZED LACCASE

C. Menale^{1,3}, C. Nicolucci^{2,3}, S. Rossi³, D.G. Mita^{1,2,3}, N. Diano^{1,2,3}

¹ Department of Experimental Medicine, Second University of Naples, Via S. M. di Costantinopoli 16, 80138 Naples, Italy

² National Institute of Biosystems and Biostructures (INBB), Via le Medaglie d'Oro, 305, 00136 Rome, Italy

³ Institute of Genetics and Biophysics, CNR, Via Pietro Castellino, 111-80131, Naples, Italy

In view of the health problems induced by the presence into the environment of endocrine chemical disruptors (ECDs), Laccase from *Trametes versicolor* was covalently immobilized on Polyacrylonitrile (PAN) beads in order to remove some chlorinated phenols from polluted waters. Using 2-chlorophenol (2-CP) and 4-chlorophenol (4-CP) as substrate model, the laccase-PAN beads system has been characterized as a function of pH, temperature and substrate concentration. The biochemical parameters so obtained have been compared with those of the free enzyme to evidence the modification induced by the immobilization process. The immobilized laccase exhibited maximal enzyme activity at pH 5.0 and a high enzyme activity in optimum range of temperature 20÷50°C maintaining at least 70% of initial activity. Evaluated kinetic parameters are reported in Table 1. These values underlined the greater affinity of laccase against 2-CP than 4-CP. Also the calculated values of activation energy confirmed this behaviour: for 2-CP $E_{att}=45 \text{ KJ mol}^{-1}$, for 4-CP $E_{att}=52 \text{ KJ mol}^{-1}$.

When employed in a fluidized bed bioreactor (FBB) at flow rate 75 mL/min, the laccase-PAN beads system was able to oxidize a wide range of chlorinated phenolic substrates using the operational parameters evaluated previously. It was found that 2-CP, 4-CP, 2,3,4,5-Tetrachlorophenol (tetra-CP) and Pentachlorophenol (PCP) were degraded with high Removal Efficiency (RE%). In particular the enzymatic RE was more than 70% in a reaction time of 90 min when chlorinated phenols are used as single compounds exhibiting transformation efficiency in the following order: tetra-CP > 2-CP > 4-CP > PCP (Figure 1).

To simulate real polluted waters, bioremediation of mixtures of chlorinated compounds was analysed. Degradation depended on the initial amount of chlorinated compound. In copresence of several compounds, RE% of immobilized Laccase decreased, but it's interesting even the catalytic system can degrade at least 50% of chlorophenols present in the mixture in only 90 minutes (Figure 2).

Moreover, the operational stability of catalytic system resulted excellent, since it maintained more than 80% of the initial activity after 30 days of work.

In spite of some limitations, the application of laccase to decontaminate wastewater polluted with chlorinated phenols appears feasible.

Substrates	Free laccase		Immobilized Laccase	
	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{moli min}^{-1} \text{mgenz}^{-1}$)	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{moli min}^{-1} \text{mgenz}^{-1}$)
4-CP	1.35	0.44	7.4	0.17
2-CP	0.87	0.31	6.0	0.15

Table 1. Kinetic parameters of the PAN beads-laccase system

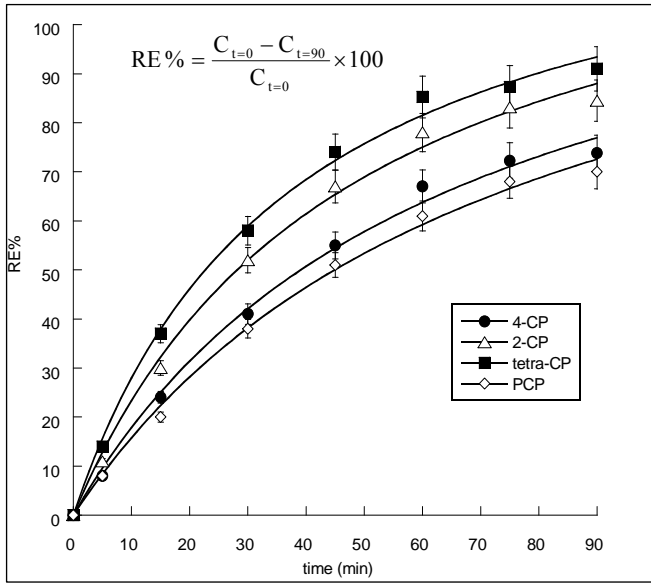


Fig. 1. Removal Efficiency of chlorinated phenols as single substrates

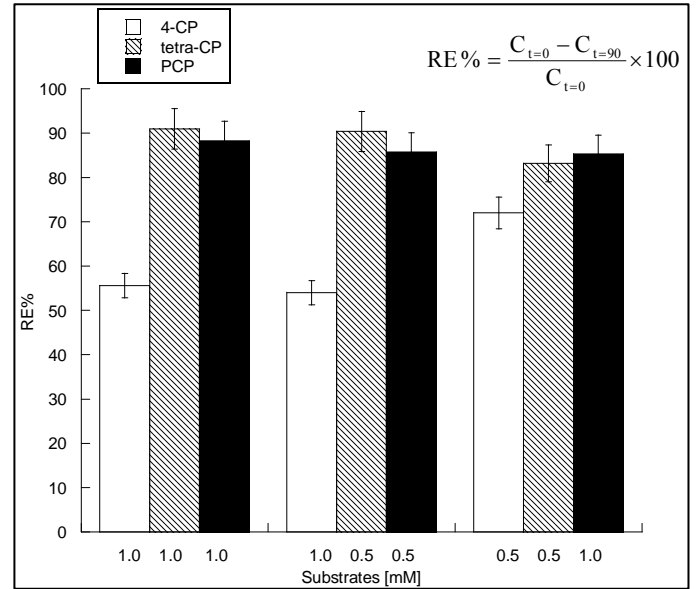


Fig. 2. Removal Efficiency of mixtures of chlorinated phenols

AN RNA INTERFERING CONSTRUCT TARGETED AT THE TRICHOHECENE BIOSYNTHESIS GENE *TRI6* AFFECTS MYCOTOXIN PRODUCTION IN THE PLANT PATHOGENIC FUNGUS *FUSARIUM CULMORUM*

*Marcella Orrù*¹, *Barbara Scherm*¹, *Virgilio Balmas*¹, *Francesca Spanu*¹, *Emanuela Azara*², *Giovanna Delogu*², *Thomas M. Hammond*³, *Nancy P. Keller*⁴ and *Quirico Migheli*¹

¹Dipartimento di Protezione delle Piante - Unità di ricerca Istituto Nazionale Biostrutture e Biosistemi, Università degli Studi di Sassari, Via E. De Nicola 9, I-07100 Sassari, Italy. ²CNR Istituto di Chimica Biomolecolare, Sezione di Sassari, Traversa La Crucca 3, Località Baldinca, Li Punti, I - 07040 Sassari, Italy. ³Division of Biological Sciences, University of Missouri, Columbia, USA. ⁴Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Wisconsin, Madison, USA.

Fusarium culmorum is a major fungal pathogen of wheat, causing two forms of disease, namely the crown and foot rot (CFR) and the fusarium head blight (FHB). Significant yield losses are reported and the grain often becomes contaminated with mycotoxins. Among the most bioactive compounds are trichothecenes; type B trichothecenes, include deoxynivalenol (DON), also known as vomitoxin, with its derivatives monoacetyldeoxynivalenols (3-AcDON, 15-AcDON), nivalenol (NIV) and its acetylated form 4-acetylnivalenol or fusarenone X.

In this study we have tested the efficacy of an RNA silencing construct targeted at the regulatory gene *TRI6* to suppress mycotoxin production in the plant pathogenic fungus *F. culmorum*.

A series of *TRI6* IRT transformants were obtained from two highly virulent strains of *F. culmorum*, namely MCf 21 wild type and its nitrate reductase deficient mutant MCf 21 nit1.

We have focused our HPLC-MS analysis on DON and its acetylated derivatives 3-AcDON and 15-AcDON. An Agilent Technologies 1100 series LC/MSD equipped with a diode-array detector and an autosampler (G1313A) was used for LC separation. Chromatographic separation was achieved using a Luna C18 column fitted with a 3 µm C18 security guard cartridge. Type B-trichothecenes were extracted using a liquid/liquid extraction step.

In a preliminary experiment, the average (mean of six replicates ± SD) production of type B trichothecenes (ng mL⁻¹ culture filtrate) by this strain was 212.6±74.2 DON, 523.0±98.9 3-AcDON, and 16.3±3.9 15-AcDON after 14 d of growth in Vogel's medium at 25°C.

In MCf 21 wild type-derived transformants # 252 and 253, the production of type B trichothecenes was reduced by 95 and 100%, respectively. In transformants # 266 and 282 type B trichothecene production was reduced to 3.1 and 5.4% with respect to the recipient strain. Surprisingly, transformants # 255, 256, 257, and 260 produced 1,370-2,770% more trichothecenes than the MCf 21 wild type strain, corresponding to average concentrations ranging from 12,008±2,637 to 24,341±5,400 ng mL⁻¹ of culture filtrate.

Among *TRI6* IRT transformants deriving from the nitrate reductase mutant MCf 21 nit1, only # 5 did not differ from the recipient strain for the production of type B trichothecenes, while in transformant 112 the trichothecene production was reduced by approximately 90%. In all the other *TRI6* IRT transformants (i.e., # 14, 106, 111, 114, and 127), the production of type B trichothecenes was completely suppressed.

Acknowledgements

Work partially funded by Regione Autonoma della Sardegna - Borsa di Ricerca cofinanziata con fondi a valere sul PO Sardegna FSE 2007-2013 sulla L.R.7/2007 "Promozione della ricerca scientifica e dell'innovazione tecnologica in Sardegna".

IDENTIFICATION OF STRUCTURAL FEATURES CRITICAL FOR HUMAN VDAC ACTIVITY USING MUTAGENESIS

Simona Reina

Voltage-dependent anion channels (VDACs) are the most abundant proteins of the mitochondrial outer membrane that form hydrophilic pore structure and constitute the main pathway for the metabolites exchange between the cytosol and mitochondria. In higher eukaryotes three VDAC isoforms exist, but only VDAC1 and VDAC2 are well characterized. VDAC3 has been poorly studied and does not show an evident pore-forming ability. The relationship structure/function of the human VDAC isoforms and their mutants will be investigated using three different strategies: complementation assay in a yeast strain deficient for endogenous VDAC gene, purification and reconstitution of mutant proteins in artificial bilayers, expression of mutants marked with tags to monitor their activity and location with particular focus on apoptosis and autophagy. VDAC1 and 2 are able to complement the normal growth of a yeast strain in which the endogenous Porin1 gene is deleted, while VDAC3 not. We will use this assay to screen mutations of single amino acids or swapping of domains. Thus we expect to obtain significant information on the structure and function of VDAC isoforms.

MICROSTRUCTURAL ANALYSIS OF BIOACTIVE GLASS–CERAMIC SCAFFOLDS FOR BONE REGENERATION BY X-RAY SYNCHROTRON MICROTOMOGRAPHY

C. Renghini¹, A. Manescu¹, K. Marozzi¹, F. Fiori¹, F. Brun^{2,3}, F. Baino⁴, G. Tromba³, C. Vitale-Brovarone⁴, A. Giuliani¹

¹ *Department SAIFET, Polytechnic University of Marche, Ancona, Italy*

² *Department of Electrical, Electronic and Computer Engineering, University of Trieste, Italy*

³ *Sincrotrone Trieste S.C.p.A, Basovizza, Trieste, Italy*

⁴ *Materials Science and Chemical Engineering Department, Polytechnic of Turin, Italy*

The fundamental aim of bone engineering is the regeneration of tissues through the direct implantation of cells/tissues or by stimulating cells to grow in an implanted scaffold. In this work, an accurate morphological analysis of the three-dimensional (3D) structure of CEL2 glass–ceramic scaffolds was performed in order to confirm and extend the promising results obtained in previous works. In particular, synchrotron radiation microCT analysis was used to study the 3D distribution of the new apatitic phase grown on scaffold trabeculae and its evolution as a function of the soaking time in a simulated body fluid.

NANOPARTICELLE BIOPOLIMERICHE PER IL RILASCIO CONTROLLATO DI PROTEINE

N. Rescignano¹, I. Armentano¹, L. Latterini², L. Tarpani², J.M. Kenny¹
Laboratorio di Scienza e Tecnologia dei Materiali e Unità di Ricerca INBB
Università di Perugia, Terni, Italy
²*Dipartimento di Chimica - CEMIN, Università di Perugia, Perugia - Italy*

Negli ultimi anni con il progresso dei processi biotecnologici, sono state prodotte un significativo numero di proteine a scopo terapeutico. In quest'ottica sempre più attenzione è stata dedicata anche alla veicolazione di queste proteine, sintetizzando e caratterizzando dispositivi che fossero adatti alla corretta e oltretutto alla mirata consegna del farmaco al tessuto. Tra i vari dispositivi presenti le nanoparticelle realizzate a partire da polimeri biodegradabili hanno richiamato molta attenzione. La potenziale applicabilità di queste nanoparticelle biodegradabili, che fanno da veicoli per farmaci, peptidi e antigeni, è basata non solo sulla protezione dalla degradazione proteolitica e acida ma anche dal controllo del rilascio tramite la velocità di degradazione polimerica. L'obiettivo di questo lavoro è la progettazione e la realizzazione di sistemi polimerici nanostrutturati per l'incapsulamento e la veicolazione di agenti bioattivi macromolecolari, per una corretta e controllata consegna del farmaco al tessuto malato, per il trattamento di varie patologie.

In questo lavoro sono state sintetizzate nanoparticelle di poli(DL-lattico-co-glicolico) PLGA con un rapporto al 50/50 (PLA/PGA) e caricate con l'albumina bovina serica (BSA) tal quale e marcata con un fluorocromo (FITC), utilizzando il metodo della doppia emulsione con conseguente evaporazione del solvente (W/O/W).

La caratterizzazione morfologica è stata effettuata con un microscopio elettronico a scansione a emissione di campo (FESEM), un microscopio elettronico a trasmissione TEM ed infine è stata analizzata la distribuzione delle dimensioni tramite misure di scattering dinamico della luce, sono state effettuate misure di fluorescenza con spettri di emissione ed eccitazione e tempi di vita con il metodo del conteggio del fotone singolo di nanoparticelle caricate con FITC-BSA, allo scopo di studiare l'incapsulamento della proteina all'interno delle nanoparticelle polimeriche e l'efficienza di tale processo.

I risultati dell'analisi morfologica mostrano la presenza di nanoparticelle con distribuzione omogenea dei diametri e un diametro medio di 260 ± 10 nm. L'analisi degli spettri di fluorescenza (in emissione ed in eccitazione) mostra forme spettrali con bande tipiche dovute alla localizzazione del fluorocromo sia all'interno che all'esterno delle nanoparticelle. Questa ipotesi è confermata anche dai dati di fluorescenza risolta nel tempo; infatti, l'analisi delle curve di decadimento di fluorescenza risultano correlate da funzioni bi esponenziali. I due tempi di vita determinati sono stati attribuiti al fluorocromo in due microambienti diversi.

Le tecniche fluorimetriche utilizzate si sono dimostrate uno strumento importante per l'analisi del confinamento della proteina in una matrice polimerica biodegradabile su scala nanometrica.

La realizzazione di nanoparticelle polimeriche con un preciso controllo della dimensione e dell'incapsulamento delle proteine permetterà la veicolazione di agenti bioattivi in siti specifici di organi e tessuti, determinando la sopravvivenza e la funzionalità di cellule danneggiate o fornendo segnali in grado di promuovere una proliferazione e migrazione cellulare regioselectiva

Riferimenti Bibliografici

- 1) S.K. Han, J. H. Lee, D. Kim, S.H. Cho, S.H. Yuk, *Hydrophilized poly(lactide-co-glicolide) nanoparticles with core-shell structure for protein delivery Science and Technology of advanced Materials* 6 (2005) 468-474
- 2) X. Li, Y. Zhang, R. Yan, W. Jia, M. Yuan, X. Deng, Z. Huang *Influence of process parameters on the protein stability encapsulated in poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres; Journal of Controlled Release* 68 (2000) 41-52

ENZIMI LISOSOMIALI COME MARCATORI DELLA MALATTIA DI ALZHEIMER IN PAZIENTI AFFETTI DA DIABETE MELLITO TIPO 2

¹Tiribuzi R., ¹Crispoltoni L., ^{2,3}Orlacchio A., ¹D'Angelo F., ¹Datti A., ¹Martino S. e ¹Orlacchio A.

¹ Dipartimento di Medicina Sperimentale e Scienze Biochimiche, Sezione di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Perugia; ² Laboratorio di Neurogenetica, CERC-IRCCS Santa Lucia, Roma; ³ Dipartimento di Neuroscienze, Università di Roma "Tor Vergata".

La malattia di Alzheimer (MA) è la più comune forma di demenza senile in soggetti con più di 65 anni. Numerosi studi epidemiologici hanno rivelato che i pazienti con diabete mellito di tipo 2 (DM2) hanno una probabilità da 2 a 5 volte maggiore di sviluppare la Malattia di Alzheimer rispetto alla popolazione non diabetica. Queste due patologie condividono una serie di caratteristiche comuni, tra le quali alterazioni nell'espressione di una serie di idrolasi lisosomiali. Alterazioni nel sistema lisosomiale a livello neurale sono uno dei più precoci indicatori della MA, e precedono la formazione delle placche e dei grovigli neurofibrillari associati alla patologia. A questo riguardo abbiamo precedentemente dimostrato che le glicoidrolasi lisosomiali β -galattosidasi (β -gal), β -esosaminidasi (β -hex) e α -mannosidasi (α -man) sono up-regolate nei fibroblasti di pazienti con MA sia nella forma familiare che sporadica, mentre l'aspartico-proteasi catepsina D è down regolata. Anche nel DM2 sono state descritte importanti alterazioni del sistema lisosomiale, in particolare si fa riferimento al ruolo degli enzimi lisosomiali secreti nel plasma come presunti indicatori di compenso metabolico, in quanto il loro livello è direttamente collegato con l'indice glicemico. Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di ricercare potenziali meccanismi comuni alla base della MA e del DM2. A questo proposito è stata esaminata l'espressione degli enzimi lisosomiali β -gal, β -hex e α -man, catepsina D, B e S in pazienti MA (n=114), DM2 (n=109), MA-DM2 (n=116), e in controlli anziani (n=122) sia nel plasma che nelle cellule mononucleate (PBMCs) isolate da sangue periferico. L'analisi statistica dei dati ha rivelato che le attività enzimatiche della β -gal e della β -hex sono significativamente differenti tra pazienti con MA, DM2 e MA-DM2, rispetto ai controlli, sia nel plasma che nelle PBMCs. In particolare la β -gal plasmatica risulta incrementata nei pazienti MA e fortemente decrementata nei pazienti DM2 rispetto ai controlli, mentre nei pazienti MA-DM2 i livelli sono uguali ai controlli. La β -hex invece risulta incrementata sia nei pazienti MA che DM2 rispetto ai controlli. I livelli risultano ulteriormente incrementati nei pazienti MA-DM2. Risultati opposti sono stati ottenuti nelle PBMCs, nelle quali le attività enzimatiche di β -gal, β -hex e α -man diminuiscono marcatamente in attività specifica, senza variazioni nella composizione isoenzimatica nei pazienti MA e MA-DM2. L'analisi delle catepsine D, B ed S non ha evidenziato differenze nel plasma di tutti i gruppi di pazienti, mentre le forme mature di queste proteasi sono fortemente diminuite nelle PBMCs sia da pazienti MA che DM2. Questi risultati potenzialmente indicano che il meccanismo alla base della secrezione lisosomiale nei MA insorge anche nei pazienti DM2 quando sviluppano la Malattia di Alzheimer. Globalmente i livelli delle idrolasi e proteasi analizzate nei pazienti MA e MA-DM2 raggruppati per CDR (Clinical Dementia Rating) indicano che le variazioni nei livelli di espressione, sia nel plasma che nelle PBMCs, sono strettamente correlati con le fasi iniziali della demenza (CDR1). L'analisi ROC (Receiving Operating Characteristic) dei livelli di attività sia plasmatiche che intracellulari della β -gal e β -hex nei pazienti affetti da MA e MA-DM2 (MA vs CTRL e MA-DM2 vs DM2) possono essere utilizzate per discriminare i pazienti MA e MA-DM2 rispettivamente dai controlli e dai pazienti DM2 con elevata sensibilità e specificità. Complessivamente i nostri dati mostrano che le attività degli enzimi lisosomiali analizzati sono differenti tra pazienti con MA, DM2 e MA-DM2, rispetto ai controlli, sia nei campioni di plasma che nelle PBMCs e potrebbero essere prese in considerazione per il monitoraggio dello sviluppo della MA in individui anziani e pazienti precedentemente affetti da DM2. Inoltre questi risultati, combinati con una riduzione dell'espressione genica di GLB1, HEXB, HEXA, MAN2B1, CTSS e CTSB, unita ad una riduzione nei livelli del fattore di trascrizione TFEB osservata nelle PBMCs di pazienti MA e DM2 indicano un potenziale meccanismo comune nella regolazione dell'espressione degli enzimi lisosomiali nella MA e nel DM2.

Lavoro finanziato dal Ministero della Salute (grant no. RF-UMB-2006-339457).