

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

**Dottorato di Ricerca in
Farmacologia e Tossicologia**
Area 05 – Scienze Biologiche
S.S.D. BIO/14 - Farmacologia

**EFFETTI NEUROPROTETTIVI DEL
SULFORAFANE IN MODELLI *IN VITRO* DI
NEURODEGENERAZIONE**

Tesi di Dottorato presentata dalla
Dott.ssa **FABIANA MORRONI**

Docente Guida:
Prof.ssa PATRIZIA HRELIA

Coordinatore:
Prof. GIORGIO CANTELLI FORTI

XIX Ciclo

Anno Accademico 2005/2006

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE	1
1.1.1 Premessa	1
1.1.2 Morbo di Parkinson	2
– <i>Patogenesi</i>	3
– <i>Fattori eziologici</i>	5
1.2 ASPETTI BIOLOGICI DELLA NEURODEGENERAZIONE	8
1.2.1 Meccanismi di morte cellulare	8
1.2.2 Apoptosi e Morbo di Parkinson	10
1.2.3 Ruolo dello stress ossidativo nel Morbo di Parkinson	13
1.2.4 Trasduzione del segnale nella morte neuronale	16
– <i>PI3K/Akt</i>	18
– <i>MAPK/ERK</i>	20
1.3 MODELLI SPERIMENTALI NELLO STUDIO DEL MORBO DI PARKINSON	23
1.3.1 Modelli <i>in vitro</i>	23
1.3.2 Modelli <i>in vivo</i>	24
– <i>Modelli farmacologici</i>	25
– <i>Modelli transgenici</i>	27
1.4 STRATEGIE DI NEUROPROTEZIONE	29
1.4.1 Glucosinolati e derivati	31
– <i>Attività biologica degli isotiocianati</i>	33
2. SCOPO DELLA RICERCA	36
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 COMPOSTI CHIMICI	39

3.2 LINEA CELLULARE	40
3.3 TERRENO DI COLTURA E SOLUZIONI	40
3.3.1 Terreno di coltura	40
3.3.2 Soluzioni	41
3.4 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI	44
3.5 TRATTAMENTO CON 6-OHDA E H₂O₂	45
3.6 TRATTAMENTO CON SULFORAFANE	46
3.7 TRATTAMENTO CON BSO, LY294002 E PD98059	46
3.8 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI	47
3.8.1 Traslocazione della fosfatidilserina	47
3.8.2 Frammentazione del DNA	48
3.8.3 Attivazione delle caspasi-3 e -9	49
3.9 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE	50
3.10 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE	51
3.11 DETERMINAZIONE DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI GLUTATIONE	53
3.12 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI GST, GPx, GR E NADPH-QR	54
3.13 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DI ERK ½ E Akt	56
4. RISULTATI	58
5. DISCUSSIONE	74

6. BIBLIOGRAFIA	79
------------------------	----

7. PUBBLICAZIONI	86
-------------------------	----

8. APPENDICE	90
---------------------	----

1. INTRODUZIONE

1.1 LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

1.1.1 PREMESSA

“La demenza consiste nella compromissione globale delle funzioni cosiddette corticali (o nervose) superiori, ivi compresa la memoria, la capacità di far fronte alle richieste del quotidiano e di svolgere le prestazioni percettive e motorie già acquisite in precedenza, di mantenere un comportamento sociale adeguato alle circostanze e di controllare le proprie reazioni emotive: tutto ciò in assenza di compromissione dello stato di vigilanza. La condizione è spesso irreversibile e progressiva”. Così il Committee of Geriatrics del Royal College of Physicians britannico nel 1982 definisce la demenza.

La demenza è una condizione che interessa dall'1 al 5% della popolazione sopra i 65 anni di età, tale percentuale sale fino al 30% superati gli 80 anni di età (1). Nella definizione generica di demenza rientrano diverse patologie, alcune classificabili come demenze “primarie”, dove la causa principale è indicata in processi degenerativi cronici, come la malattia di Alzheimer (AD), la demenza con corpi di Lewy, le demenze riscontrate nella malattia di Parkinson (PD), nella paralisi sopranucleare progressiva e nella malattia di Huntington (HD). Distinte da queste ultime si trovano le demenze “secondarie” che sono conseguenza di diversi processi patologici, come ad esempio la demenza da AIDS.

Indipendentemente dalla causa della demenza, le caratteristiche comuni che presentano le diverse patologie sono l'estesa morte neuronale ed il

carattere di cronicità. L'attenzione della ricerca si deve quindi orientare alla valutazione dei meccanismi di morte cellulare e alla comprensione delle cause di danno cellulare, quali ad esempio stress ossidativo o alterazioni metaboliche.

Date le potenziali ripercussioni sul sistema sanitario (aumento delle degenze ospedaliere e della spesa farmaceutica) e sociale (problematiche relative all'assistenza) nell'immediato futuro si rende necessario potenziare la ricerca di nuove strategie di prevenzione mirate a ritardare l'esordio dei disordini neurodegenerativi.

Le argomentazioni di seguito riportate si focalizzano sull'eziopatogenesi del morbo di Parkinson (PD), come esempio di patologia neurodegenerativa, e sull'identificazione di potenziali strategie farmacologiche indirizzate alla prevenzione e/o al contenimento della malattia.

1.1.2 MORBO DI PARKINSON

Il PD è una malattia neurodegenerativa a decorso cronico che insorge in genere dopo i 50 anni. La malattia prende il nome da James Parkinson, il medico britannico che per primo nel 1817 ne descrisse i sintomi in "An Essay on the shaking palsy". La patologia ha un andamento progressivo e senza trattamento progredisce in 5-10 anni fino ad uno stato di elevata invalidità. Dopo la malattia di Alzheimer (AD), il PD è la patologia neurodegenerativa più diffusa, con un'incidenza media dell'1,5% nella popolazione sopra i 65 anni di età; ogni anno l'incidenza aumenta di 3 casi ogni 1000 ultrasessantacinquenni (2). Il PD è caratterizzato dalla presenza di almeno due dei seguenti sintomi: rigidità muscolare, bradicinesia,

tremore a riposo e perdita dei riflessi posturali. Esistono forme complete con uguale prevalenza di tutti e quattro i sintomi, altre in cui predomina il tremore oppure l'acinesia e la rigidità.

❖ **PATOGENESI**

Il PD è caratterizzato dalla degenerazione e conseguente perdita selettiva del numero e dell'attività dei neuroni dopaminergici appartenenti alla substantia nigra, in particolare della pars compacta (SNpc), con comparsa di inclusioni intracellulari note come *corpi di Lewy*. Questi neuroni, che originano dalla SNpc e proiettano allo striato (nucleo caudato e putamen), fanno parte di un complesso circuito neuronale che insieme alla corteccia, gangli della base e talamo partecipano al controllo del movimento volontario. La perdita progressiva dei neuroni dopaminergici avviene fisiologicamente durante l'invecchiamento, ma non raggiunge mai il valore di 70-80% di neuroni dopaminergici che causa l'insorgenza sintomatica del PD.

La patogenesi del PD non è ancora del tutto conosciuta; il processo che determina la morte neuronale a livello della SNpc coinvolge una cascata di eventi, che includono la disfunzione mitocondriale, lo stress ossidativo e l'eccitotossicità (3). La funzionalità del metabolismo ossidativo neuronale si riduce con l'avanzare dell'età, in parte a causa di un accumulo di mutazioni nel genoma mitocondriale. Analisi post-mortem di pazienti affetti da PD evidenziano un'eccessiva riduzione del complesso I della catena respiratoria mitocondriale, che si riflette in un deficit energetico e metabolico dovuto ad una ridotta produzione di ATP (4). Una disfunzione mitocondriale, sia che venga causata da mutazioni genetiche sia da fattori ambientali, determina un aumento di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Deficit energetico-metabolici possono di per sé causare un danno neuronale, modificando gradienti ionici e potenziali di membrana, oltre a provocare un accumulo di Ca^{2+} citosolico. In aggiunta essi generano condizioni che incrementano la tossicità degli aminoacidi eccitatori. L'eccessiva attività dei neurotrasmettitori eccitatori, come il glutammato, può produrre neurodegenerazione, secondo un meccanismo Ca^{2+} -dipendente. Questo fenomeno è noto come *eccitotossicità* (Figura 1). Sebbene il glutammato sia necessario per le normali funzioni cerebrali, la sua presenza in quantità eccessive nello spazio sinaptico può determinare morte cellulare eccitotossica. Il glutammato si lega ed apre specifici recettori ionotropi post-sinaptici, la cui iperstimolazione determina un forte influsso di ioni calcio. Il notevole incremento intracellulare di questo ione costituisce il principale segnale di morte cellulare, sia nella necrosi che nell'apoptosi (5).

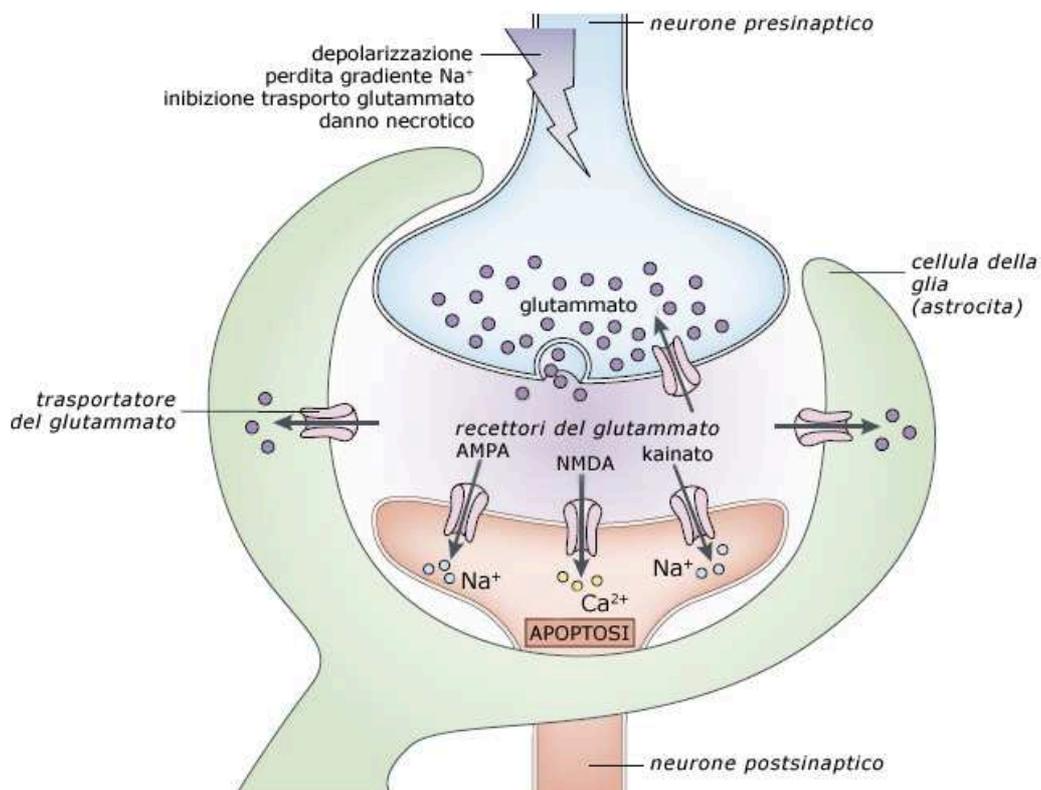


Figura 1. Meccanismi di eccitotossicità.

❖ FATTORI EZIOLOGICI

L'eziologia della degenerazione delle fibre dopaminergiche è ancora da chiarire, tuttavia dai numerosi studi sperimentali condotti sembrano essere molte le cause che non sono mutualmente esclusive, ma anzi si potenziano a vicenda in un circolo vizioso di disfunzione neuronale, atrofia ed infine, morte neuronale. È ormai accettata un'origine multifattoriale in cui interagiscono diversi fattori: ereditarietà, lesioni cerebrali, infezioni, neurotossine endogene, fattori ambientali e alterate espressioni geniche.

Studi epidemiologici mostrano una chiara correlazione tra fattori ambientali/occupazionali e l'aumento del rischio di insorgenza della malattia (6). Si possono includere l'esposizione a tossine esogene, come pesticidi (Paraquat), metalli (Al, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb) e altri xenobiotici (monossido di carbonio); lo stile di vita (dieta, fumo); l'attività professionale (lavoro agricolo). Un esempio è la sindrome simil-parkinsoniana dovuta all'esposizione sia acuta che cronica ad un pesticida ampiamente utilizzato in agricoltura, il *Rotenone*. Questo composto è un inibitore diretto del complesso I mitocondriale, ciò, com'è noto, determina una rapida caduta nei livelli di ATP, con conseguente inefficienza delle pompe Na^+ e Ca^{2+} , aumento dei livelli di Ca^{2+} citosolico ed incremento di stress ossidativo per aumentata dispersione di e^- nel complesso I (Figura 2).

Esistono inoltre tossine, come la *6-idrossidopamina*, che possono produrre una degenerazione selettiva delle fibre dopaminergiche, penetrando in esse grazie al trasportatore della dopamina e generando, in seguito al loro metabolismo, radicali liberi (Figura 2).

Una sindrome parkinsoniana fu riscontrata in tossicodipendenti che avevano fatto uso di droghe contaminate da *MPTP* (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina). L'*MPTP* viene prodotta dalla sintesi chimica di un

analogo della meperidina e produce sintomi indistinguibili dal PD. L'MPTP è una protossina che, in virtù della sua lipofilia, attraversa rapidamente la barriera emato-encefalica e viene convertita in ione MPP^+ (1-metil-4-fenilpiridinio) ad opera dell'enzima MAO-B. L' MPP^+ penetra all'interno delle terminazioni dopaminergiche sfruttando i trasportatori della dopamina e viene concentrato da un sistema attivo all'interno del mitocondrio, dove inibisce il complesso I della catena di trasporto degli elettroni (Figura 2).

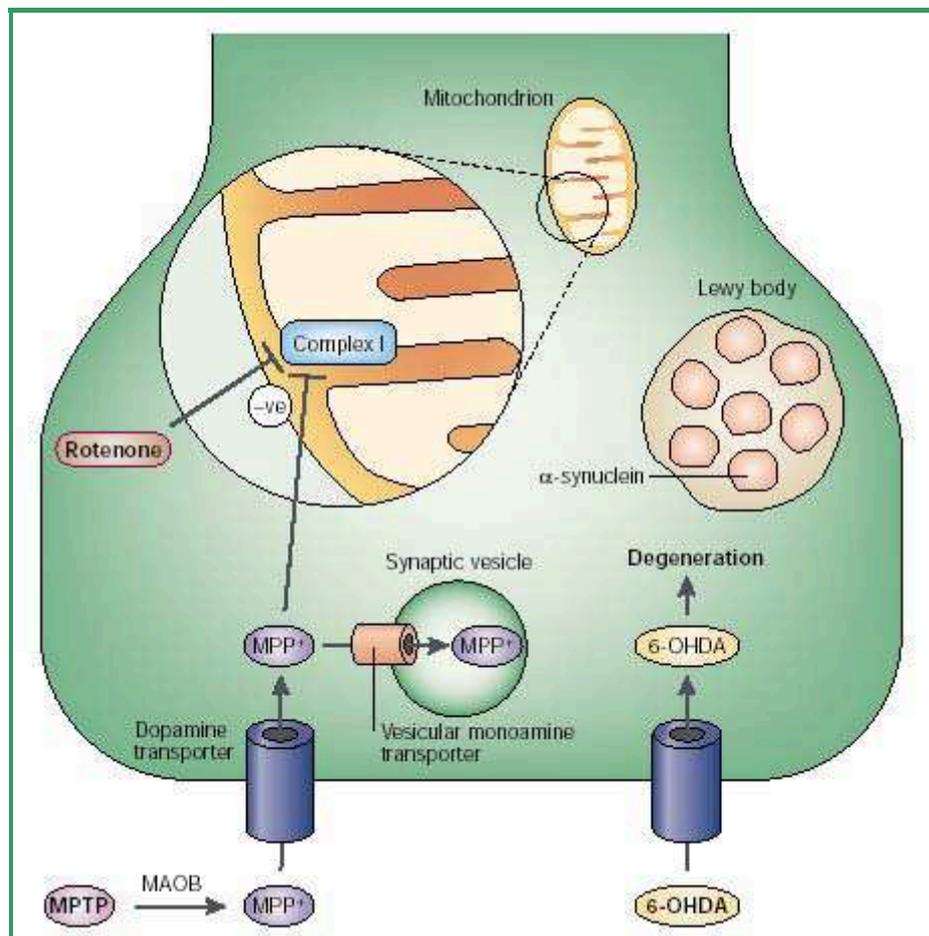


Figura 2. Disfunzione dei neuroni dopaminergici prodotta da neurotossine.

Tra le diverse concause, non si possono trascurare i *fattori genetici*. Circa il 5 – 10% dei pazienti affetti da PD soffrono di una forma familiare della malattia e mostrano un modello di ereditarietà autosomico dominante. La maggior parte dei casi di PD è sporadico, tuttavia sono state identificate famiglie con un'alta incidenza di questa patologia. Mutazioni in quattro differenti proteine possono provocare forme della malattia geneticamente determinate: l' α -sinucleina, abbondante proteina sinaptica; la parchina, idrolasi dell'ubiquitina; la UCHL1, che partecipa anch'essa alla degradazione ubiquitino-mediata di proteine cerebrali e la DJ-1, proteina ritenuta coinvolta nella risposta neuronale allo stress (7).

1.2 ASPETTI BIOLOGICI DELLA NEURODEGENERAZIONE

Le malattie neurodegenerative sono caratterizzate da una elevata morte neuronale. L'aspetto più evidente di questo gruppo di patologie è l'estrema specificità del processo patologico per particolari tipi di neuroni. L'invecchiamento incide, in generale, molto di più sui neuroni rispetto alle altre cellule dell'organismo, infatti essi mostrano un maggior accumulo di stress ossidativo, di proteine danneggiate e di lesioni al DNA. Comprendere i principali meccanismi biologici che determinano la vulnerabilità selettiva di particolari classi neuronali potrebbe rappresentare un importante bersaglio farmacologico per rallentare la progressione di queste patologie.

1.2.1 MECCANISMI DI MORTE CELLULARE

Un danno alle cellule, comprese quelle del tessuto nervoso, da parte di agenti chimici o altri stimoli tossici può innescare una complessa serie di eventi che culmina nella morte cellulare. Semplificando, si può affermare che ogni cellula al momento della morte può seguire due vie distinte: una accidentale e passiva, la *necrosi*, l'altra programmata, l'*apoptosi*. La classificazione dei due tipi di morte si basa sull'osservazione della morfologia delle cellule avviate a morte, che si presenta differente nei due casi.

La necrosi è in genere un evento accidentale, passivo, risultato di processi patologici. È caratterizzata da perdita dell'integrità di membrana, degradazione a livello degli organelli, del nucleo e del DNA, fino alla lisi

cellulare, seguita dal rilascio di componenti citoplasmatici nello spazio extracellulare, con conseguente infiammazione ed amplificazione del danno.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata, non avviene solo in seguito ad eventi patologici, ma è un meccanismo utilizzato dall'organismo per il normale sviluppo fisiologico. Ad esempio, durante lo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico, processo che prende il nome di "sinaptogenesi", molti neuroni muoiono per apoptosi. Tale evento fisiologico è probabilmente un processo adattativo che fornisce neuroni in quantità sufficiente per formare circuiti di cellule nervose, adeguati alle loro specifiche proprietà funzionali. Dal punto di vista morfologico, le cellule apoptotiche perdono contatto con le cellule circostanti e vanno incontro a condensazione e frammentazione. Gli organelli citoplasmatici si compattano, ma la caratteristica principale è la condensazione della cromatina, accompagnata da frammentazione del DNA. In seguito, frammenti di materiale nucleare vengono circondati dalla membrana plasmatica e conferiscono alla cellula un aspetto a bolle (blebbing). La membrana plasmatica, che delimita queste protuberanze, si salda e dà origine ai "corpi apoptotici". Questi ultimi si staccano dalla cellula mantenendosi integri ed in tal modo impediscono la dispersione del materiale cellulare, così il danno non viene propagato alle cellule vicine.

È importante ricordare che i due tipi di morte cellulare non si escludono a vicenda, ma possono coesistere ed essere sequenziali all'interno dello stesso tessuto.

1.2.2 APOPTOSI E MORBO DI PARKINSON

A differenza del rapido turnover delle cellule dei tessuti in proliferazione, i neuroni generalmente sopravvivono per tutta la durata della vita di un organismo. Ciò consente il mantenimento delle specifiche connessioni neuronali e di conseguenza ne garantisce la conservazione di molte delle funzioni.

Sfortunatamente, in molti individui si verifica una morte eccessiva di una o più popolazioni neuronali, in seguito ad una malattia o ad un insulto tossico. Dall'analisi di tessuti post-mortem di pazienti affetti da PD, dalla sperimentazione animale e dai test *in vitro* risulta che in questa patologia sono coinvolti meccanismi molecolari di apoptosi neuronale (8).

I fattori ambientali e genetici che scatenano l'apoptosi neuronale possono essere differenti in ambito fisiologico o patologico, ma molti degli eventi biochimici che eseguono il processo di morte cellulare sono estremamente conservati (Figura 3).

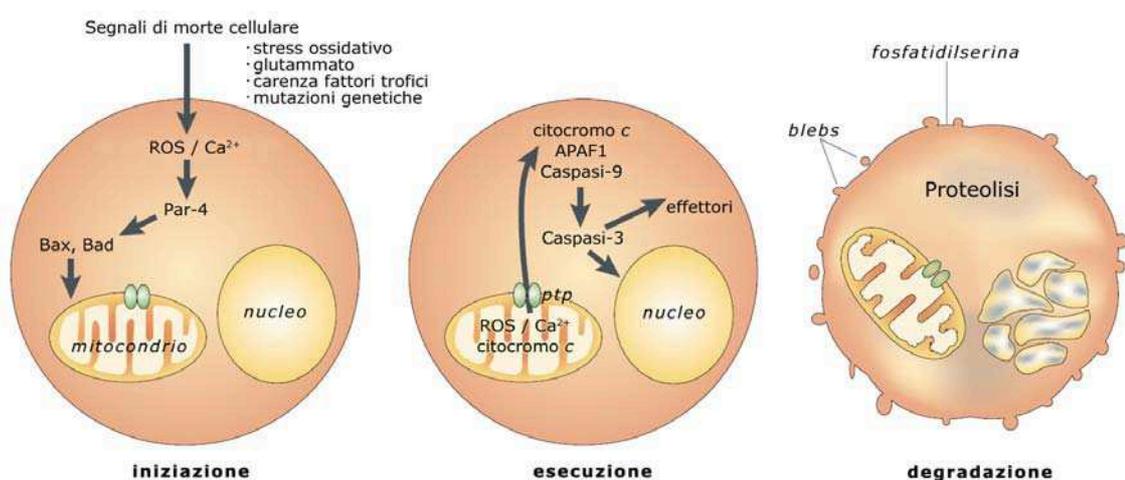


Figura 3. Principali caratteristiche biochimiche e morfologiche dell'apoptosi.

I segnali biochimici in grado di dare inizio al processo apoptotico sono molteplici, i più noti sono la carenza di fattore neurotrofico, che si pensa essere coinvolto in varie patologie degenerative, l'eccitotossicità, determinata dall'iperattivazione dei recettori per il glutammato, lo stress ossidativo, dovuto ai ROS e l'esposizione ad insulti di tipo tossico (Figura 4).

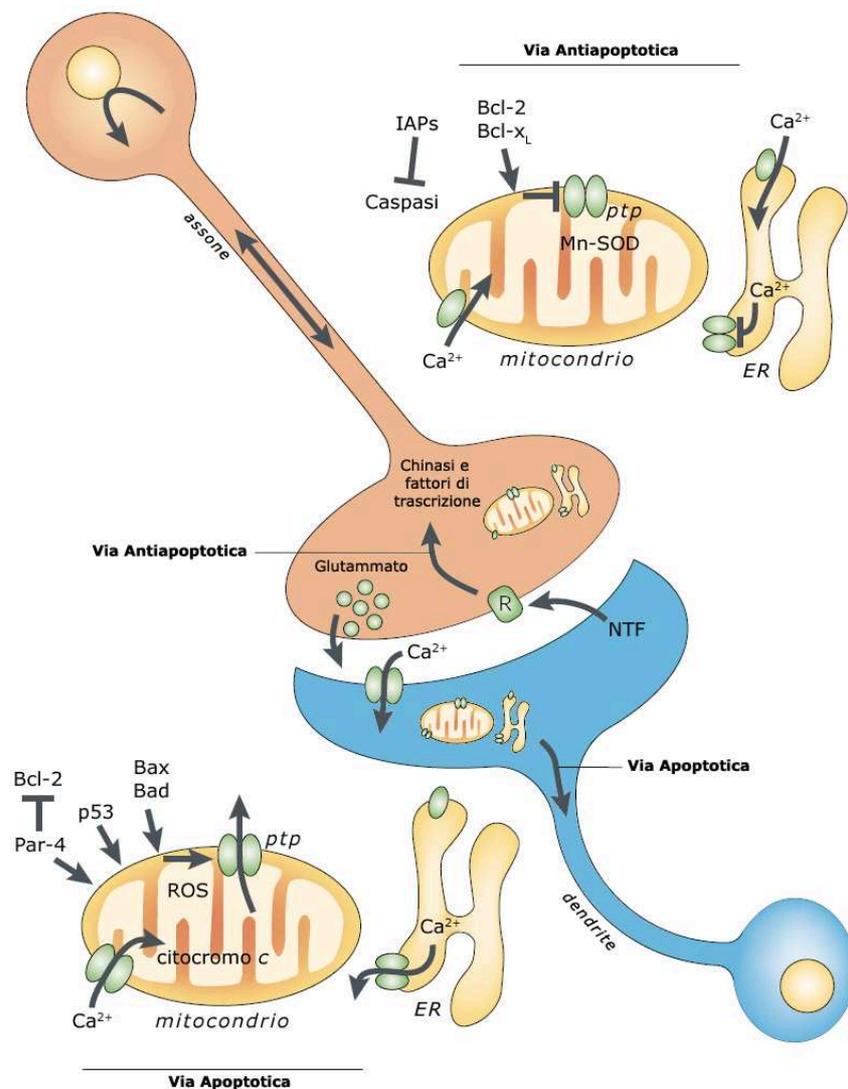


Figura 4. Rappresentazione delle principali vie metaboliche pro- ed antiapoptotiche.

Il mitocondrio svolge un ruolo di primo piano nell'esecuzione del programma di morte cellulare. Nelle cellule che entrano in apoptosi, la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno aumenta notevolmente e si assiste all'apertura di pori nella membrana mitocondriale e al rilascio nel citoplasma di citocromo c, normalmente localizzato tra la membrana esterna e quella interna.

Fondamentali in questa fase sono le proteine della famiglia Bcl-2 (*B-cell Lymphoma-2*) che comprende fattori sia pro- che antiapoptotici. Tra gli antiapoptotici i più noti sono Bcl-2 e Bcl-x_L, mentre tra i promotori ricordiamo Bax (*Bcl-2 associated X-protein*), che inattiva Bcl-2, e Bad (*Bcl-associated death promoter*) (8,9). I meccanismi tramite i quali le proteine antiapoptotiche Bcl-2 esercitano la loro funzione possono essere differenti: "scavenging" dei radicali liberi, soprattutto a livello della membrana, segregazione di componenti citoplasmatici necessari all'esecuzione dell'apoptosi o modulazione dell'apertura dei pori mitocondriali e della concentrazione di Ca²⁺.

Un altro importante fattore di regolazione dell'apoptosi è il gene che codifica per la proteina p53, in particolare nel caso di danno al DNA. La proteina, infatti, arresta il ciclo cellulare in fase G1, consentendo, se possibile, la riparazione del danno; in caso contrario, promuove la rimozione della cellula tramite apoptosi. Si ritiene che p53 operi come fattore di trascrizione stimolando la produzione e l'accumulo di Bax, agente proapoptotico della famiglia Bcl-2.

I veri fattori di esecuzione del programma apoptotico sono, però, le caspasi (*Cysteinil Aspartate-specific Proteases*), una famiglia di proteasi, presenti nel citoplasma sottoforma di zimogeni ed attivate durante l'apoptosi. Le caspasi umane sono piuttosto numerose e si dividono in iniziatrici (caspasi-2, -8, -9 e -10) ed effettrici (-3, -6 e -7). L'attivazione di

questi enzimi è autocatalitica ed avviene tramite un meccanismo a cascata. L'attivazione di una caspasi iniziatrice richiede la presenza di un complesso, detto apoptosoma, dove il citocromo *c* e il fattore APAF1 si legano alla caspasi-9 (oppure -12), iniziando la catena di eventi che poi porteranno alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi, quali il *blebbing* della membrana e la frammentazione del DNA. Tale frammentazione è operata da una DNasi, la cui attivazione è dipendente da quella delle caspasi (5).

1.2.3 RUOLO DELLO STRESS OSSIDATIVO NEL MORBO DI PARKINSON

Il cervello umano costituisce appena il 2% del peso corporeo, ma consuma una quantità di ossigeno di gran lunga superiore a quella di tutti gli altri organi (circa il 20% della quantità disponibile) (10).

L'elevata attività metabolica cerebrale, unita alla ridotta capacità di rigenerazione cellulare e all'inferiore concentrazione di catalasi, glutatione perossidasi e tocoferoli, rende le strutture del Sistema Nervoso Centrale (SNC) particolarmente suscettibili ad un danno di tipo ossidativo. L'ossigeno assume quindi il duplice ruolo di elemento di vitale importanza e di potenziale causa di tossicità. Il danno di tipo ossidativo è da considerarsi come conseguenza di un'alterazione del bilancio dell'attività pro-ossidante ed antiossidante cellulare (Figura 5b).

I neuroni dopaminergici sono particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo, dal momento che la dopamina (DA) viene metabolizzata in perossido di idrogeno (H_2O_2) e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS),

come il radicale superossido ($O_2^{\cdot-}$), il radicale ossidrile (OH^{\cdot}) e l'ossigeno singoletto (1O_2) (Figura 5a).

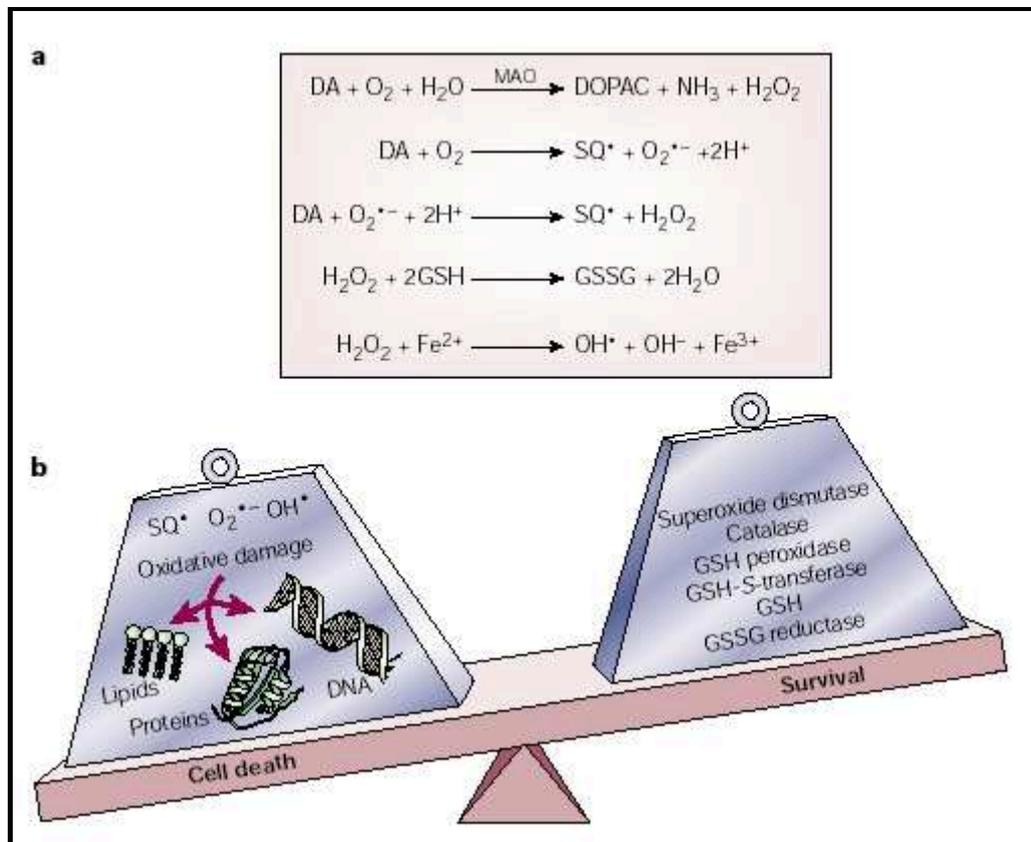


Figura 5. a) Metabolismo della dopamina e formazione di ROS. b) Alterazione sistemi antiossidanti e pro-ossidanti cellulari.

Nei neuroni la DA può essere metabolizzata in due modi distinti:

- dalla MAO nel metabolita non tossico 3,4-diidrossifenilacetaldeide (DOPAC) e H_2O_2 ;
- per auto-ossidazione non enzimatica in radicale semichinone (SQ).

Nonostante vi siano numerose sedi di formazione dei ROS all'interno della cellula, sembra che i mitocondri ne siano la sede principale, infatti circa l'1-2% dell'ossigeno metabolizzato viene convertito in $O_2^{\cdot-}$ da diversi siti nella catena respiratoria e nella matrice mitocondriale. I ROS, a causa

della loro elevata reattività chimica, possono danneggiare proteine, lipidi e DNA. Le proteine vengono modificate covalentemente nei loro residui reattivi, quali i tioli (SH) cisteinici o gli ossidrili aromatici; nel DNA si possono verificare rotture di una catena nucleotidica; mentre i lipidi vengono ossidati prevalentemente a livello dei doppi legami degli acidi grassi polinsaturi, di cui è particolarmente ricco il tessuto cerebrale. Questa reazione, detta di perossidazione lipidica, procede a catena con formazione di ponti perossidici tra i fosfolipidi e comporta l'alterazione delle proprietà di membrana, non solo di quella plasmatica ma anche di quella degli organelli cellulari, come il mitocondrio.

Normalmente i ROS sono eliminati dai sistemi antiossidanti cellulari, come la glutazione perossidasi, la catalasi e la superossido dismutasi (SOD); tuttavia, tali meccanismi possono essere danneggiati a causa dei processi di invecchiamento o a causa di patologie. I tessuti cerebrali post mortem di pazienti affetti da PD mostrano una diminuzione di attività di catalasi e glutazione perossidasi all'interno delle specifiche aree coinvolte nella neurodegenerazione selettiva. Lo stress ossidativo, che si viene a generare in seguito alla riduzione delle difese antiossidanti cellulari, non solo potrebbe risultare come danno accidentale per le cellule, ma potrebbe far innescare un segnale intracellulare che condurrebbe alla morte. In particolare, lo stress ossidativo potrebbe essere coinvolto nell'aberrante regolazione del calcio intracellulare, ampiamente osservata nel PD, che stimolerebbe una moltitudine di processi riconducibili alla cascata apoptotica (11).

Una caratteristica biochimica comune dei neuroni della SNpc è l'accumulo di neuromelanina (NM), un pigmento scuro capace di legare ioni metallici, in particolar modo il ferro. Si pensa che la sua funzione principale sia quella di proteggere le cellule dalla tossicità associata alle

reazioni chimiche indotte dalla dopamina (DA). Quest'ultima è una catecolamina, pertanto in grado di donare elettroni e quindi ridurre lo stato di ossidazione dei metalli. La DA necessaria per la trasmissione neuronale è mantenuta chimicamente inerte all'interno di vescicole; quando essa viene rilasciata nel citoplasma coordina ioni ferro e partecipa a reazioni redox che portano alla formazione di NM. Nei soggetti parkinsoniani è stata accertata una riduzione della pigmentazione caratteristica, ovvero una minore concentrazione di NM. Inoltre, in presenza di bassi livelli di Fe, la NM ha proprietà antiossidanti, mentre se la concentrazione di Fe è elevata, come riscontrato nel tessuto cerebrale in seguito ad un normale processo di invecchiamento, la NM è pro-ossidante. Lo stress ossidativo associato al PD potrebbe essere il risultato di anomalie nella regolazione di questi processi, a cui prendono parte la DA, la NM e il Fe (11).

1.2.4 TRASDUZIONE DEL SEGNALE NELLA MORTE NEURONALE

La sopravvivenza neuronale viene mantenuta da una complessa ed interconnessa rete di segnali che possono essere attivati in risposta a molteplici stimoli cellulari. Uno squilibrio nella regolazione delle vie di trasduzione del segnale può determinare drastiche conseguenze nella funzione o nel destino dei neuroni.

In che modo i neuroni vanno incontro a morte? Una risposta a questa domanda è stata fornita dalle ricerche condotte da Levi-Montalcini, che hanno dimostrato l'importanza di *fattori neutrofici* per la sopravvivenza neuronale. La morte dei neuroni, contrariamente a quanto si pensava in

passato, è un fenomeno che si verifica normalmente durante lo sviluppo embrionale; le cellule bersaglio dei neuroni in via di sviluppo producono una limitata quantità di un fattore nutritivo o trofico che viene assunto dalle terminazioni nervose ed ha la proprietà di promuovere la sopravvivenza neuronale. La classe dei fattori trofici più studiata è quella delle neurotrofine (NT). Queste proteine secrete dalle cellule sono implicate sia nell'organizzazione del sistema nervoso nelle prime fasi del suo sviluppo, sia nelle fasi successive per il controllo della sopravvivenza neuronale. Attualmente, le NT sono al centro di molti studi volti a comprendere non solo il ruolo fisiologico di queste molecole, ma anche il loro possibile coinvolgimento nella patogenesi di alcune malattie che colpiscono il sistema nervoso e che sono caratterizzate dalla morte di specifiche popolazioni neuronali. Tra queste ritroviamo malattie neurodegenerative come la AD e il PD (12).

Le NT mediano la sopravvivenza, il differenziamento, la crescita e l'apoptosi neuronale attraverso il legame con due specifici recettori: **Trk**, recettore appartenente alla famiglia di recettori tirosin-chinasici e **p75**, membro della superfamiglia di recettori per il fattore di necrosi tumorale (TNF).

I principali recettori di traduzione del segnale sono costituiti da una famiglia di tre tirosin-chinasi intrinseche alla membrana cellulare denominate TrkA, TrkB e TrkC, ciascuna delle quali esiste sottoforma di dimero. Al pari di quanto accade negli altri recettori ad attività tirosin-chinasica, l'attivazione dei recettori Trk dipende dalle loro dimerizzazione, processo che prende inizio con il legame con la NT. La fosforilazione del dominio citoplasmatico dei recettori Trk recluta specifiche molecole che fungono da segnale all'interno del neurone, la maggior parte delle quali ha come bersaglio altri recettori tirosin-chinasici (Figura 6).

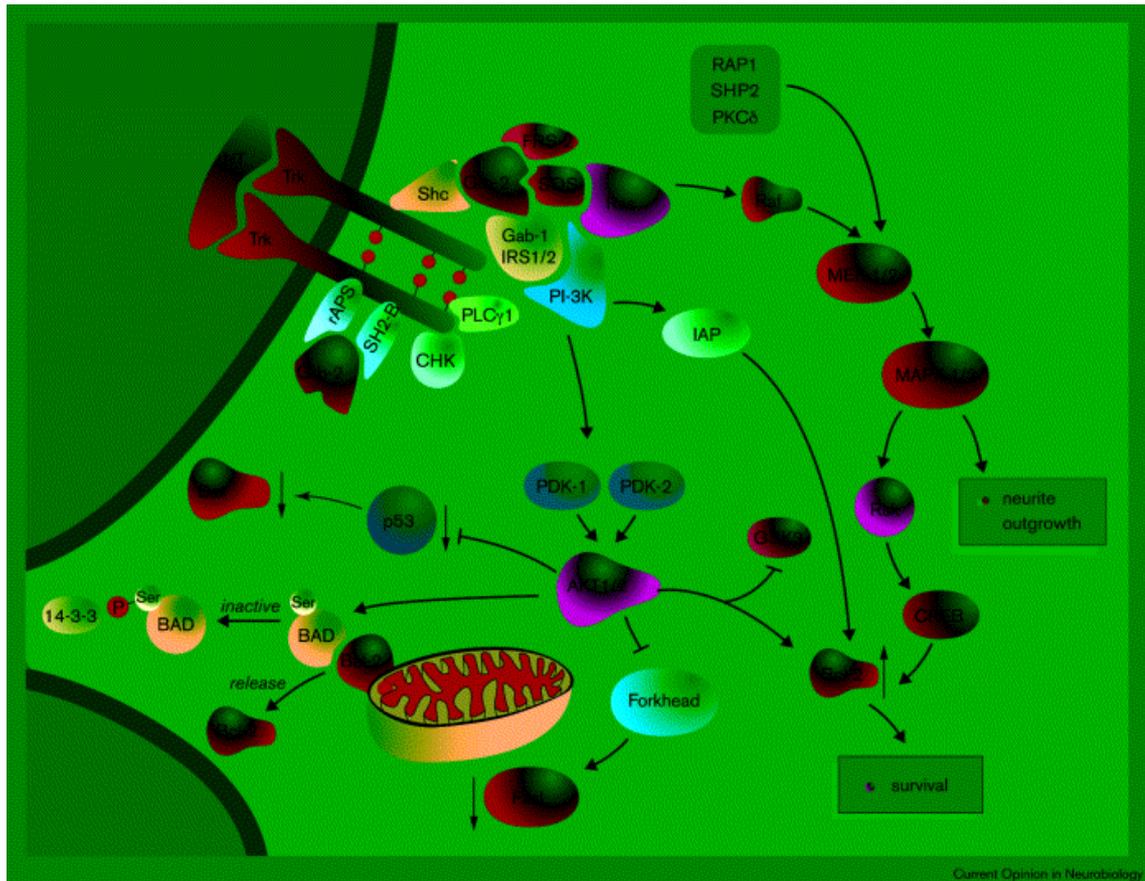


Figura 6. Principali vie di trasduzione del segnale attivate dal legame NT e recettore Trk.

Due delle principali vie regolate dai recettori Trk sono la PI3K/Akt (fosfatidilinositolo-3-OH-chinasi) e la MAPK/ERK (proteine-chinasi attivate da mitogeni).

❖ PI3K/AKT

La via PI3K/Akt rappresenta uno dei principali meccanismi coinvolti nella sopravvivenza neuronale. La proteina PI3K è normalmente presente nel citoplasma e può essere attivata per via diretta attraverso il recettore Trk, o per via indiretta mediante la proteina Ras. PI3K catalizza la formazione di PIP₃ (fosfatidilinositolo 3,4,5-trifosfato) e PIP₂

(fosfatidilinositolo 3,4-bifosfato), entrambi necessari per l'attivazione di un componente chiave per la sopravvivenza cellulare, la serina/treonina chinasi Akt (13). La proteina Akt controlla importanti funzioni cellulari, come la sopravvivenza/apoptosi, la proliferazione cellulare ed il metabolismo del glucosio. Essa viene attivata in risposta a differenti stimoli cellulari, compresi fattori di crescita, ormoni e stress extracellulari. Un passaggio critico per la sua attivazione è la traslocazione dal citoplasma alla superficie interna della membrana plasmatica, in modo tale da rendere disponibili i due residui Thr³⁰⁸ e Ser⁴⁷³ per la fosforilazione, mediata da varie chinasi a monte di questa via di traduzione del segnale.

Un target dell'Akt è la proteina Bad, un membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2, che nella sua forma non fosforilata può legare la proteina Bcl-x_L ed indurre apoptosi (Figura 7). L'attivazione di Akt determina la fosforilazione di Bad nel residuo Ser¹³⁶ e promuove la sua associazione con la proteina 14-3-3. In questo modo Bad rimane sequestrata a livello citoplasmatico e viene inibita la sua azione pro-apoptotica (13-15).

Un altro substrato dell'Akt è la pro-caspasi-9, che com'è noto, è la forma inattiva di uno dei principali esecutori del programma apoptotico (Figura 7). La caspasi-9, in presenza del citocromo c e del fattore APAF1, dà inizio alla catena di eventi che porteranno alla comparsa dei segni morfologici dell'apoptosi. L'Akt blocca il programma di morte cellulare inibendo la proteolisi e di conseguenza l'attivazione della pro-caspasi-9 (14).

Un'altra importante famiglia di proteine fosforilate dall'Akt sono i fattori di trascrizione della *Forkhead box* classe O (FOXO) (Figura 7). Quando l'Akt è inattiva, i fattori FOXO sono localizzati nel nucleo e attivano la trascrizione di geni necessari per l'induzione del programma apoptotico. Al contrario, quando l'Akt è attiva e fosforila i siti regolatori

dei fattori FOXO, promuove il loro spostamento dal nucleo al citoplasma, allontanandoli dai geni bersaglio (15).

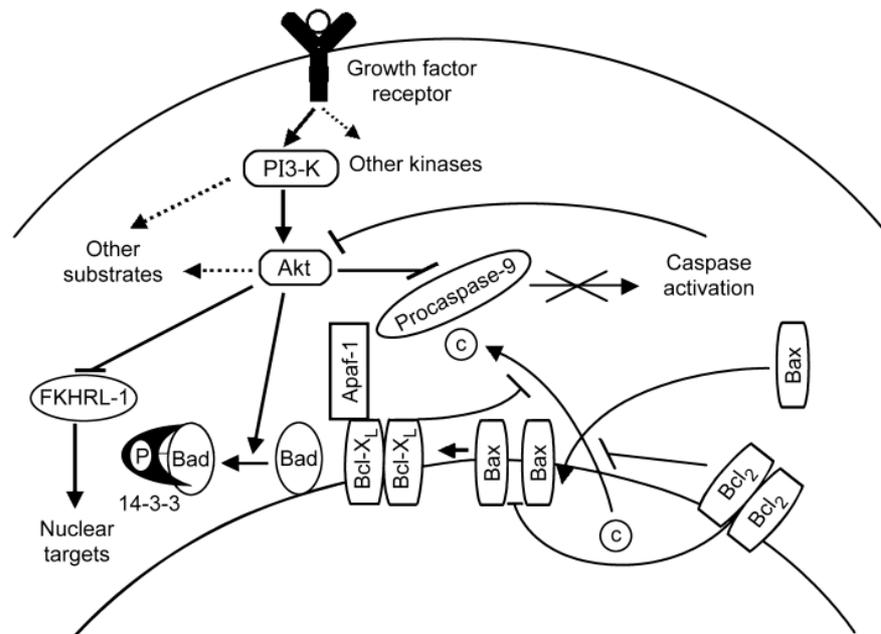


Figura 7. Ruolo della via PI3K/Akt nella sopravvivenza cellulare.

❖ MAPK/ERK

La via delle MAPK è uno dei sistemi più studiati di traduzione del segnale, dal momento che riveste un ruolo centrale in processi cellulari importanti, come la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza e la morte cellulare. Le MAPK sono altamente conservate in tutti gli eucarioti e mediano risposte che consistono nella fosforilazione di proteine target citoplasmatiche o nucleari e nell'attivazione di fattori di trascrizione, modulando di conseguenza l'espressione genica (16). Queste chinasi sono esse stesse delle fosfoproteine ed hanno la caratteristica di venire fosforilate su due residui, uno di treonina e uno di tirosina, separati tra loro da un singolo aminoacido. Per una piena attività dell'enzima, entrambi i

residui devono venire fosforilati. Le MAPK sono attivate da un meccanismo a cascata, in cui ogni chinasi rappresenta il substrato specifico per la successiva, e sono solitamente organizzate in una struttura di tre chinasi, consistenti nella MAPK, nella chinasi della MAPK o MEK e nella chinasi della MEK o MAPK chinasi chinasi.

Si conoscono almeno tre classi di MAPK, che, a loro volta, possono esistere in diverse isoforme: le ERK 1/2 (extracellular signal regulated kinase), le JNK (c-Jun amino-terminal kinase) e le chinasi p38. In generale, si ritiene che le ERK siano coinvolte nella sopravvivenza cellulare, mentre JNK e p38 siano legate a processi apoptotici. Si tratta comunque di una semplificazione del loro ruolo, in quanto la loro attivazione e funzione dipende dal tipo di cellula, dal grado di maturazione della cellula e dal contesto della stimolazione.

Una delle vie più studiate e meglio caratterizzate è rappresentata da ERK. La cascata delle ERK viene attivata da un ampio numero di stimoli extracellulari e da vari processi intracellulari e partecipa all'induzione di processi come la proliferazione, il differenziamento, lo sviluppo e in certe condizioni, alla sopravvivenza cellulare, all'apoptosi e alla trasformazione oncogenica. La via delle ERK viene innescata dall'attivazione di una piccola proteina G, la proteina Ras, che trasmette il segnale trasportando sulla membrana una serin-treonin chinasi, Raf. La proteina Raf, a sua volta, fosforila le MEKK ed innesca così la cascata delle MAPK (17) (Figura 8).

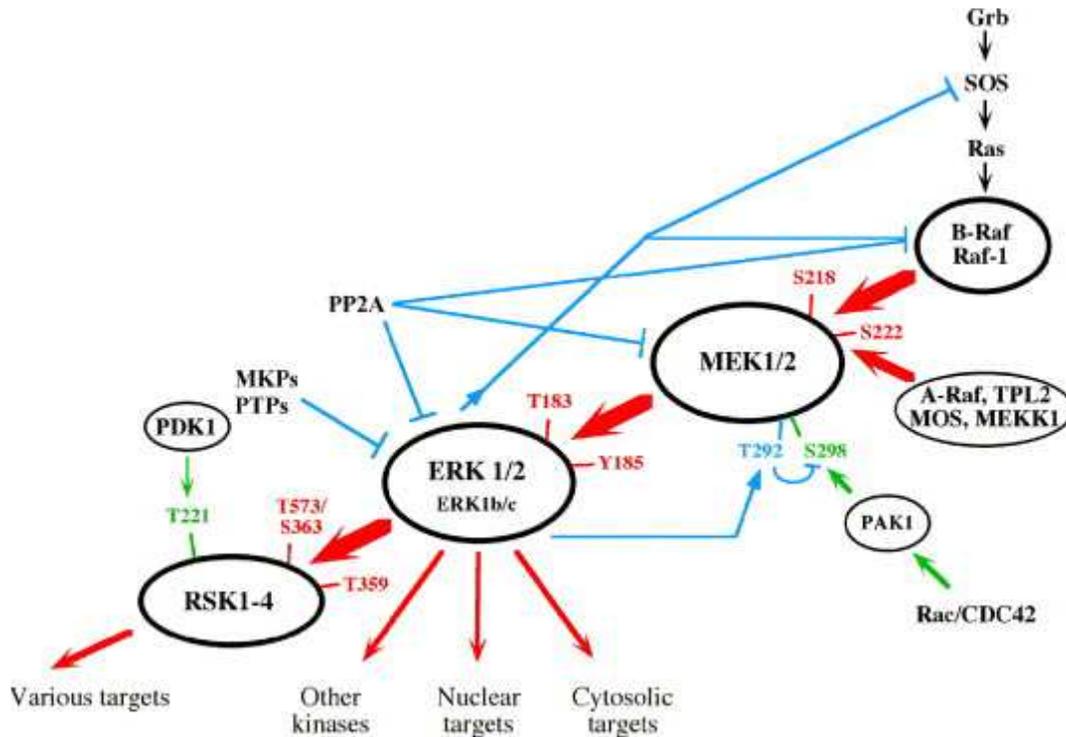


Figura 8. Attivazione della cascata delle ERK.

L'attivazione di ERK comporta la fosforilazione di un'ampia gamma di potenziali target nel citosol e nel nucleo. ERK può attivare fattori di trascrizione (Elk-1, Sap-1 e Tal) e fosforilare specifiche chinasi effettrici, come la chinasi 1 attivata da stress o da mitogeni (MSK1) o la S6 chinasi ribosomiale pp90 (RSK) (16). Come Akt anche RSK è in grado a sua volta di fosforilare la proteina Bad (fattore pro-apoptotico) e di conseguenza inibire la sua attività pro-apoptotica. L'effetto di RSK sulla sopravvivenza neuronale non è limitato solamente alla fosforilazione di Bad; RSK e MSK1 sono potenti attivatori del fattore di trascrizione CREB. Quest'ultimo è un fattore di trascrizione per la proteina Bcl-2 (fattore anti-apoptotico) e, quindi, un fattore essenziale per la sopravvivenza cellulare.

1.3 MODELLI SPERIMENTALI NELLO STUDIO DEL MORBO DI PARKINSON

Nonostante siano trascorsi quasi 50 anni da quando il deficit nigrostriatale di dopamina venne identificato come l'alterazione neurochimica peculiare del PD, l'eziologia di questa malattia presenta ancora degli aspetti da chiarire e risulta difficile lo sviluppo di un modello sperimentale per studiare la patologia.

1.3.1 MODELLI *IN VITRO*

I modelli sperimentali *in vitro* di PD hanno permesso la caratterizzazione dei probabili meccanismi cellulari coinvolti nella sviluppo della patologia. La maggior parte degli studi *in vitro* sfrutta neurotossine specifiche come l'MPP⁺ e la 6-OHDA. Tali composti non possono essere somministrati per via sistemica in modelli animali, data l'impossibilità di oltrepassare la barriera emato-encefalica, ma risultano molto utili negli studi condotti su colture neuronali. Colture primarie di neuroni mesencefalici ottenuti da feti di ratto e linee cellulari derivanti da neuroni dopaminergici (SH-SY5Y umane e PC12 murine) sono le cellule maggiormente utilizzate per lo studio dei meccanismi coinvolti nella degenerazione dei neuroni dopaminergici e per lo screening di nuovi agenti farmacologici. È possibile, inoltre, modificare geneticamente le cellule mediante la transfezione di specifici geni di interesse ed in questo modo si possono analizzare conseguenze strutturali, biochimiche e funzionali dell'espressione di geni a livello delle singole cellule. Nello studio del PD sono stati sviluppati diversi sistemi cellulari per valutare le conseguenze dell'espressione *in vitro* dell' α -sinucleina e della parkina.

I modelli di PD che utilizzano le colture cellulari offrono il vantaggio di una semplice reperibilità, una elevata riproducibilità e la possibilità di studiare meccanismi a livello cellulare e molecolare; i tempi sperimentali sono notevolmente ridotti e ciò permette lo screening di un gran numero di potenziali agenti neuroprotettivi. Tuttavia nei modelli *in vitro* è difficile mimare le complesse interazioni che avvengono *in vivo* tra le diverse tipologie cellulari.

1.3.2 MODELLI *IN VIVO*

Per definizione un modello animale dovrebbe riuscire a riprodurre le diverse caratteristiche della patologia umana, nel caso particolare del PD sono diverse le peculiarità richieste per una diretta corrispondenza con ciò che accade nell'uomo. È necessario, ad esempio, che i neuroni dopaminergici siano normali alla nascita e subiscano una selettiva e graduale perdita nel corso dell'invecchiamento dell'animale. Il modello animale dovrebbe possedere i deficit motori che rappresentano i sintomi tipici del PD, quali bradicinesia, rigidità e tremore a riposo. Inoltre, esso dovrebbe mostrare lo sviluppo intracellulare dei caratteristici corpi di Lewy. Se si dovesse trattare di un modello genetico, dovrebbe essere basato su una singola mutazione in modo tale da facilitare la trasmissione. In ultimo, il modello dovrebbe svilupparsi in breve tempo, in generale pochi mesi, dimostrandosi così un rapido ed economico screening per agenti terapeutici (18).

Sulla base delle tecniche impiegate per riprodurre le alterazioni anatomo-patologiche tipiche della malattia, i modelli animali di PD si possono dividere fondamentalmente in due categorie: farmacologici e transgenici. I modelli farmacologici sono di gran lunga quelli più utilizzati,

essi cercano di riprodurre la lesione tipica del PD, la degenerazione dei neuroni dopaminergici della SNpc, indotta dalla somministrazione di neurotossine specifiche per via sistemica o locale. La maggior parte di questi modelli impiega roditori, fondamentalmente per ragioni di costi.

❖ **MODELLI FARMACOLOGICI**

- **6-IDROSSIDOPAMINA**

La 6-idrossidopamina (6-OHDA) è il primo agente impiegato in un modello di PD ed è in assoluto il più utilizzato. La 6-OHDA è una neurotossina specifica per i neuroni dopaminergici che si accumula selettivamente in essi e ne causa la morte attraverso l'induzione di stress ossidativo ed apoptosi (19). La 6-OHDA viene infusa per via stereotassica nella SNpc o nel fascicolo che contiene le proiezioni nigro-striatali, causando un rapido e quasi completo depauperamento dei neuroni dopaminergici. Per ottenere una lesione di entità minore e con un tempo maggiore per istaurarsi, la tossina può essere infusa nel corpo striato, cioè a livello delle terminazioni nigro-striatali. Il danno in questo modo avviene per via retrograda e l'evoluzione graduale della lesione permette di valutare l'efficacia di trattamenti volti a contrastare il danno ossidativo.

Il modello della 6-OHDA non consente di osservare nella SN i caratteristici corpi di Lewy e spesso si creano lesioni aspecifiche in altre popolazioni neuronali, tuttavia gli animali mostrano interessanti deficit motori facilmente quantificabili.

- **ROTENONE**

Un modello sperimentale si basa sulla somministrazione cronica, attraverso minipompe osmotiche sottocutanee, di rotenone, un pesticida organico ampiamente utilizzato in agricoltura, noto per essere uno dei più potenti inibitori del complesso I mitocondriale. Il rationale del suo impiego deriva dalla nozione ormai consolidata, che i neuroni della SN dei parkinsoniani presentano un deficit del complesso I e dal ruolo potenziale che l'esposizione prolungata ad alcuni tossici ambientali avrebbe nell'insorgenza della malattia (20). La somministrazione determina degenerazione dei neuroni nigrostriatali, con perdita di tirosina idrossilasi e dei trasportatori della DA. Molto interessante è la comparsa di inclusioni citoplasmatiche nei neuroni nigrali, assimilabili ai corpi di Lewy per la presenza di α -sinucleina, ubiquitina e per le caratteristiche ultra-strutturali (21). I ratti trattati mostrano bradicinesia, instabilità posturale, andamento instabile e alcuni segni di tremore. L'introduzione di questo modello sperimentale ha creato grande interesse, ma anche reazioni critiche soprattutto per quanto riguarda la selettività dell'azione tossica. L'esposizione cronica a rotenone, infatti, può provocare una lieve, ma sistemica inibizione del complesso I (22).

- **MPTP**

Uno dei modelli maggiormente caratterizzati utilizza una neurotossina, l'MPTP, scoperta casualmente negli anni '80 quando diversi tossicodipendenti californiani hanno iniziato a manifestare una severa forma di PD. L'MPTP è un potente e irreversibile inibitore del complesso I mitocondriale. Esso è una protossina e viene trasformato nel suo

metabolita attivo (MPP⁺) ad opera delle MAO-B. L'MPTP viene somministrato per via sistemica nel topo e nei primati, mentre i ratti non risultano sensibili alla tossina, probabilmente per una ridotta attività cerebrale delle MAO-B. La tossicità dell'MPTP nei primati rispecchia tutte le caratteristiche cliniche del PD: tremore, rigidità, acinesia ed instabilità posturale. L'unica differenza con la patologia umana è la mancata formazione dei corpi di Lewy.

❖ MODELLI TRANSGENICI

Un'ulteriore evoluzione dei modelli sperimentali di PD si è avuta con l'introduzione dei modelli transgenici, che in generale si basano sull'induzione dell'espressione del gene codificante per l' α -sinucleina umana. L' α -sinucleina è una componente delle aggregazioni intracellulari (corpi di Lewy) che accompagnano la neurodegenerazione. I modelli attualmente impiegati si differenziano sostanzialmente a seconda che l'espressione del gene sia ubiquitaria oppure limitata alla SNpc (23).

Nel primo caso vengono utilizzati vettori di tipo plasmidico durante le prime fasi di sviluppo del topo, inducendo un'espressione del gene a livello sistemico. Ciò determina un accumulo intra-neuronale di inclusioni citoplasmatiche in varie aree cerebrali e deficit motori, non necessariamente associati a mancata funzionalità nigro-striatale. Per ottenere una maggiore specificità delle alterazioni, è stato introdotto un promoter del gene per la tirosina-idrossilasi, in modo da favorire un'espressione del gene per l' α -sinucleina nei neuroni dopaminergici della SNpc. Tuttavia, anche in questo caso non si osservano fenomeni degenerativi a carico dei neuroni nigrali.

Nel secondo modello l'espressione di α -sinucleina viene indotta selettivamente nella SNpc del topo adulto, mediante infusione diretta di vettori adenovirali, contenenti nella loro singola elica di DNA il gene di interesse. In questo caso le lesioni sono più evidenti e specifiche, in ragione della selettività anatomica e della maggiore quantità di espressione transgenica di α -sinucleina ottenibile con questa tecnica.

Sebbene non sia stato ancora convalidato un modello animale di PD, il loro impiego continua a fornire informazioni preziose sia per la comprensione della fisiopatologia della malattia che per la valutazione di nuovi approcci terapeutici. Le ricerche condotte su modelli animali hanno permesso di chiarire ulteriormente alcuni dei processi intrinseci della degenerazione nigrostriatale, ad esempio definendo il ruolo potenziale che i proteasomi (complessi proteasici multicatalitici) potrebbero avere nella formazione delle inclusioni citoplasmatiche. Modelli recenti di PD prevedono l'impiego di sostanze in grado di bloccare l'attività proteasomica, come l'*epossimicina* (24), e che di conseguenza determinano degenerazione nigrostriatale e formazione di inclusioni citoplasmatiche positive per l' α -sinucleina.

I modelli animali di PD, quindi, rappresentano un terreno di sperimentazione di enorme valore traslazionale, per le possibili ricadute nel campo delle innovazioni terapeutiche, in particolare nello sviluppo di terapie neuroprotettive, ossia in grado di bloccare la progressione del danno e promuovere un recupero funzionale dei nuclei della base.

1.4 STRATEGIE DI NEUROPROTEZIONE

La necessità di sviluppare metodi di prevenzione o di riduzione del rischio delle malattie neurodegenerative è certamente l'obiettivo principale che la ricerca in campo neurologico deve conseguire. Per **neuroprotezione** si intende un intervento atto a proteggere i neuroni dai processi neurodegenerativi, tramite l'utilizzo di sostanze che arrestino o rallentino la morte cellulare (25). Ad oggi, le terapie disponibili per le patologie neurodegenerative sono di tipo sintomatico o, nel migliore dei casi, hanno la capacità di rallentarne l'inevitabile decorso.

L'unica strategia efficace disponibile è quella preventiva che può essere esercitata a tre livelli differenti:

- primario: consiste nell'eliminazione dei fattori di rischio; nel caso delle demenze, fanno parte delle strategie di prevenzione primaria tutte le iniziative volte a ridurre elementi di rischio quali fumo, iperlipidemie o screening per i soggetti che presentano probabilità su base genetica di sviluppare demenza.
- secondario: consta nell'individuazione precoce della malattia, quando ancora è asintomatica. Questo tipo di prevenzione necessita di un elevato grado di affidabilità delle tecniche diagnostiche e offre risultati solo nel caso in cui siano disponibili strategie terapeutiche efficaci.
- terziario: consiste nel rallentamento del decorso clinico della patologia, una volta diagnosticata, o nella riabilitazione dopo la fase clinica acuta.

È stato ampiamente dimostrato che molteplici meccanismi biochimici, quali l'eccitotossicità mediata dal glutammato, la formazione di ROS, l'infiammazione, la proteolisi attivata dal calcio e l'apoptosi contribuiscono

alla fisiopatologia delle malattie neurodegenerative. Sulla base delle evidenze esistenti, è ormai confermato che una combinazione di trattamenti o, in alternativa, un singolo agente con molteplici bersagli farmacologici possono offrire una maggiore protezione rispetto ad una terapia con un singolo target.

L'attenzione dei ricercatori è sempre più focalizzata sul ruolo che alcuni componenti presenti negli alimenti di largo consumo possono giocare nell'alleviare il deficit neuronale associato con l'età e le sue conseguenti manifestazioni comportamentali (26).

Studi epidemiologici indicano, infatti, che le abitudini alimentari possono influenzare l'incidenza di disordini neurodegenerativi, inclusi AD e PD. D'altra parte, la relazione tra nutrizione e demenze è già stata messa in evidenza da tempo. Carenze nutrizionali, in particolare di fattori metabolici e vitaminici, si possono accompagnare a modificazioni delle funzioni cognitive o addirittura determinare un quadro di vera e propria demenza.

È stato descritto come il cervello, a causa del largo consumo di ossigeno, è particolarmente vulnerabile al danno ossidativo indotto dai radicali liberi, normali prodotti del metabolismo cellulare. Una caratteristica comune alle varie forme di patologie neurodegenerative risulta, pertanto, l'associazione con lo stress ossidativo. Un possibile approccio, teso a ridurre la probabilità di sviluppo di queste malattie, consiste proprio nella diminuzione dello stress ossidativo (27). Un ampio numero di studi dimostra come i micronutrienti presenti nella dieta, specialmente la vitamina E (α -tocoferolo), la vitamina C (acido ascorbico), i carotenoidi, i flavonoidi ed i polifenoli, sono in grado di bloccare la morte neuronale *in vitro* e in modelli animali di malattie neurodegenerative, come AD, PD e la Sclerosi Laterale Amiotrofica (ALS) (28). Attualmente, si

cerca di migliorare la conoscenza dei meccanismi attraverso i quali queste sostanze possano esplicare la loro azione, in particolare per quanto riguarda le potenziali associazioni con la trasmissione nervosa e/o la funzione recettoriale, i possibili effetti immunomodulatori e le alterazioni dello stato antiossidante del cervello (26). Molte sostanze di origine vegetale si sono dimostrate attive nel diminuire il rischio di sviluppare patologie croniche, tra questi è possibile ascrivere gli isotiocianati presenti nelle *Cruciferae*, le catechine nel tè verde, il resveratrolo nell'uva, gli isoflavoni nella soia e le procianidine in vari frutti rossi.

1.4.1 GLUCOSINOLATI E DERIVATI

I glucosinolati (GLS) sono un'importante classe di composti presenti nei vegetali della famiglia delle *Cruciferae*, del genere *Brassica*, a cui appartengono specie come cavolfiore, broccoli e cavoletti di Bruxelles.

I GLS, dal punto di vista chimico, presentano una regione tioglucosidica, un'ossima sulfonata ed una catena laterale aminoacidica, derivante in particolare da metionina, fenilalanina o triptofano (Figura 9).

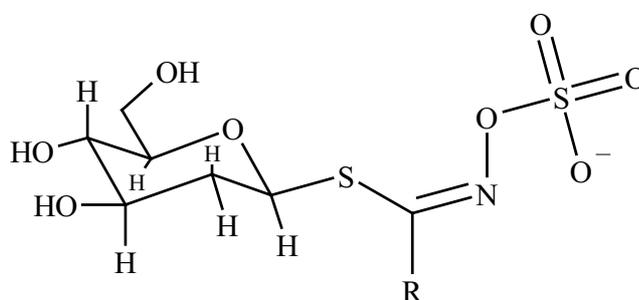


Figura 9. Struttura chimica dei glucosinolati.

I GLS sono generalmente presenti in tutte le parti della pianta, ma con differenze sia qualitative che quantitative, ad esempio nei fiori e nei semi la quantità totale può essere 10 volte superiore a quella rilevata negli altri tessuti e costituire anche il 10% del totale (29).

Essi sono normalmente sequestrati sottoforma di sali di potassio nei vacuoli della pianta e non hanno attività biologica. La masticazione ed i processi che portano alla distruzione del tessuto vegetale permettono il rilascio dell'enzima mirosinasi, una tioglucoside glucoidrolasi, che idrolizza la molecola di glucosinolato, portando alla formazione di glucosio, solfato e un aglicone instabile che genera un'ampia varietà di prodotti responsabili dell'azione biologica (30).

Se la mirosinasi di origine vegetale risulta inattivata, ad esempio in seguito al processo di cottura dell'alimento, la natura ionizzata del GLS permette di raggiungere la parte terminale del tubo digerente, dove può essere metabolizzato da enzimi ad attività mirosinasi-simile di origine batterica presenti *in situ*. Grazie alla lipofilia, al peso molecolare relativamente basso e alle ridotte dimensioni, i prodotti di idrolisi dei glucosinolati presentano un alto coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua ($\log P$), che favorisce il loro assorbimento intestinale per diffusione passiva.

Tra i prodotti più interessanti derivati dalla degradazione enzimatica dei glucosinolati troviamo la classe degli isotiocianati (ITC), il cui componente Sulforafane (SUL) ha attirato l'attenzione della ricerca per le sue proprietà biologiche. Il SUL deriva dal glucosinolato più abbondante nei broccoli, la glucorafanina che, sottoposta all'azione della mirosinasi produce un intermedio solforato, che origina, infine, Sulforafane [4-(metilsulfinil)butil-isotiocianato] e Sulforafane nitrile (SFN) (Figura 10).

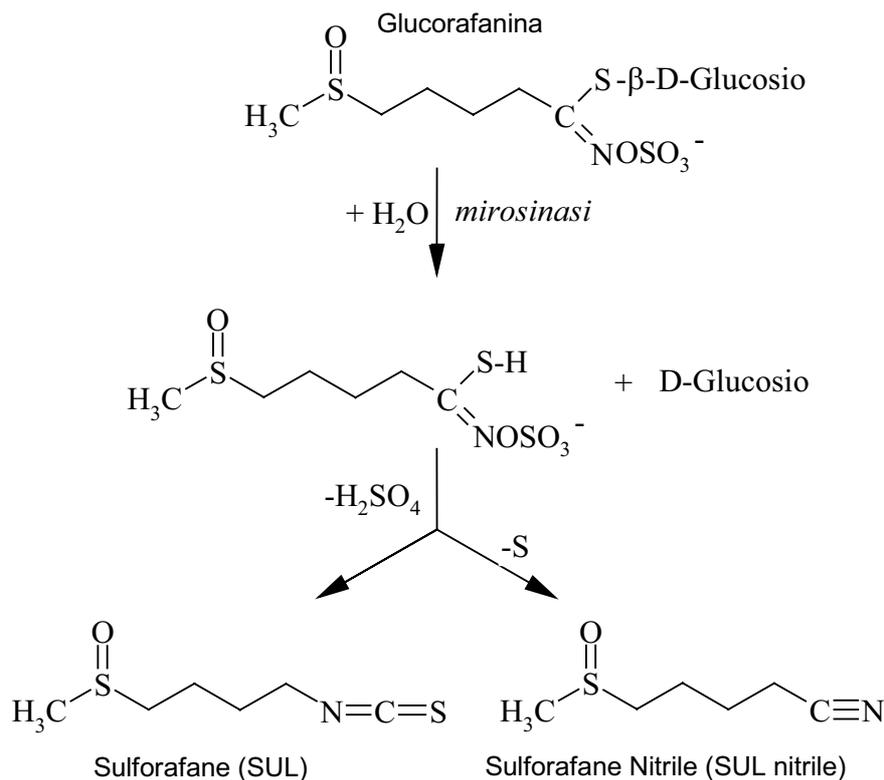


Figura 10. Degradazione enzimatica della glucorafanina con formazione di SUL e SUL nitrile.

Le proporzioni con cui l'enzima produce SUL o SUL nitrile dipendono da numerosi fattori, quali la varietà e la specie vegetale, il sito dove avviene l'idrolisi (nel tessuto vegetale o nell'intestino umano), la presenza di cofattori, come la vitamina C, e numerose variabili ambientali, come temperatura, pH e umidità.

❖ ATTIVITÀ BIOLOGICA DEGLI ISOTIOCIANATI

Gli ITC, prodotti di idrolisi dei GLS, sono i principali responsabili dell'attività biologica che si attribuisce alle specie appartenenti alle *Cruciferae*. In particolare, gli ITC sono tra i più interessanti composti di origine naturale ad attività antitumorale, in particolar modo per il cancro ai polmoni, stomaco, colon e retto (29). Gli ITC esercitano i loro effetti

modulando il potere antiossidante cellulare, aumentando la capacità di detossificazione ed inducendo l'apoptosi in cellule tumorali.

Alla base di queste proprietà vi è l'attività di induzione di enzimi di fase II, tra i quali soprattutto chinone reduttasi (QR) e glutatione-S-transferasi (GST). QR è responsabile del trasferimento di 2 elettroni in molecole chinoniche, trasformandole così in idrochinoni e prevenendo la formazione di pericolosi addotti chinoni-DNA. GST catalizza l'attacco nucleofilo del glutatione (GSH) a composti reattivi elettrofili ed è un importante indicatore dello stato di attivazione degli enzimi di fase II (32). Tale azione è molto probabilmente il risultato dell'attivazione del fattore di trascrizione Nrf2, che lega con elevata affinità elementi regolatori chiamati elementi di risposta antiossidante (ARE), i quali a loro volta attivano l'espressione dei geni che codificano per gli enzimi di fase II.

Gli ITC non presentano attività antiossidante diretta, ossia non prendono parte a reazioni che coinvolgono trasferimenti di elettroni, ma sono comunque in grado di modificare lo stato redox cellulare, tramite l'aumento della concentrazione di glutatione e l'induzione degli enzimi di fase II e sono pertanto detti "antiossidanti indiretti". Al contrario di quanto avviene con gli antiossidanti ad azione diretta, i cosiddetti "scavengers", lo stato antiossidante si mantiene anche dopo la loro eliminazione. Il vantaggio che l'azione antiossidante di tipo indiretto presenta è quello di favorire l'eliminazione delle specie tossiche, comprese quelle che si formano in seguito al "quenching" di un radicale.

Studi epidemiologici hanno anche mostrato una relazione inversa tra il consumo delle specie vegetali interessate e la probabilità di sviluppare patologie neoplastiche. L'attività antitumorale degli ITC è riconducibile agli stessi meccanismi di azione sopra citati. In particolare, l'induzione di

GST sembra essere uno dei meccanismi principali attraverso il quale tale attività viene esercitata.

Gli ITC sembrano avere la capacità di ridurre la proliferazione e di indurre l'apoptosi nelle cellule tumorali, rallentando così la progressione della neoplasia. Il SUL per di più è in grado di aumentare la risposta ad alcuni agenti antineoplastici nelle cellule tumorali, introducendo così la possibilità di un suo utilizzo in ambito terapeutico e non solamente preventivo.

Studi recenti indicano la capacità degli ITC di ridurre l'entità dei processi infiammatori a carico del SNC (31), dimostrando in tal modo anche la possibilità di questi composti di attraversare la barriera emato-encefalica. L'infiammazione a livello del SNC, dovuta a stimoli di tipo ossidativo, è considerato un normale fattore del declino delle capacità cognitive a cui si assiste nell'invecchiamento, e l'assunzione di induttori di fase II di origine alimentare può ridurre l'intensità.

Le proprietà antiossidanti e la capacità di detossificazione rendono ragione dell'interesse che viene riposto in questa classe di composti come agenti neuroprotettivi.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Il morbo di Parkinson (PD) è una patologia neurodegenerativa caratterizzata da una selettiva e progressiva perdita del numero e dell'attività dei neuroni dopaminergici appartenenti alla *substantia nigra*, in particolare della *pars compacta*. La patogenesi del PD è tuttora da chiarire, nonostante ciò è ormai accettata un'origine multifattoriale, secondo la quale l'eccitotossicità, l'alterazione della funzione mitocondriale, le neurotossine ed il danno da stress ossidativo possono concorrere allo sviluppo della patologia (3). Nel PD, come in altre patologie neurodegenerative, l'aspetto più evidente è l'estesa morte neuronale di tipo apoptotico (33). Il processo apoptotico, contraddistinto da lunghi tempi di esecuzione e fasi iniziali reversibili, permette di poter intervenire con molecole nuove di sintesi o di origine naturale, al fine di prevenire l'innescare o bloccare l'evoluzione del "programma di morte cellulare". In questo contesto, particolare interesse è rivolto allo studio dei fattori che influenzano la sopravvivenza o la morte neuronale in condizioni fisiologiche e patologiche, come la regolazione di specifiche vie di sopravvivenza neuronale.

Le terapie attualmente disponibili sono di tipo sintomatico o, nel migliore dei casi, hanno la capacità di rallentare l'inevitabile decorso. Nell'ambito del *drug discovery*, uno dei principali obiettivi della ricerca biomedica è l'identificazione di nuovi composti di origine naturale ad attività neuroprotettiva. Diversi studi dimostrano come composti fitochimici presenti nella dieta (catechine, curcumina e narigenina) siano in grado di contrastare la morte neuronale indotta in modelli sperimentali che

impiegano neurotossine specifiche per il PD, come la 6-OHDA o l'MPTP (34-36).

La ricerca oggetto della presente tesi si svolge nell'ambito di un più ampio progetto di ricerca volto allo studio dei meccanismi d'azione, dell'eventuale attività ed efficacia di molecole di origine naturale con potenzialità di impiego nel campo della prevenzione delle patologie neurodegenerative. Lo studio ha voluto indagare la potenziale attività neuroprotettiva del **sulforafane** (SUL), l'isotiocianato derivante dall'idrolisi della glucorafanina, in un modello sperimentale *in vitro* di PD, che impiega la 6-OHDA, una neurotossina specifica per i neuroni dopaminergici, e uno dei principali metabolici della reazione di auto-ossidazione della 6-OHDA, l' H_2O_2 . Per gli esperimenti è stata utilizzata una linea cellulare di neuroni dopaminergici, denominata SH-SY5Y, rappresentativa dell'area nigrostriatale.

Per poter simulare, da un punto di vista temporale, gli effetti neurodegenerativi, i neuroni sono stati sottoposti ad un trattamento di tipo *pulse/chase* che prevede una breve esposizione delle cellule alla 6-OHDA o all' H_2O_2 e il successivo allontanamento degli agenti ossidanti, allo scopo di permettere il recupero del danno neuronale o l'attivazione di meccanismi di morte cellulare. Questo modello ha permesso di valutare l'attività neuroprotettiva del SUL in tre momenti distinti del danno neuronale: prima, durante e dopo il trattamento con 6-OHDA o H_2O_2 .

I parametri cellulari che sono stati indagati, per valutare gli effetti neuroprotettivi del SUL, sono la morte neuronale di tipo apoptotico, in particolare la traslocazione della fosfatidilserina, con il test dell'Annexina-V, la frammentazione del DNA con un metodo immunoenzimatico e l'attivazione delle caspasi-3 e -9, utilizzando un substrato specifico fluorogenico. Inoltre, sono stati valutati il danno mitocondriale con il test

dei sali di tetrazolio, l'attività antiossidante totale (TAA), come marker dello stato antiossidante cellulare (test ABTS) e i livelli intracellulari del GSH e di enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH e nei processi di detossificazione cellulare (GST, GR, GPx e NADPH-QR), mediante test colorimetrici specifici. Infine, è stata determinata la capacità della molecola in esame di modulare l'attivazione di vie di sopravvivenza neuronali, come la MAPK/ERK e la PI3K/Akt, rispettivamente quantificando la fosforilazione delle proteine ERK e Akt con la tecnica del Western Blot.

3. MATERIALI E METODI

3.1 COMPOSTI CHIMICI

Il **sulforafane** (SUL) (fig. 11) è stato acquistato presso i laboratori LDK (St. Paul, MN, USA), come miscela racemica di D,L-Sulforafane al 97% di purezza. La soluzione stock (10 mM) è stata preparata solubilizzando il SUL in dimetilsolfossido (DMSO) sterile. Le soluzioni lavoro sono state preparate diluendo la soluzione stock in terreno di coltura.

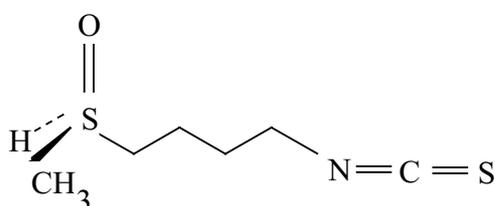


Figura 11. Struttura chimica del sulforafane (SUL).

La **6-idrossidopamina** (6-OHDA) (fig. 12) è stata acquistata dalla SIGMA-ALDRICH (St.Louis, MO, USA). La soluzione stock (10 mM) è stata preparata solubilizzando la 6-OHDA in H₂O deossigenata (sotto flusso d'azoto per 10 minuti). Le soluzioni lavoro sono state preparate diluendo la soluzione stock in terreno di coltura.

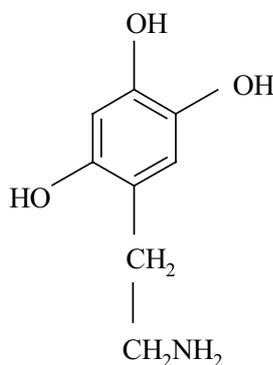


Figura 12. Struttura chimica della 6-idrossidopamina (6-OHDA).

La soluzione di **perossido di idrogeno** (H₂O₂) (30% in acqua) è stata acquistata dalla SIGMA-ALDRICH (St.Louis, MO, USA). Le soluzioni lavoro sono state preparate al momento dell'uso diluendo la soluzione stock in terreno di coltura.

3.2 LINEA CELLULARE

E' stata impiegata una linea continua di neuroblastoma umano, denominata SH-SY5Y, rappresentativa dell'area nigrostriatale, gentilmente fornita del Prof. S. Spampinato, Dipartimento di Farmacologia, Università di Bologna.

3.3 TERRENO DI COLTURA E SOLUZIONI

3.3.1 TERRENO DI COLTURA

COMPONENTI DEL TERRENO DI COLTURA

- DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA).
- Soluzione stock di L-glutammina 200 mM precedentemente preparata sciogliendo 0,146 g di glutammina (SIGMA Chemical, St.Louis, MO, USA) in 5 ml di H₂O bidistillata e filtrando con filtro 0,22 µm di acetato di cellulosa.
- Soluzione stock di Penicillina 5000 UI e di streptomicina 5 mg/ml.
- Siero fetale bovino (FBS) (SIGMA), precedentemente disattivato a 57 °C per 30 minuti.

PREPARAZIONE DEL TERRENO

Il terreno va preparato in contenitori sterili aggiungendo i vari componenti in assoluta sterilità.

Il terreno di coltura completo (10% FBS) è costituito da:

- DMEM 88%
- Penicillina-Streptomicina 1%
- L-glutammina 1%
- FBS 10%

3.3.2 SOLUZIONI

- Soluzione salina bilanciata di Hanks (HBSS) senza rosso fenolo.
- Soluzione salina tamponata di Dulbecco senza Ca^{++} e Mg^{++} 10x (D'PBS): diluire 1:10 con H_2O bidistillata sterile.
- Soluzione di EDTA-tripsina 0,02-0,05%.
- Soluzione di Trypan Blue 0,4%, liquida, sterilizzata mediante filtrazione, testata su colture cellulari.
- Soluzione stock di sali di tetrazolio (MTT): 30 mg di MTT vengono sciolti in 6 mL di HBSS, la soluzione va conservata a riparo dalla luce a -20°C .
- Soluzione lavoro MTT: 1,2 mL di soluzione stock di MTT vengono aggiunti a 10,8 mL di HBSS, la soluzione va preparata e filtrata con filtri da $0,45\ \mu\text{M}$ al momento dell'uso.
- Soluzione tampone di lisi Triton X-100 0,05%. La soluzione va preparata aggiungendo 0,05 g di Triton X-100 a 100 mL di D'PBS.
- Soluzione tampone di lisi Triton X-100 1%. La soluzione va preparata aggiungendo 1 g di Triton X-100 a 100 mL di D'PBS.
- Soluzione Comassie brilliant blue per il dosaggio delle proteine.
- Soluzione di albumina bovina serica (BSA).
- Soluzione dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS) 2 nM.

- Soluzioni di Trolox 0,5-1,0- 1,5 mM in etanolo.
- Soluzione *Buffer di lisi* per la determinazione dell'attività delle Caspasi. Concentrazioni finali dei componenti: 10 mM HEPES pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM PMSF, 20 µg/mL leupeptin.
- Soluzione *Buffer di reazione* per la determinazione dell'attività delle Caspasi. Concentrazioni finali dei componenti: 25 mM HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 10% glicerolo, 1 mM EDTA, 10 mM DTT.
- Soluzione stock di Substrato delle Caspasi. I substrati sono risospesi in DMSO a una concentrazione stock di 1 mM.
- Soluzione tampone di lisi Triton X-100 0,1%. La soluzione va preparata aggiungendo 0,1 g di Triton X-100 a 100 mL di D'PBS.
- Soluzione *Mix di Reazione* per la determinazione dell'attività del Glutathione Transferasi (GST). La soluzione va preparata aggiungendo: 8 mL di KH₂PO₄ (0,1 M) - EDTA (1 mM) (pre-riscaldato a 37°C); 0,5 mL di glutathione (GSH) 20 mM; 0,5 mL di 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (20 mM).
- Soluzione *Mix di Reazione* per la determinazione del Glutathione (GSH). La soluzione va preparata aggiungendo: 3,5 mL di buffer sodio fosfato (143 mM) con EDTA (6,3 mM); 500 µL di NADPH (2,39 mM); 250 µL di GSH reduttasi (240 U/mL). Aggiungere 250 µL di DNTB (acido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzoico) (0,01 M), al momento dell'uso.
- Soluzione di acido sulfosalicilico (SSA) al 5%. La soluzione va preparata aggiungendo 2,5 g di SSA a 47,5 mL di acqua bidistillata.
- Soluzione *Mix di Reazione* per la determinazione dei livelli della NADPH-chinone reduttasi (QR): la soluzione va preparata aggiungendo: 1500 µl di TRIS-HCl (0,5 M); 182 µl di TWEEN-20 (1,65%); 20 µl di FAD (7,5 mM); 200 µl di G6P (150 mM); 18 µl di NADP (50 mM); 24 µl di G6PD (2.5 U/µl); 20 mg BSA; 9 mg MTT; 30 µl di MENADIONE (50 Mm).

- Soluzione di fosfato di potassio 100 mM per la determinazione di GR: preparare 100 mL in H₂O bidistillata utilizzando 1,3609 g di fosfato di potassio anidro monobasico (KH₂PO₄) e 37,224 mg di EDTA.
- Soluzione Buffer fosfato di potassio 100 mM pH7.5 per la determinazione di GR: preparare 100 mL in H₂O bidistillata utilizzando 1,7418 g di fosfato di basico di potassio (K₂HPO₄) e 37,224 mg di EDTA. Aggiustare il pH a 7.5 utilizzando la soluzione precedente.
- Soluzione *Tampone di lisi* per la determinazione dei livelli della NADPH-chinone reduttasi (QR): la soluzione va preparata aggiungendo: 100 mg di DIGITONINA; 9,305 mg di EDTA; 12,5 mL di H₂O bidistillata.
- Soluzione di Dicumarolo pH 7,4 (0,3 mM): la soluzione va preparata aggiungendo: 0,250 mL DMSO; 5,045 mg di DICUMAROLO; 57,05 mg di K₂HPO₄ (3H₂O); 49,75 mL di H₂O bidistillata.

Soluzioni in dotazione nei seguenti **kit**:

- ✓ *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).
- ✓ *Cell death detection ELISA^{PLUS}* (Roche Diagnostics).
- ✓ *Glutathione Reductase Assay Kit* (Sigma-Aldrich).
- ✓ *Glutathione peroxidase cellular activity assay kit* (Sigma-Aldrich).

Soluzioni per il **Western Blot**:

- Soluzione di *Lysis Buffer Completo*, concentrazioni finali dei componenti: 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,02% sodium azide, 100 µg/ml PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1% Triton X-100.
- La soluzione di *Loading Buffer* va preparata con Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e 2-Mercaptoetanolo al 5%.

- Soluzione di *Running Buffer*, concentrazioni finali: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3.
- Soluzione di *Blotting Buffer*, concentrazioni finali: 25 mM Tris, 192 mM Glycine, 20% (v/v) metanolo, pH 8,3.
- Soluzione di *TBS 1X*, concentrazioni finali: 20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5.
- La soluzione di *Block Solution* va preparata con: 2,5 g Dry milk, 5 ml TBS 10X, 45 ml H₂O bidistillata, 50 µl Tween 20.
- La soluzione di *TBST* va preparata con TBS 1X e Tween 20 allo 0,05%.
- La soluzione di *TBST/BSA* va preparata con TBST e BSA allo 0,1%.
- Gli *anticorpi primari* per le ERK 1/2 totali e per quelle attivate (*Anti-ACTIVE[®] pAb, rabbit*) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) sono stati diluiti 1:5000 in TBST/BSA. Gli *anticorpi primari* per Akt totale e attivata (*Rabbit anti-phospho-Akt1, Ser 473*) (Chemicon International, Temecula; CA, USA) sono stati diluiti 1:1000 in TBST/BSA.
- L'*anticorpo secondario* (*peroxidase labelled anti-rabbit antibody*, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) è stato diluito 1:2500 in TBST/BSA.
- *ECL Western blotting detection reagents and analysis system* (Amersham Pharmacia Biotech).

3.4 ALLESTIMENTO DELLE COLTURE CELLULARI

Le cellule SH-SY5Y sono state fatte crescere di routine in monostrato in dischi per colture cellulari da 100 mm Ø in terreno completo DMEM 10% FBS, in atmosfera umidificata a 37°C al 5% di CO₂. Quando le cellule hanno raggiunto la sub-confluenza o confluenza si è proceduto al loro

distacco con una soluzione di EDTA-Tripsina 0,02-0,05% e diluizione 1:5 o 1:10 in nuovi dischi dello stesso diametro (subcoltivazioni bisettimanali). Per condurre gli esperimenti le cellule sono state rimosse e contate con l'impiego della camera di Burker, previa colorazione con Trypan Blue. Per valutare l'apoptosi mediante il test dell'Annexina-V sono stati allestiti dischi da 100 mm Ø con 12 mL di una sospensione di cellule SH-SY5Y alla densità di $1,25 \times 10^5$ cellule/mL (pre-trattamento con SUL) e 2×10^5 cellule/mL (standardizzazione e post-trattamento con SUL) in terreno completo DMEM 10% FBS; mentre per valutare la frammentazione del DNA e l'attività mitocondriale sono state allestite piastre da 96 pozzetti rispettivamente con $2,5 \times 10^3$ e 1×10^4 cellule/100 µL/pozzetto. Per tutti gli altri esperimenti sono stati allestiti dischi da 100 mm Ø con 12 mL di una sospensione di cellule SH-SY5Y alla densità di $3,5 \times 10^5$ cellule/mL. Gli esperimenti sono stati eseguiti dopo 24 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO₂ per consentire la formazione del monostrato.

3.5 TRATTAMENTO CON 6-OHDA E H₂O₂

Nella fase di standardizzazione le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 3 ore con 6-OHDA 100 µM o con H₂O₂ 300 µM, gli esperimenti sono stati condotti dopo vari tempi di recovery in DMEM al 10% FBS. Il test dell'Annexina-V è stato effettuato immediatamente e dopo 3, 15 e 24 ore dal trattamento con 6-OHDA o con H₂O₂; la frammentazione del DNA è stata determinata 21 ore dopo il trattamento ossidativo, mentre l'attività delle caspasi immediatamente e dopo 3, 6 e 15 ore.

Per i successivi esperimenti le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 3 ore con 6-OHDA 100 µM o con H₂O₂ 300 µM, il test dell'Annexina-V è stato effettuato dopo 15 ore di recovery, la frammentazione del DNA e

L'attività mitocondriale sono state valutate dopo 21 ore, l'attività delle caspasi 3 ore dopo il trattamento ossidativo.

3.6 TRATTAMENTO CON SULFORAFANE

Per il **pre-trattamento** le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 24 ore con concentrazioni di SUL comprese nell'intervallo 0,6–5 μM e successivamente esposte alla 6-OHDA o al H_2O_2 ; per il **co-trattamento** le cellule sono state trattate per 3 ore con SUL (0,6–2,5 μM) e 6-OHDA; mentre per il **post-trattamento** è stato effettuato prima il trattamento con la neurotossina e successivamente le cellule sono state trattate per 15 ore con SUL (0,6–2,5 μM). Per valutare gli effetti neuroprotettivi prolungati le cellule sono state trattate per 24 ore con SUL (0,6–5 μM) e successivamente incubate per ulteriori 24 ore in DMEM 2% FBS prima di esporle al H_2O_2 . Per determinare l'attività mitocondriale e i livelli intracellulari di GSH i neuroni sono stati trattati per 6, 12 e 24 ore con SUL (0,6–5 μM) prima di effettuare i test. Per valutare l'attività antiossidante totale e l'attività di GR, GPx e NADPH-QR le cellule sono state trattate per 24 ore con SUL (0,6–5 μM). In ultimo, per valutare la fosforilazione delle proteine ERK1/2 e Akt le cellule SH-SY5Y sono state trattate per 1, 2 e 3 ore con SUL 2,5 μM .

3.7 TRATTAMENTO CON BSO, LY294002 E PD98059

È stata valutata l'attività mitocondriale anche in seguito ad un co-trattamento di 24 ore SUL (0,6–5 μM) e butionin sulfossimina (BSO) 400 μM prima di esporre le cellule alla neurotossina.

Gli effetti del post-trattamento con SUL sono stati stimati in presenza di due inibitori di due vie di sopravvivenza neuronale, LY294002 e PD98059. Dopo il trattamento con la 6-OHDA i neuroni sono stati trattati per 15 ore con SUL 2,5 μ M e LY294002 10 μ M o con SUL 2,5 μ M e PD98059 5 μ M, successivamente è stato effettuato il test dell'Annexina-V.

3.8 VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI

3.8.1 TRASLOCAZIONE DELLA FOSFATIDILSERINA

La traslocazione della fosfatidilserina è stata valutata con l'impiego del Kit *Annexin-V-FLUOS Staining Kit* (ROCHE). Trascorsi i tempi di incubazione previsti, il monostrato di cellule è stato staccato impiegando la soluzione EDTA-Tripsina 0,02-0,05% e le cellule sono state risospese in terreno completo (DMEM 10% FBS); aliquote da $2,5 \times 10^5$ cellule sono state centrifugate per 8 minuti a 1200 rpm e lavate con D'PBS. A questo punto, il pellet cellulare è stato risospeso in 100 μ L di soluzione di marcatura, contenente 2 μ L di Annexina-V e 2 μ L di propidio ioduro, e successivamente messo ad incubare per 15 minuti. L'analisi è stata effettuata attraverso la lettura al microscopio a fluorescenza, usando una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione, rispettivamente di 488 nm e di 515 nm. Per ogni campione sono stati analizzati 4 quadranti differenti per un totale di 400 cellule.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'apoptosi è stata espressa con la seguente formula:

$$\text{Apoptosi (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ cellule fluorescenti (verdi)}}{n^{\circ} \text{ cellule totali}} \times 100$$

Per numero di cellule totali si intende la somma delle cellule vive e delle cellule morte.

3.8.2 FRAMMENTAZIONE DEL DNA

La frammentazione del DNA è stata valutata con un kit ELISA (*Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*, Roche Diagnostics). Per prima cosa è stato rimosso il sovranatante da tutti i pozzetti, dopo di che le cellule sono state messe ad incubare con 200 µl di *lysis buffer*. Dopo 30 minuti di incubazione si è proceduto al recupero e centrifugazione del lisato cellulare. Successivamente, 20 µl di sovrinatante sono stati trasferiti nei pozzetti della piastra per analisi in dotazione con il Kit. Sono stati aggiunti 80 µl di *mix reagenti* (anticorpo anti-istone-biotina e anti-DNA-POD) per pozzetto, poi la piastra è stata messa ad agitare per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo l'agitazione, si è proceduto alla rimozione della soluzione, al lavaggio con 200 µl di *incubation buffer* e all'aggiunta di 100 µl di soluzione ABTS in ogni pozzetto. Trascorso il tempo necessario per lo sviluppo della reazione, è stata eseguita la lettura con lo spettrofotometro (lettore di piastra da 96 pozzetti, TECAN SPECTRA modello CLASSIC) alla lunghezza d'onda di 405 nm.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La frammentazione del DNA è stata espressa come incremento dell'attività ottica, dove l'incremento è stato calcolato con la seguente formula:

$$\text{Incremento} = \frac{\text{O.D.}_t}{\text{O.D.}_{nt}}$$

Dove:

O.D._t = densità ottica delle cellule trattate.

O.D._{nt} = densità ottica delle cellule non trattate.

3.8.3 ATTIVAZIONE DELLE CASPASI-3 E -9

L'attività delle caspasi è stata determinata mediante un metodo fluorimetrico che si basa sull'idrolisi, da parte di questo enzima, della 7-ammino-4-metilcumarina (AMC) dal substrato specifico per la caspasi, con conseguente liberazione del AMC (37). Dopo l'incubazione le cellule sono state tripsinizzate con 2 mL di soluzione EDTA-tripsina 0,02-0,05%, contate e trasferite nel numero di 5×10^5 negli eppendorf per essere centrifugate a 6000 rpm per 10 minuti. Successivamente, il pellet di cellule è stato risospeso in 60 μ L di *Buffer di lisi* e lasciato incubare per 30 minuti in un bagnetto di ghiaccio. Si è poi proceduto a centrifugare il lisato cellulare a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. Un volume di 50 μ L di sovrantante è stato trasferito in una piastra da 96 pozzetti. Quindi sono stati aggiunti, in ciascun pozzetto, 50 μ L di *Buffer di reazione*, 5 μ L di substrato per la caspasi-3 o -9. Dopo 30' è stata eseguita la misura della fluorescenza con il fluorimetro (lettore di piastra da 96 pozzetti, WALLAC modello VICTOR²). È stata impiegata una lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione rispettivamente di 380 nm e di 460 nm.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'attività delle caspasi è stata espressa come incremento percentuale di fluorescenza, calcolato con la seguente formula:

$$\% \text{ di incremento} = 100 - \left(\frac{F_t}{F_c} \times 100 \right)$$

F_c = fluorescenza delle cellule non trattate

F_t = fluorescenza delle cellule trattate con H_2O_2

3.9 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ MITOCONDRIALE

Per valutare l'attività mitocondriale è stato impiegato il test dei sali di tetrazolio (test MTT). Dopo l'incubazione, è stato eliminato per inversione il contenuto della piastra e sono stati aggiunti 100 μL di soluzione lavoro MTT in ogni pozzetto. Dopo 2 ore di incubazione a 37°C al 5% di CO_2 , è stata eliminata la soluzione dei sali di tetrazolio, i pozzetti sono stati lavati con 150 μL di HBSS e sono stati aggiunti 150 μL di isopropanolo per estrarre e solubilizzare i precipitati di formazano. Per facilitare la solubilizzazione del formazano le piastre sono state agitate fino ad ottenere una soluzione omogenea. Trascorso il tempo necessario per lo sviluppo della reazione, è stata eseguita la lettura con lo spettrofotometro (lettore di piastra da 96 pozzetti, TECAN SPECTRA modello CLASSIC) alla lunghezza d'onda di 570 nm, usando come riferimento la lunghezza d'onda di 690 nm.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

L'attività mitocondriale è stata espressa utilizzando la seguente formula:

$$\text{attività mitocondriale} = \frac{\text{OD}_t}{\text{OD}_{nt}} \times 100$$

OD_t = densità ottica delle cellule trattate con il composto in studio

OD_{nt} = densità ottica delle cellule non trattate con il composto in studio

3.10 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE

L'Attività Antiossidante Totale (TAA) è stata valutata utilizzando un radicale a spegnimento, il campione radicalico dell'acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) (ABTS), un cromoforo blu/verde con assorbimento caratteristico a 734 nm (38). Il test viene condotto in due passaggi distinti: inizialmente è stata effettuata la separazione tra la frazione citoplasmatica e di membrana, in seguito, è stato eseguito un dosaggio delle proteine presenti nelle due frazioni ed è stata valutata l'attività antiossidante totale.

SEPARAZIONE DI MEMBRANA E CITOPLASMA

È stato eliminato il contenuto di ogni disco ed è stato eseguito un lavaggio con 8 ml di D'PBS. In seguito sono state rimosse le cellule dalla piastra utilizzando lo *scraper* con 0,5 mL di D'PBS; tale operazione è stata ripetuta per tre volte. Le cellule sono state raccolte in eppendorf da 1,5 ml e centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C. E' stato eliminato il sovrnatante e sono stati aggiunti 600 µL di tampone di lisi Triton 0,05%. Gli eppendorf sono stati posti a 4°C per 30 minuti sotto agitazione. In seguito i lisati sono stati centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. A questo punto è stato prelevato il sovrnatante, ovvero il citosol. Successivamente sono state dosate le proteine di tale frazione cellulare, utilizzando il metodo Bradford. Le proteine sono state determinate allestendo una curva di taratura con diverse concentrazioni di albumina bovina serica (BSA). I campioni sono stati conservati a -20°C fino al momento della determinazione dell'attività antiossidante totale.

VALUTAZIONE DELL'ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE TOTALE

Per radicalizzare l'ABTS sono stati aggiunti 100 μL di una soluzione acquosa di $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (70 nM) a 10 mL di una soluzione di ABTS (2 nM). La soluzione così ottenuta (ABTS \cdot) è stata conservata al buio per almeno 6 ore, per permettere la completa radicalizzazione. La soluzione di ABTS \cdot è stata successivamente diluita con PBS fino ad ottenere un'assorbanza pari a $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm.

Il test con il radicale ABTS $^{+\cdot}$ è stato applicato anche per la valutazione dell'attività antiossidante intrinseca della molecola in studio.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Utilizzando differenti concentrazioni di Trolox in etanolo (0,5-1,0-1,5 mM) è stata realizzata la retta di taratura che esprime la % di inibizione in funzione della concentrazione di Trolox. La % di inibizione è stata calcolata come segue:

$$\% \text{ inibizione} = \frac{(A_b - A_c) \times 100}{A_b}$$

A_b = Assorbanza del bianco a 734 nm

A_c = Assorbanza delle diverse concentrazioni di Trolox a 734 nm

Si è quindi proceduto al calcolo della percentuale di inibizione per i diversi campioni. L'attività antiossidante totale (TAA) è stata determinata con il seguente calcolo ed espressa in Trolox Equivalenti (TE) per mg di proteine:

$$\text{TEAA } (\mu\text{mol TE/mg di proteine}) = \frac{\% \text{ inibizione}}{\text{Pendenza retta taratura}} \times 1000$$

3.11 DETERMINAZIONE DEI LIVELLI INTRACELLULARI DI GLUTATIONE

I livelli di glutatione (GSH) sono stati determinati mediante un test colorimetrico, in relazione alla capacità di ridurre l'acido 5,5' ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) in 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) (39). Inizialmente è stato eliminato il contenuto da ogni disco ed è stato eseguito un lavaggio con 8 mL di D'PBS. In seguito sono state rimosse le cellule dalla piastra utilizzando lo *scraper* con 0,5 mL di D'PBS; tale operazione è stata ripetuta per tre volte. Le cellule sono state raccolte in eppendorf da 1,5 mL e centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C. È stato eliminato il sovrantante ed è stato aggiunto al pellet 0,5 mL di tampone di lisi Triton 0,1%. Gli eppendorf sono stati vortexati, lasciati in ghiaccio per 5 minuti e in seguito centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. A questo punto sono stati trasferiti 25 µL di sovrantante in una piastra da 96 pozzetti ed aggiunti 25 µL di acido sulfosalicilico freddo in ogni pozzetto, la piastra è stata agitata per 2 minuti. In seguito, sono stati aggiunti 125 µL di *Glutatione Reaction Buffer* in ogni pozzetto. La piastra è sottoposta ad agitazione per 15 sec e successivamente è stata effettuata la lettura con lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 405 nm. In parallelo, è stata determinata la concentrazione delle proteine dei diversi campioni utilizzando il metodo Bradford.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Utilizzando differenti concentrazioni di GSH (2-4-6-8-10 µM) è stata realizzata una retta di taratura. Dai valori di assorbanza ottenuti per i diversi campioni è stata estrapolata la concentrazione di GSH dalla retta di

taratura. I livelli intracellulari di GSH sono stati espressi: nM/ μ g di proteine.

3.12 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DEGLI ENZIMI GST, GPx, GR E NADPH-QR

Le attività degli enzimi glutatione-S-transferasi (GST), glutatione perossidasi (GPx), glutatione reduttasi (GR) e NADPH-chinone reduttasi (NADPH-QR) sono state valutate mediante l'impiego di test colorimetrici. Per tutti i test è stata effettuata prima una lisi cellulare, sui lisati è stata determinata la concentrazione delle proteine con il metodo Bradford e successivamente è stata determinata l'attività enzimatica.

GST

È stato eliminato il contenuto da ogni disco ed è stato eseguito un lavaggio con 8 mL di D'PBS. In seguito sono state rimosse le cellule utilizzando lo *scraper* con 0,5 mL di D'PBS; tale operazione è stata ripetuta per tre volte. Le cellule sono state raccolte in eppendorf da 1,5 mL e centrifugate a 10000 rpm per 10' a 4°C. E' stato eliminato il sovrantante ed è stato aggiunto al pellet 1 mL di tampone di lisi Triton 0,1%. Gli eppendorf sono stati vortexati, lasciati in ghiaccio per 5 minuti e in seguito centrifugati a 14000 rpm per 15 minuti a 4°C. A questo punto sono stati trasferiti 100 μ L di sovrantante in un eppendorf ed aggiunti 900 μ L del *mix di reazione*. È stata effettuata la lettura con lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm (40).

GPX

È stato eliminato il contenuto da ogni disco. Sono state rimosse le cellule dal disco utilizzando lo *scraper* con 2 mL di tampone potassio fosfato; tale operazione è stata ripetuta per tre volte, rispettivamente con 1, 0.5 e 0.5 mL. Le cellule sono state raccolte in provette da 15 mL e omogenate con un piccolo potter. In seguito sono state centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C. È stato prelevato il sovrnatante ed è stato aggiunto il tampone precedentemente portato a 25°C. È stata effettuata la lettura con lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

GR

L'attività dell'enzima GR è stata valutata con l'impiego del *Glutathione Reductase Assay Kit*. I lisati cellulari sono stati ottenuti come descritto in precedenza per il test del GST. A 100 µL di lisato è stato aggiunto il mix di reazione in dotazione nel kit. È stata effettuata la lettura con lo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 340 nm.

NADPH-QR

È stato eliminato il contenuto da ogni disco ed è stato eseguito un lavaggio con 8 mL di D'PBS. In seguito sono state rimosse le cellule utilizzando lo *scraper* con 0,5 mL di D'PBS; tale operazione è stata ripetuta per tre volte. Le cellule sono state raccolte in eppendorf da 1,5 mL e centrifugate a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C. È stato eliminato il sovrnatante e sono stati aggiunti al pellet 200 µL di *lysis solution*. Dopo aver agitato per 10 minuti, sono stati trasferiti 50 µL di lisato in una piastra da 96 well e sono stati aggiunti 200 µL di *mix di reazione*. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la reazione è stata bloccata aggiungendo, in ogni pozzetto, 50 µL di *soluzione di Dicumarolo* 0.3 mM

a pH 7,4. A questo punto è stata effettuata la lettura con lo spettrofotometro a 595 nm (41).

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Su tutti i lisati è stata determinata la concentrazione delle proteine con il metodo Bradford. L'attività enzimatica è stata espressa come: U/mg di proteine.

3.13 VALUTAZIONE DELL'ATTIVAZIONE DI ERK^{1/2} E AKT

L'attivazione delle proteine ERK 1/2 e Akt è stata valutata utilizzando la tecnica del Western Blot.

PREPERAZIONE DEI LISATI CELLULARI

Le cellule sono state tripsinizzate con una soluzione EDTA-tripsina 0,02-0,25%, raccolte in una provetta da 15 mL e centrifugate a 1400 rpm per 8 minuti. Successivamente, è stato eliminato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in 1 mL di HBSS e trasferito in un microtubo da 1,5 mL. Il microtubo è stato centrifugato a 6000 rpm per 5 minuti a 4°C, poi è stato eliminato il sovrnatante, il pellet è stato risospeso in 220 µL di Lysis Buffer Completo e messo ad incubare in ghiaccio per 30 minuti sull'agitatore di piastra. Successivamente, il microtubo è stato centrifugato a 14000 rpm per 10 minuti a 4°C e il sovrnatante è stato trasferito in un nuovo microtubo. Sul lisato cellulare così ottenuto è stato effettuato il dosaggio delle proteine utilizzando il metodo Bradford.

WESTERN BLOTTING

I campioni, contenenti uguali quantità di proteine del lisato cellulare (70 µg), sono stati addizionati di *Loading Buffer* e acqua bidistillata, sono stati bolliti per 5 minuti e caricati su gel di poliacrilamide (*Ready Gel Tris-HCl 10% Resolving Gel*, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Dopo la corsa elettroforetica sul gel (80 Volt per 1 ora), in tampone Tris-glicina-SDS (*Running Buffer*), le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante elettroblotting in *Blotting Buffer* a 100 Volt per 1 ora a 4°C. Terminato il trasferimento, la nitrocellulosa è stata immersa in *Block Solution* a 4°C per tutta la notte, per bloccare i siti di legame aspecifici.

Il giorno successivo, la membrana di nitrocellulosa è stata incubata per 2 ore a temperatura ambiente e sull'agitatore di piastra con le soluzioni contenenti gli *anticorpi primari* per ERK ½ o Akt. Dopo tre lavaggi in *TBST*, la nitrocellulosa è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente sull'agitatore di piastra con la soluzione contenente l'*anticorpo secondario* marcato con perossidasi. Dopo cinque lavaggi in *TBST* è stata eseguita la rivelazione della marcatura mediante *ECL Western blotting detection reagents and analysis system* (Amersham, Pharmacia Biotech). Per l'acquisizione di immagine è stato utilizzato il *VersaDocTM Imaging System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e i risultati sono stati espressi come Unità Arbitrarie di Luminescenza normalizzati rispetto alla proteina totale.

4. RISULTATI

L'azione neuroprotettiva del sulforafane (SUL) è stata valutata su una linea di neuroni dopaminergici, denominata SH-SY5Y, utilizzando una neurotossina specifica per il PD, la 6-idrossidopamina (6-OHDA), alla concentrazione di 100 μ M, e il perossido di idrogeno (H_2O_2) (300 μ M).

STANDARDIZZAZIONE DEL MODELLO DI NEURODEGENERAZIONE

Nella prima fase della sperimentazione è stata valutata la cinetica di attivazione del danno ossidativo, in termini di morte apoptotica e necrotica, dopo un breve trattamento (3 ore) delle cellule SH-SY5Y con la 6-OHDA. Dal momento che il principale metabolita della reazione di auto-ossidazione della 6-OHDA è H_2O_2 , in parallelo è stato valutato il danno neuronale indotto da un trattamento di 3 ore con H_2O_2 . I due tipi di morte cellulare sono stati analizzati con il test che utilizza la duplice marcatura Annexina-V/propidio ioduro, sia immediatamente, che dopo 3, 15 e 24 ore dal trattamento dei neuroni con gli agenti ossidanti. Come riportato in Figura 13, in entrambe le condizioni sperimentali si è verificato un aumento statisticamente significativo delle cellule apoptotiche dopo 3, 15 e 24 ore dal trattamento ossidativo, con un massimo dopo 15 ore. In parallelo, nelle medesime condizioni sperimentali, non si è verificato un aumento significativo delle cellule necrotiche. Alla luce dei risultati ottenuti, nei successivi esperimenti si è deciso di valutare come end-point di tossicità solo la morte di tipo apoptotico, dopo 15 ore dal trattamento ossidativo.

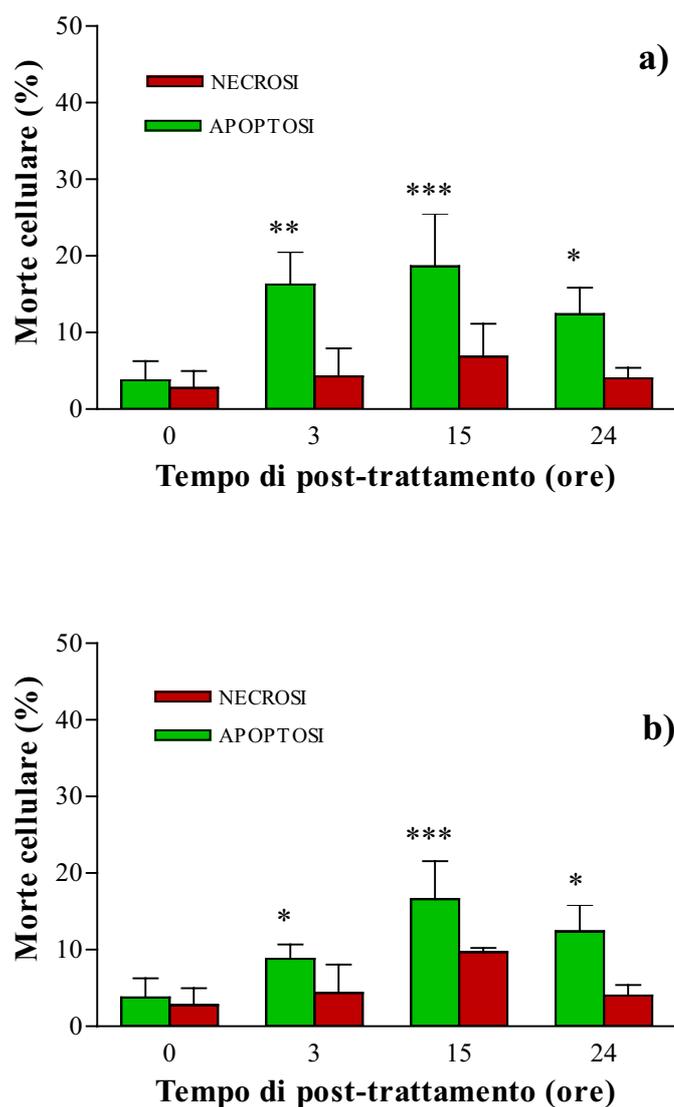


Figura 13. Apoptosi e necrosi in cellule SH-SY5Y immediatamente e dopo 3, 15 e 24 ore dal trattamento di 3 ore con 6-OHDA (100 μ M) (a) e con H₂O₂ (300 μ M) (b). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** p <0,001, ** p <0,01, * p <0,05; t-test).

Per confermare la morte di tipo apoptotico, sono stati determinati altri due eventi di tale processo, la frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi-3 e -9. La frammentazione del DNA è stata determinata dopo 21 ore dal trattamento di 3 ore con 6-OHDA e H₂O₂ ed è stata registrata una significativa induzione, con un incremento rispettivamente di $5,9 \pm 3,1$ e $2,13 \pm 0,7$, confermando gli effetti apoptotici determinati con il test

dell'Annexina-V. Successivamente, è stata stimata la capacità del H_2O_2 di attivare le caspasi-3 e -9. Come si evince dalla Figura 14, si è verificato un incremento dell'attivazione della caspasi-3 immediatamente e dopo 3 ore dal trattamento con H_2O_2 , rispettivamente del 46% e 83%. Al contrario, si è osservato un incremento dell'attivazione della caspasi-9 solo dopo 3 ore dal trattamento ossidativo (63%).

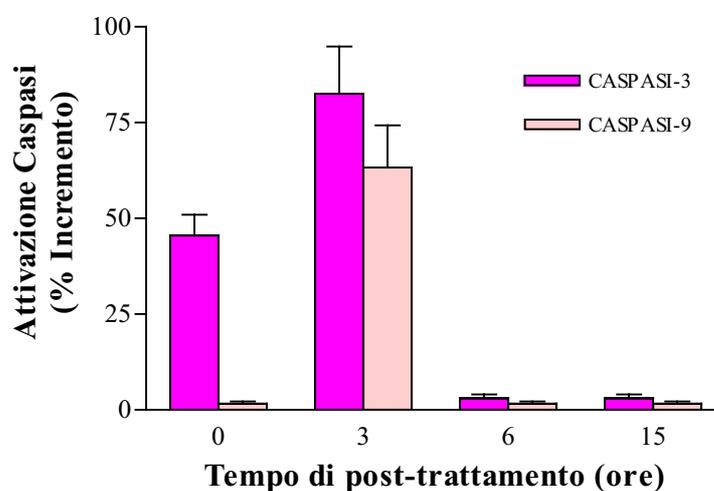


Figura 14. Attivazione delle caspasi-3 e -9 in cellule SH-SY5Y immediatamente e dopo 3, 6 e 15 ore dal trattamento di 3 ore con H_2O_2 (300 μ M). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 replicati di un esperimento rappresentativo.

PRE-TRATTAMENTO DEI NEURONI CON SULFORAFANE

Dopo aver stabilito l'intervallo di concentrazioni di SUL (0,6-5 μM) che non manifesta neurotossicità, è stata valutata l'attività neuroprotettiva della molecola in studio. In primo luogo, è stata determinata la capacità di proteggere le cellule neuronali dall'apoptosi indotta dalla 6-OHDA e dal H_2O_2 . Come riportato in Figura 15, il pre-trattamento di 24 ore con SUL è in grado di indurre un netto decremento delle cellule apoptotiche. L'effetto, in entrambe le condizioni sperimentali, si è dimostrato dose-dipendente e statisticamente significativo per tutte le concentrazioni considerate.

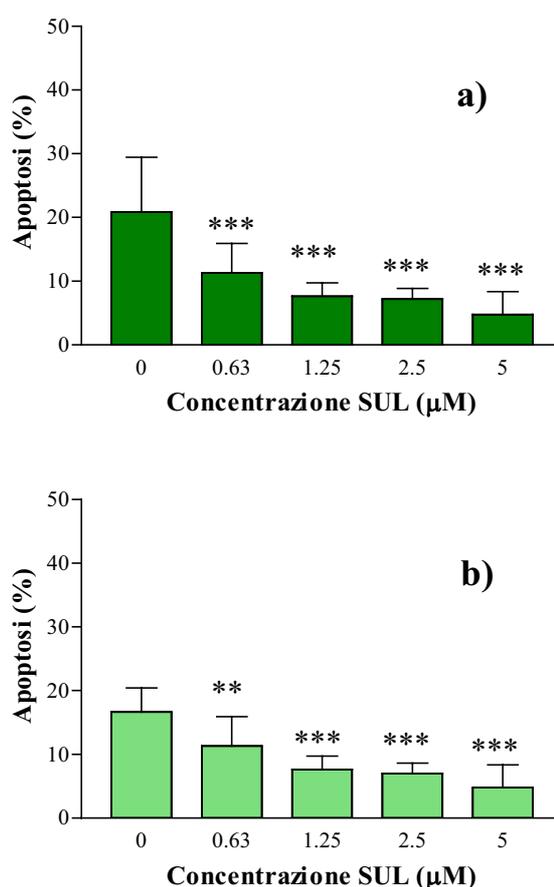


Figura 15. Apoptosi in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) (a) e con H_2O_2 (300 μM) (b) dopo pre-trattamento con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$; t-test).

L'azione antiapoptotica del SUL è stata valutata anche nei confronti della frammentazione del DNA indotta dai due agenti ossidanti. Il trattamento dei neuroni con SUL, nelle medesime condizioni sperimentali, è in grado di indurre una evidente diminuzione della frammentazione del DNA (fig. 16). Tale effetto si è dimostrato dose-dipendente e statisticamente significativo, confermando gli effetti antiapoptotici determinati con il test dell'Annexina-V.

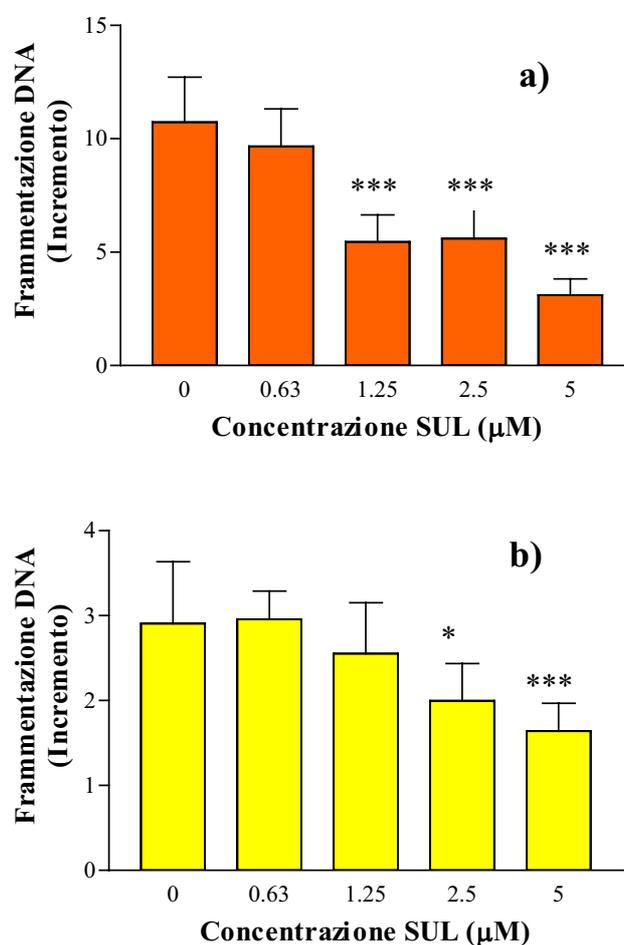


Figura 16. Frammentazione del DNA in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) (a) e con H_2O_2 (300 μM) (b) dopo pre-trattamento con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$; t-test).

Una volta stabilita l'azione antiapoptotica del SUL, è stata valutata la capacità del composto in studio di bloccare l'attivazione delle caspasi-3 e -9 indotta dal trattamento con H₂O₂. I risultati evidenziano che il SUL inibisce l'attivazione delle caspasi, registrando la massima inibizione alla massima concentrazione saggiata (99%) (fig. 17).

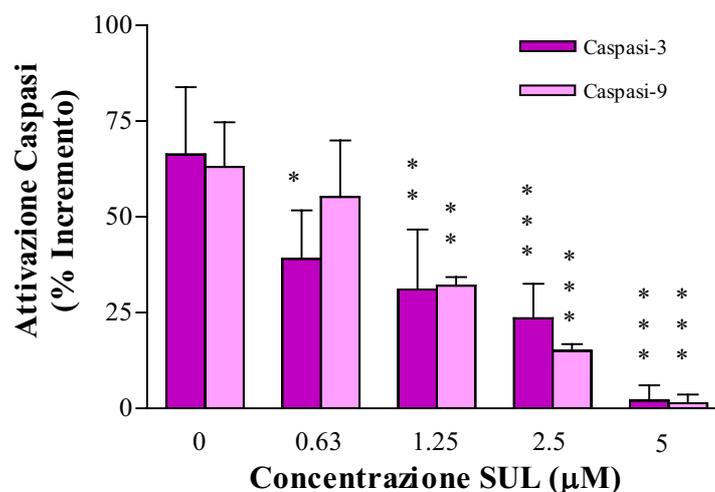


Figura 17. Attivazione delle caspasi-3 e -9 in cellule SH-SY5Y esposte ad H₂O₂ (300 μM) dopo pre-trattamento con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05; t-test).

Dal momento che le caspasi-3 e -9 sono le proteasi coinvolte nella modulazione dell'apoptosi attraverso la via mitocondriale, si è deciso di valutare la capacità del SUL di prevenire il danno mitocondriale dopo 24 ore dal trattamento con i due agenti ossidanti. Allo scopo, i neuroni sono stati pre-trattati per 6, 12, 24 ore con diverse concentrazioni di SUL. I risultati indicano una sostanziale assenza di protezione, nei confronti dell'attività mitocondriale, per i trattamenti di 6 e 12 ore; mentre nei neuroni sottoposti al pre-trattamento di 24 ore si osserva un incremento di attività mitocondriale per le concentrazioni di 2,5 e 5 μM (fig. 18).

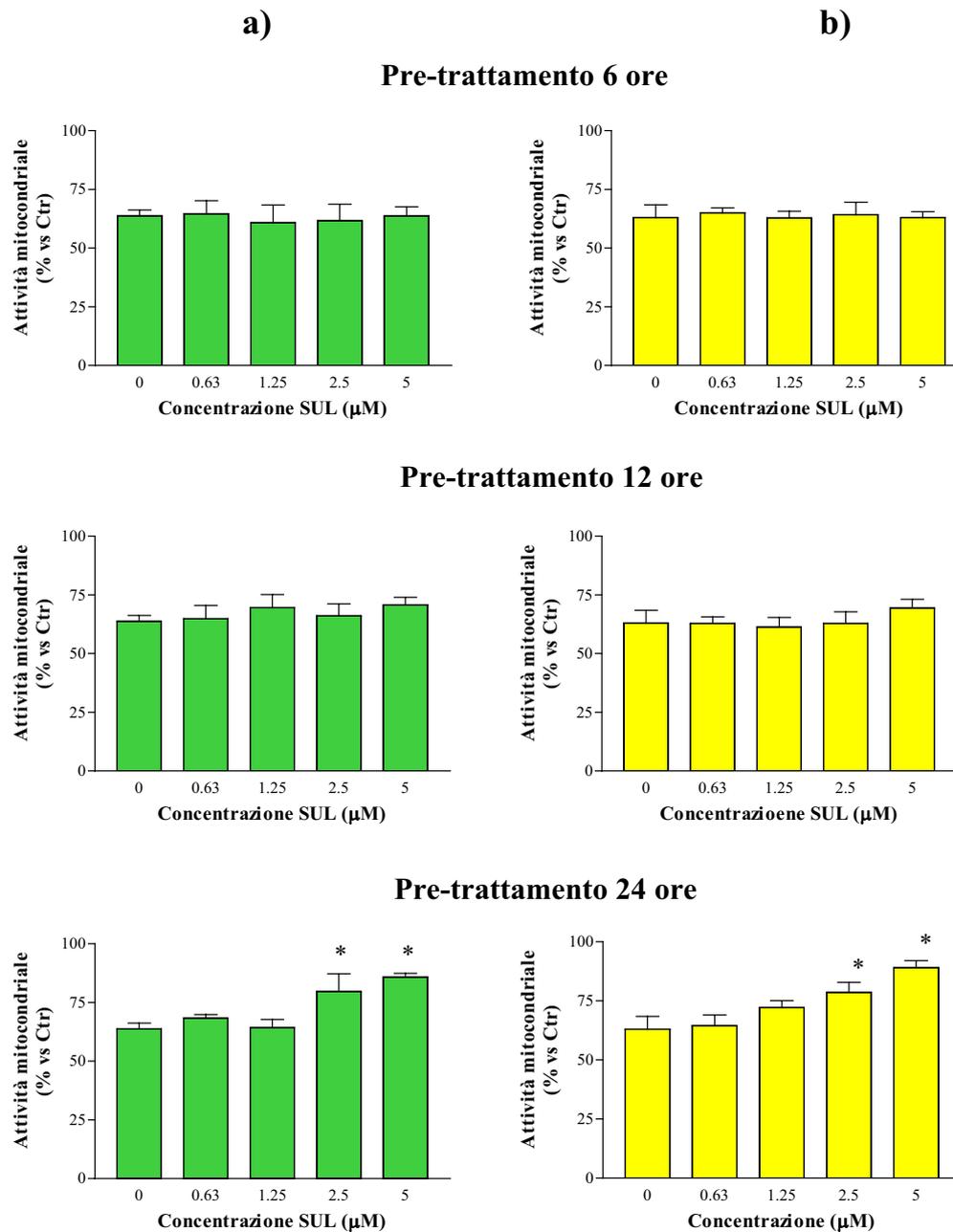


Figura 18. Attività mitocondriale in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) (a) e con H_2O_2 (300 μM) (b) dopo pre-trattamento per 6, 12 e 24 ore con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; * $p < 0,05$; t-test).

Dopo aver stabilito l'attività neuroprotettiva del composto in studio nei confronti di un danno di tipo ossidativo, si è deciso di valutare l'attività antiossidante del SUL, mediante il test che utilizza il radicale ABTS. Innanzitutto, è stato determinato come l'attività antiossidante totale (TAA) viene ripartita, in condizioni normali, tra citoplasma e membrana. I risultati hanno mostrato come la TAA sia ripartita quasi totalmente a livello del citoplasma (dati non mostrati); per questo si è ritenuto opportuno effettuare le successive determinazioni solo su tale frazione. Successivamente è stata verificata la TAA intrinseca del SUL, utilizzando concentrazioni comprese tra 0,6 e 40 μM . La molecola non è in grado di determinare alcuna variazione significativa nei valori dell'assorbanza del radicale ABTS (dati non mostrati). Una volta accertato, quindi, che il SUL non possiede alcuna attività antiossidante diretta, è stata valutata la sua capacità di aumentare la TAA del citoplasma. Come mostrato in Figura 19, le cellule neuronali trattate per 24 ore con SUL evidenziano un aumento della TAA a tutte le concentrazioni considerate, con un massimo alla concentrazione di 5 μM (84%).

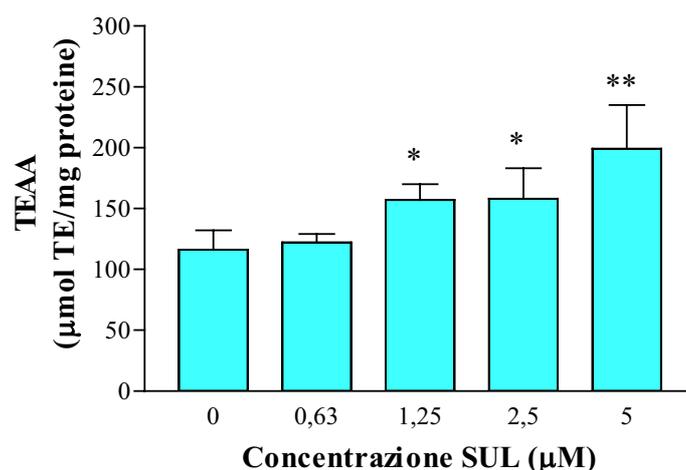


Figura 19. Attività antiossidante totale della frazione citoplasmatica di cellule SH-SY5Y dopo trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; t-test).

Successivamente è stato stimato se l'attività neuroprotettiva del SUL, intesa in termini di attività antiapoptotica, persiste 24 ore dopo aver rimosso la sostanza. Come si evince dalla Figura 20, alla concentrazione 5 μM di SUL si assiste ad un decremento della frammentazione del DNA, indotta dal trattamento con H_2O_2 , paragonabile a quello ottenuto dopo 24 ore di pre-trattamento.

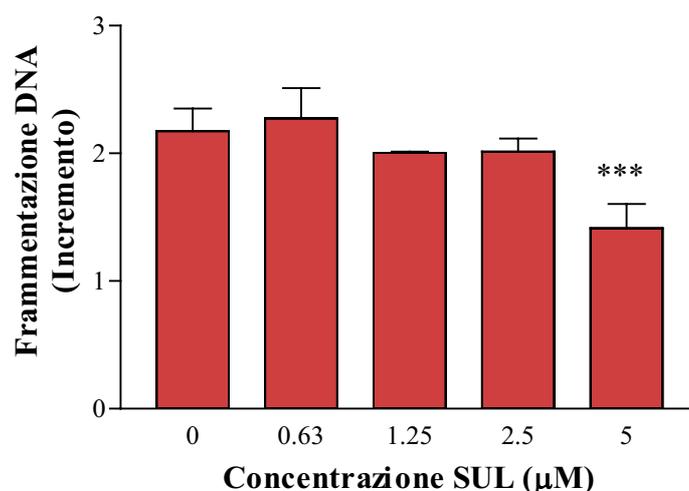


Figura 20. Frammentazione del DNA in cellule SH-SY5Y esposte ad H_2O_2 (300 μM) dopo trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di SUL e successiva incubazione di 24 ore in DMEM (2% FBS). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$; t-test).

Una volta appurato che gli effetti neuroprotettivi del SUL persistono dopo aver rimosso la sostanza, è stata determinata la sua capacità di aumentare i livelli intracellulari del GSH e l'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH (GST, GPx e GR) e nella detossificazione della 6-OHDA (NADPH-QR). Il trattamento dei neuroni con SUL è in grado di indurre un aumento dose (fig. 21) e tempo (fig. 22) correlato dei livelli del GSH, registrando un aumento massimo dopo 24 ore di trattamento alla concentrazione 5 μM (163%). Il SUL, inoltre, incrementa l'attività degli

enzimi GST, GR e NADPH-QR, mentre non si è verificato alcun aumento significativo dei livelli di attività dell'enzima GPx (fig. 23).

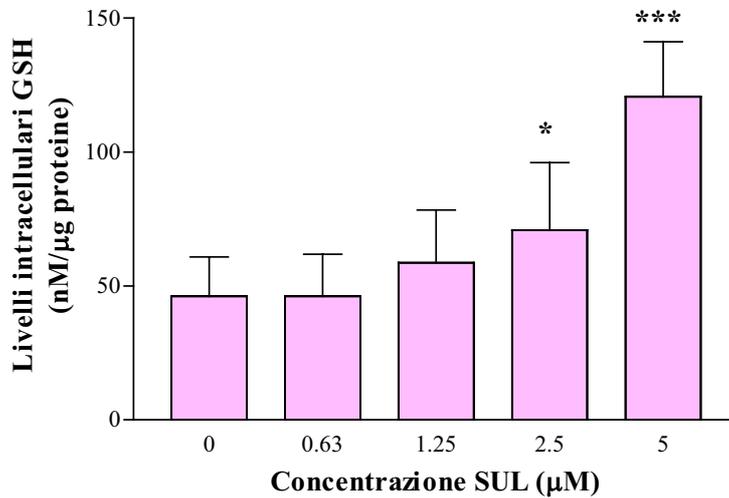


Figura 21. Livelli intracellulari di GSH in cellule SH-SY5Y in seguito a trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; t-test).

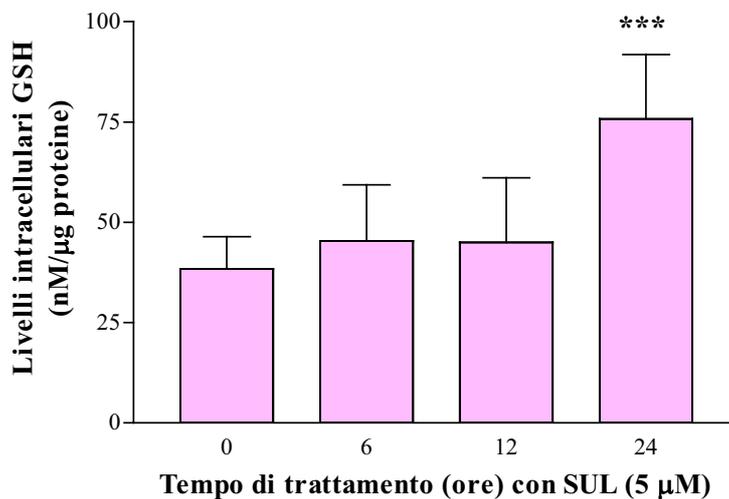


Figura 22. Livelli intracellulari di GSH in cellule SH-SY5Y in seguito a trattamento di 6, 12 e 24 ore con SUL (5 µM). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$; t-test).

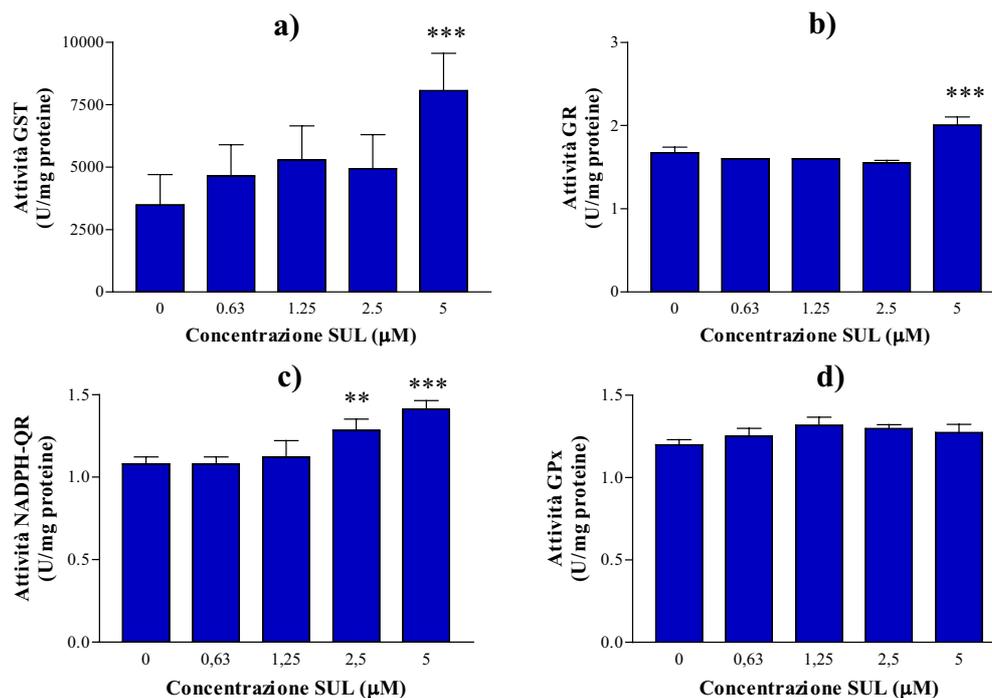


Figura 23. Attività degli enzimi GST (a), GR (b), NADPH-QR (c) e GPx (d) in cellule SH-SY5Y dopo trattamento di 24 ore con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; t-test).

Per confermare il ruolo del GSH nei meccanismi di neuroprotezione del SUL è stato impiegato un noto inibitore della sintesi del GSH, la butionin sulfossimina (BSO). Come si può notare nella Figura 24, l'effetto neurocitoprotettivo del SUL, in termini di attività mitocondriale, viene annullato dalla presenza nel terreno di coltura del BSO (400 μ M).

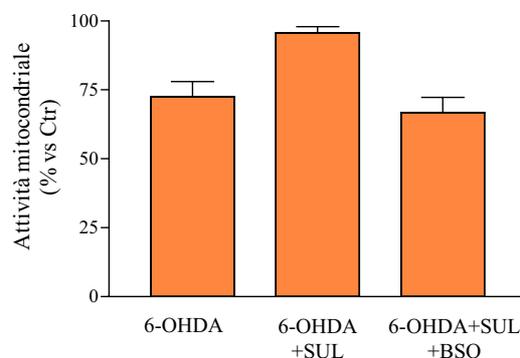


Figura 24. Attività mitocondriale in cellule SH-SY5Y esposte a 6-OHDA (100 μ M) dopo pre-trattamento di 24 ore con SUL (5 μ M) e BSO (400 μ M). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 replicati di un esperimento rappresentativo.

CO- E POST-TRATTAMENTO DEI NEURONI CON SULFORAFANE

Nella seconda fase della sperimentazione si è proceduto con la valutazione dell'attività neuroprotettiva del SUL, intesa in termini di capacità di recuperare il danno neuronale indotto dalla 6-OHDA. Allo scopo i neuroni sono stati trattati con concentrazioni di SUL non associate a neurotossicità (0,63-2,5 μM) durante e dopo il trattamento con 6-OHDA (100 μM), rispettivamente per 3 e 15 ore. La capacità di recupero del danno è stata valutata come attività antiapoptotica, con il test dell'Annexina-V. Come si evince dalle Figure 25 e 26, il co- e il post-trattamento con SUL inducono un netto decremento di cellule apoptotiche. L'effetto, in entrambe le condizioni sperimentali, si è dimostrato statisticamente significativo e dose dipendente, nell'ordine di micro e nanomoli, evidenziando un'elevata specificità nel meccanismo d'azione.

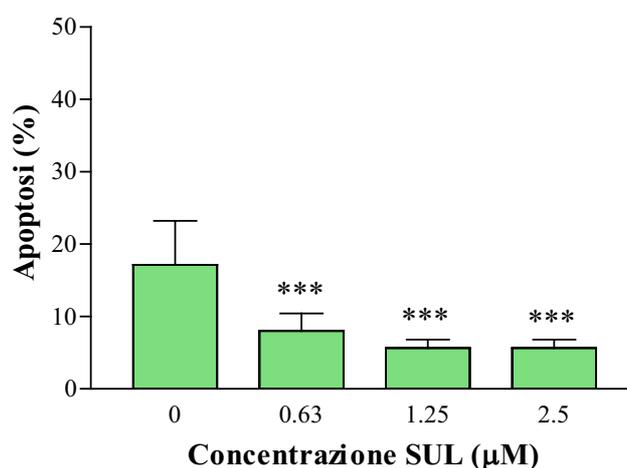


Figura 25. Apoptosi in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) dopo co-trattamento con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$; t-test).

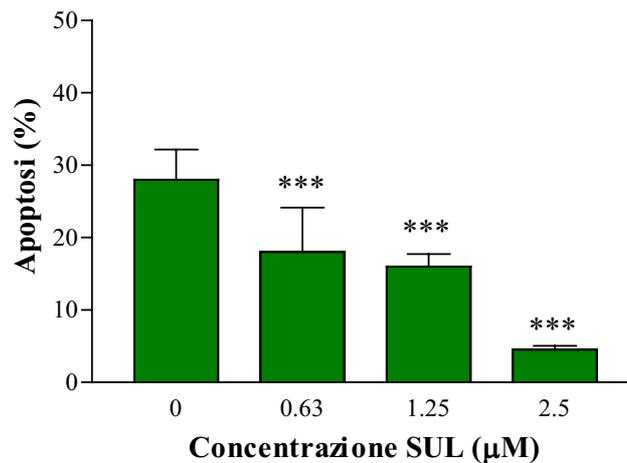


Figura 26. Apoptosi in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 µM) dopo post-trattamento con diverse concentrazioni di SUL. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (Trattato vs non trattato; *** $p < 0,001$; t-test).

Al fine di chiarire i meccanismi cellulari e molecolari che sottendono gli effetti neuroprotettivi del SUL, è stata valutata la sua potenziale capacità di modulare due delle principali vie di sopravvivenza neuronale, la MAPK/ERK e la PI3K/Akt. Allo scopo sono stati utilizzati due inibitori specifici di queste vie di sopravvivenza, il PD98059 (5 µM), un composto in grado di bloccare la proteina MEK, una chinasi a monte dell'attivazione a cascata dell'ERK, e l'LY294002 (10 µM), un inibitore specifico di PI3K. I risultati riportati nelle Figure 27 e 28 mostrano che l'effetto neuroprotettivo, ottenuto dopo il post-trattamento con SUL, viene completamente annullato dalla presenza sia di PD98059 che di LY294002.

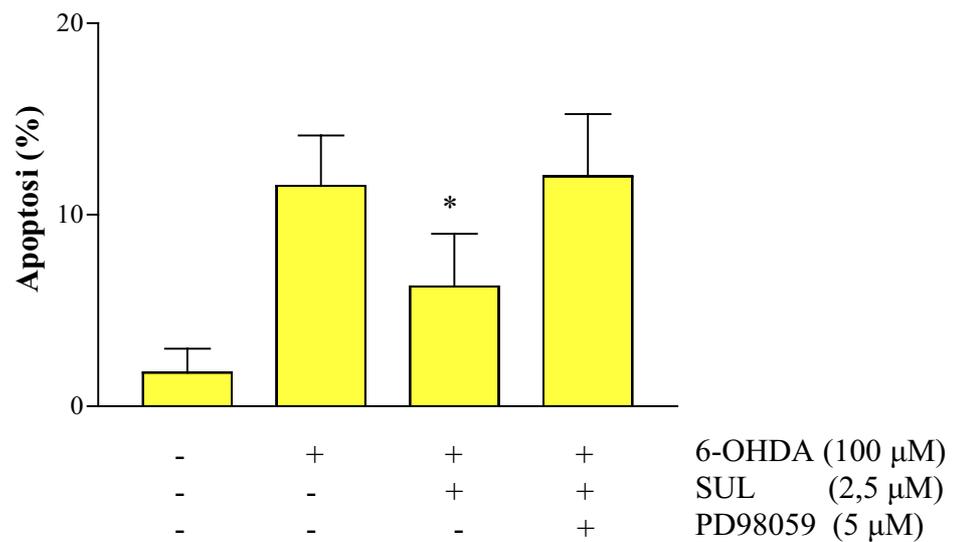


Figura 27. Apoptosi in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) dopo post-trattamento con SUL (2,5 μM) e PD98059 (5 μM). I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (* $p < 0,05$ vs trattato con 6-OHDA; t-test).

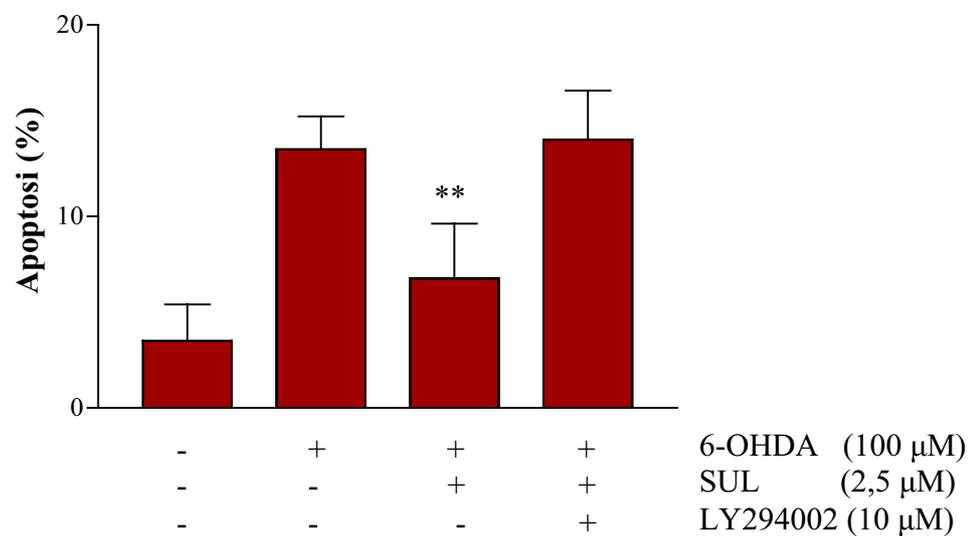


Figura 28. Apoptosi in cellule SH-SY5Y trattate con 6-OHDA (100 μM) dopo post-trattamento con SUL (2,5 μM) e LY294002 (10 μM). I risultati sono espressi come media ± deviazione standard di 3 esperimenti indipendenti. (** $p < 0,01$ vs trattato con 6-OHDA; t-test).

In ultimo, con la tecnica del Western Blot è stata valutata la capacità del SUL di modulare la fosforilazione delle proteine ERK e Akt dopo tempi diversi di trattamento (1, 2 e 3 ore) delle cellule SH-SY5Y, in assenza di 6-OHDA. Il SUL induce un incremento transiente dei livelli di proteine ERK (fig. 29) e Akt (fig. 30) fosforilate, con un massimo rispettivamente di 1,6 e di 1,8 dopo 1 ora di trattamento. Contemporaneamente, sono stati determinati anche i livelli di ERK e Akt totali che non hanno evidenziato sostanziali modifiche dopo trattamento con SUL.

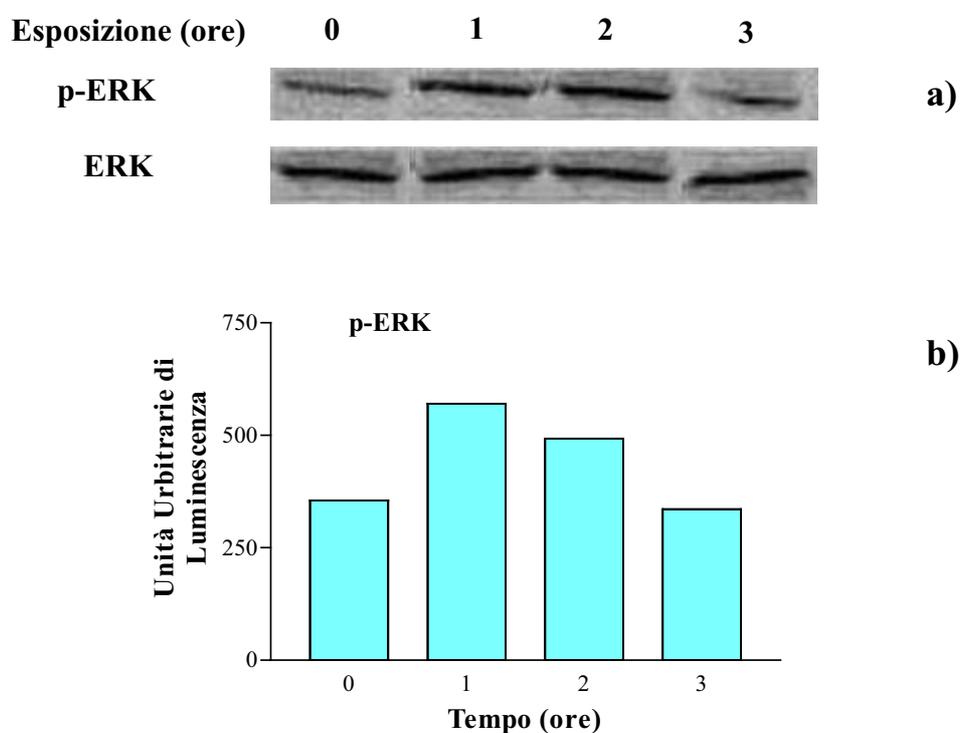


Figura 29. Attivazione di ERK in cellule SH-SY5Y dopo tempi diversi di trattamento con SUL 2,5 μ M. a) livelli di proteina fosforilata e totale determinati con la tecnica del Western Blot; b) livelli di proteina fosforilata espressi come Unità Arbitrarie di Luminescenza. I risultati sono riferiti ad un esperimento rappresentativo.

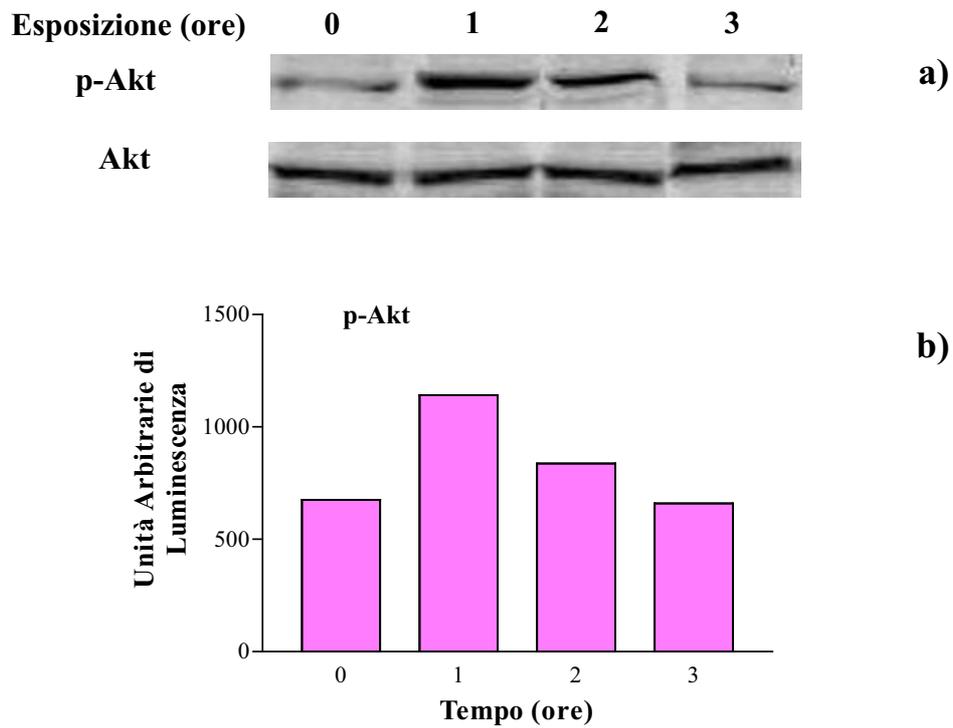


Figura 30. Attivazione di Akt in cellule SH-SY5Y dopo tempi diversi di trattamento con SUL 2,5 μ M. a) livelli di proteina fosforilata e totale determinati con la tecnica del Western Blot; b) livelli di proteina fosforilata espressi come Unità Arbitrarie di Luminescenza. I risultati sono riferiti a un esperimento rappresentativo.

5. DISCUSSIONE

Analisi di tessuti post-mortem di pazienti affetti da PD e studi sperimentali condotti su modelli animali e su colture cellulari mostrano un evidente coinvolgimento della morte neuronale di tipo apoptotico, quale evento finale nella patogenesi di questo disordine neurodegenerativo.

Attualmente la sfida che i ricercatori sono chiamati a sostenere riguarda l'identificazione di nuove molecole di sintesi o di origine naturale in grado di interferire in maniera specifica con eventi critici del PD. In particolare, l'indagine si è focalizzata sulla possibilità di prevenire l'innescò o bloccare l'evoluzione dell'apoptosi, dati i lunghi tempi di esecuzione e la presenza di fasi iniziali reversibili.

Recenti studi *in vivo* riportano, oltre agli ormai assodati effetti anticancerogeni degli isotiocianati, interessanti effetti neuroprotettivi. In particolare, il SUL e il suo glucosinolato, la glucorafanina, si sono dimostrati in grado di ridurre fenomeni infiammatori e ischemici a livello del SNC, evidenziando in tal modo come il SUL sia in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica e di contrastare eventi patogenici a livello neuronale (42-44).

Alla luce di queste evidenze sperimentali è stata condotta la ricerca oggetto della presente tesi, che si è posta l'obiettivo di indagare la potenziale azione neuroprotettiva del SUL in un modello sperimentale *in vitro* di PD che impiega una neurotossina specifica, la 6-OHDA e uno dei principali metabolici della reazione di auto-ossidazione della 6-OHDA, l' H_2O_2 .

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trattamento dei neuroni dopaminergici con SUL è in grado di contrastare il processo apoptotico

indotto dalla 6-OHDA o dall' H_2O_2 in momenti distinti del danno neuronale: prima, durante e dopo il trattamento ossidativo. L'effetto neuroprotettivo si è dimostrato correlato con le concentrazioni di SUL, nell'ordine dei micro e nanomoli, evidenziando una elevata specificità nel meccanismo d'azione neuroprotettivo.

I risultati hanno mostrato che il trattamento prolungato di 24 ore delle cellule neuronali con SUL è in grado di prevenire la formazione di neuroni apoptotici indotta dai due ossidanti. L'effetto antiapoptotico è stato confermato anche dalla sua capacità di inibire la frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi-3 e -9. Gli effetti neuroprotettivi della molecola in studio non sono immediati, ma richiedono un trattamento di almeno 24 ore e persistono anche 24 ore dopo aver rimosso la sostanza, confermando l'ipotesi che il SUL necessita della sintesi ex novo di molecole ed enzimi ad attività antiossidante per esplicare la sua azione.

Allo scopo di valutare se l'effetto neuroprotettivo del SUL fosse da imputare alla sua azione antiossidante, è stata determinata la sua capacità di agire come scavenger di ROS e di aumentare le difese antiossidanti dei neuroni. I risultati hanno evidenziato l'attività antiossidante indiretta del SUL, in quanto esso, come tale non è in grado di neutralizzare i ROS, mentre i neuroni dopaminergici trattati con la molecola in studio presentano un aumento della capacità di neutralizzare i radicali liberi a livello citoplasmatico. A conferma dell'attività antiossidante indiretta, i neuroni trattati con la molecola in studio presentano un incremento dei livelli intracellulari di GSH e dell'attività di enzimi coinvolti nel metabolismo del GSH (GST e GR). Tali evidenze sono in accordo, per dosi e tempi di trattamento, con quelle presenti nella letteratura scientifica: in particolare, il SUL si è dimostrato in grado di ridurre il danno causato da ossidanti di natura diversa in cellule dell'epitelio della retina umana

(ARPE-19), in cheratinociti umani (HaCaT) ed in cellule leucemiche di topo (L1210) (45). Il SUL inoltre riesce ad aumentare l'attività dell'enzima NADPH-chinone reduttasi, un enzima coinvolto in maniera specifica nella detossificazione del chinone che si genera dalla reazione di auto-ossidazione della 6-OHDA. Alla luce di questi risultati si può ipotizzare che il SUL eserciti la sua azione neuroprotettiva nei confronti dell'apoptosi indotta dalla 6-OHDA, favorendo l'eliminazione del corrispondente chinone e dell' H_2O_2 che si formano dalla reazione di auto-ossidazione della neurotossina a livello intracellulare. Quest'ipotesi viene confermata da un recente lavoro di Han et al. in cui è stata dimostrata la capacità del SUL di proteggere i neuroni dopaminergici dal danno indotto dalla 6-OHDA, grazie all'aumento dell'espressione di mRNA e dell'attività dell'enzima NADPH-chinone reduttasi (46).

Inoltre, il SUL mostra interessanti effetti neuroprotettivi durante e dopo l'induzione del danno ossidativo, i quali sono riconducibili probabilmente a meccanismi diversi da quelli di attività antiossidante indiretta. Per chiarire i meccanismi molecolari e cellulari alla base di questa capacità di recupero neuronale, è stata valutata la modulazione di due delle principali vie di sopravvivenza neuronale: la MAPK/ERK e la PI3K/Akt. Allo scopo, sono stati utilizzati due inibitori specifici di queste vie di sopravvivenza, il PD98059, un composto in grado di bloccare l'attività chinasi di MEK, responsabile dell'attivazione finale di ERK, e l'LY294002, un inibitore specifico di PI3K. In particolare, dai risultati ottenuti, l'effetto transiente di fosforilazione di ERK e Akt dopo trattamento di poche ore dei neuroni dopaminergici con SUL e l'abolizione dell'effetto neuroprotettivo con il PD98059 e l'LY294002, suggerisce che il SUL agisca attraverso l'attivazione di queste vie di sopravvivenza a monte della proteina MEK o Akt. Alla luce di questi risultati si può quindi

ipotizzare che il SUL agisca a livello di protein chinasi, tra cui Raf e PKC, responsabili dell'attivazione di MEK e, data la possibilità di un *cross-talk* tra le vie MAPK/ERK e PI3K/Akt, dell'attivazione di Akt. Risultati analoghi di una aumentata fosforilazione di ERK e Akt ad opera del SUL sono stati riportati anche da altri autori in cellule umane intestinali (Caco-2) (47). A conferma della nostre ipotesi, Yu et al. (48) hanno dimostrato che la fosforilazione di ERK in epatociti umani (HepG2) e di topo (Hepal1c1c7), dopo trattamento con SUL, è da imputare essenzialmente all'attivazione diretta della proteina Raf. Inoltre, Zhang et al. (49) riportano che il SUL aumenta i livelli di tioredoxina riduttasi mediante l'attivazione di PKC e successiva fosforilazione del fattore di trascrizione Nrf. Il trasferimento a livello nucleare di Nrf, e di altri fattori di trascrizione come CREB, è un evento cruciale nell'induzione di molecole ed enzimi ad attività antiossidante mediata dal SUL.

Dal punto di vista meccanicistico, l'attivazione di queste chinasi può essere la conseguenza di una loro diretta interazione con il SUL, come dimostrato nel caso di Raf (48). Infatti, il SUL è una molecola con spiccate proprietà elettrofile, in grado quindi di formare legami covalenti con gruppi sulfidrilici di aminoacidi presenti in numerose proteine, modificandone lo stato conformazionale e la loro attività.

Non si può, comunque, escludere anche un'attivazione indiretta di questi bersagli molecolari. Una recente review di Mattson e Cheng (50) mette in evidenza come l'attivazione di chinasi coinvolte nella sopravvivenza neuronale da parte di composti naturali presenti nei vegetali, compresi gli ITC, può essere la conseguenza di un fenomeno di “neuro-ormesi”, una risposta adattativa cellulare causata da uno stress ossidativo sub-tossico. In questo contesto, è noto che gli ITC possono causare un

transitorio stress ossidativo in seguito ad una parziale deplezione nel pool cellulare di GSH (51).

Il SUL, quindi, si è dimostrato in grado di prevenire e bloccare il processo neurodegenerativo e persino promuovere processi di recupero neuronale. I risultati hanno indicato che il SUL può agire modulando diversi processi intracellulari e ciò contribuisce a rendere complessa la sua azione neuroprotettiva. Gli effetti neuroprotettivi di un singolo composto infatti, non si possono imputare all'interazione con un unico processo biologico, ma alla modulazioni di molteplici eventi cellulari responsabili della neurodegenerazione.

In conclusione, l'assunzione di ITC, e più in generale, di glucosinolati, come pool bioattivi presenti nella dieta o in specifiche preparazioni ad uso di integratori alimentari, può essere consigliata nell'ambito di una prevenzione primaria, in soggetti con un rischio elevato di sviluppare PD, ma anche in una prevenzione secondaria, in soggetti affetti da PD al fine di rallentare il processo neurodegenerativo.

Non da ultimo, l'attività neuroprotettiva del SUL può porre le basi per lo sviluppo clinico di questa molecola nel controllo della neurodegenerazione.

6. BIBLIOGRAFIA

1. <http://www.iss.it>.
2. Ministero della Salute – Relazione sullo stato sanitario del Paese 2001 – 2002.
3. Chen S. and Le W. Neuroprotective Therapy in Parkinson Disease. *American Journal of Therapeutics* 13, 445-457, 2006.
4. Szeto H.H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. *The AAPS Journal* 8 (3), E521-531, 2006.
5. Artal-Sanz M., Tavernarakis N. Proteolytic mechanisms in necrotic cell death and neurodegeneration. *FEBS Letters* 579, 3287-396, 2005.
6. Alimonti A., Bocca B., Forte G., Pino A., Ruggieri F. Morbo di Parkinson: biomonitoraggio degli elementi chimici e del danno ossidativo. *Rapporti ISTISAN* 05/23.
7. Gwinn-Hardy K. Genetics of parkinsonisms. *Movement Disorders*, 17(4), 2002.
8. Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature Reviews* 1, 120-129, 2000.
9. Lossi L., Merighi A. In vivo cellular and molecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology*, 69, 287-312, 2003.
10. Cui K., Luo X., Xu K., Ven Murthy M. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28, 771-799, 2004.

11. Barnham K.J., Masters C.L., Bush A.I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature Reviews*, 3, 205-214, 2004.
12. Dawbarn D. and Alle S.J. Neurotrophins and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 29, 211-230, 2003.
13. Yuan J. and Yankner B.A. Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, 802-809, 2000.
14. Kaplan D.R. and Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 10, 381-391, 2000.
15. Sen P., Mukherjee S., Ray D. Raha S. Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes. *Molecular and cellular Biochemistry*, 253, 241-246, 2003.
16. Schroeter H., Boyd C., Spencer J.P.E., Williams R.J., Cadenas E., Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiology of Aging*, 23, 861-880, 2002.
17. Shaul Y.D. and Seger R. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica and Biophysica Acta*. In press.
18. Flint Beal M. Experimental model of Parkinson's Disease. *Nature Reviews*, 2, 326-332, 2001.
19. Blum D., Torch S., Lambeng N., Nissou M., Benabid A.L., Sadoul R., Verna J.M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 65(2), 135-172, 2001.
20. Petrovitch H., Ross G.W., Abbott R.D., Sanderson W.T., Sharp D.S., Tanner C.M., Masaki K.H., Blanchette P.L., Popper J.S., Foley D.,

- Launer L., White L.R. Plantation work and risk of Parkinson disease in population-based longitudinal study. *Archives of Neurology*, 59(11), 1787-1792, 2002.
21. Betarbet R., Sherer T.B., Mackenzie G., Garcia-Osuna M., Panov A.V., Greenamyre J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1301-1306, 2000.
22. Hogglinger G.U., Feger J., Prigent A., Michel P.P., Parain K., Champy P., Ruberg M., Oertel W.H., Hirsch E.C. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. *Journal of Neurochemistry*, 84(3), 491-502, 2003.
23. Kirik D. and Bjorklund A. Modeling CNS neurodegeneration by overexpression of disease-causing proteins using viral vectors. *Trends in neuroscience*, 26(7), 386-392, 2003.
24. McNaught K.S. and Olanow C.W. Proteolytic stress: a unifying concept for the etiopathogenesis of parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 53:S73-S84, 2003.
25. Reichmann H. Neuroprotection in idiopathic Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 249, III/21-III/23, 2002.
26. Youdim K.A., Joseph J.A: A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 6583-6594, 2001.
27. Noyan-Ashraf, Sadeghinejad Z., Juurlink B.H. Dietary approach to decrease aging-related CNS inflammation. *Nutritional neuroscience*, 8(2), 101-110, 2005.
28. Esposito E., Rotilio D., Di Matteo V., Di Giulio C., Cacchio M., Algeri S. A review of specific dietary antioxidants and the effects on

- biochemical mechanisms related to neurodegenerative processes. *Neurobiology of Aging*, 23, 719-735, 2002.
29. Holst B., Williamson G. A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat. Prod. Rep.*, 21, 425-447, 2004.
30. Matusheski N., Jeffery E. Comparison of the Bioactivity of Two Glucoraphanin Hydrolysis Products Found in Broccoli, Sulforaphane and Sulforaphane Nitrile. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5743-5749, 2001.
31. Noyan-Ashraf M.H., Sadeghinejad Z., Juurlink B.H.J. Dietary approach to decrease aging-related CNS inflammation. *Nutritional neuroscience*, 8(2), 101-110, 2005.
32. Keck A., Finley J. Cruciferous Vegetables: Glucosinolate Hydrolysis Products and Selenium. *Integrative cancer therapies*, 3, 5-12, 2004.
33. Mattson M.P. Neuronal life-death signalling, apoptosis and neurodegenerative disorders. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8, 1997-2006, 2006.
34. Levites Y., Youdim M.H., Maor G., Mandel S. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA) – induced nuclear factor-kappa B (NF-kB) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochemical Pharmacology*, 63, 21-29, 2002.
35. Mercer L.D., Kelly B.L., Horne M.K., Beart P.M. Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochemical Pharmacology*, 65, 339-345, 2005.
36. Zbarsky V., Datla K.P., Parkar S., Rai K.D., Aruoma O.I., Dexter D.T. Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants

- curcumin and narigenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radical Research*, 39, 1119-1125, 2005.
37. Movsesyan V.A., Yakovlev A.G., Dabaghyan E.A., Stoica B.A., Faden A.I. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 299 (2), 201-207, 2002.
38. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (Lond.)*. 84 (4), 407-412, 1993.
39. Allen S., Shea J.M., Felmet T., Gadra J., Dehn P.F. A kinetic microassay for glutathione in cells plated on 96-well microtiter plates. *Methods in Cell Science*, 22, 305-312, 2001.
40. Sharma S., Nemezc S.K., Zhu S., Steele V.E. Identification of chemopreventive agents by screening for identification of glutathione-S-transferase as a biomarker. *Methods in Cell Science*, 19, 49-52, 1997.
41. Prochaska H.J., Santamaria A.B. Direct measurement of NAD(P)H:Quinone reductase from cells cultures in microtiter wells, a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Analytical Biochemistry*, 169, 328-336, 1988.
42. Zhao J., Moore A.N., Clifton G.L., Dash P.K. Sulforaphane enhances Aquaporin-4 expression and decreases cerebral edema following traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Research*, 82, 499-506, 2005.

-
43. Noyan-Ashraf M.H., Sadeghinejad Z., Juurlink B.H. Dietary approach to decrease aging-related CNS inflammation. *Nutritional Neuroscience*. 8, 101-110, 2005.
44. Zhao J., Kabori N., Aronowski J., Dash P.K. Sulforaphane reduces infarct volume following focal cerebral ischemia in rodents. *Neuroscience Letters*. 393, 108-112, 2006.
45. Gao X., Dinkova-Kostova A., Talalay P. Powerful and prolonged protection of human retinal pigment epithelial cells, keratinocytes and mouse leukaemia cells against oxidative damage: The indirect antioxidant effects of sulforaphane. *PNAS*, 98(26), 15221-15226, 2001.
46. Han J.M., Lee Y.J., Kim E.M., Moon Y., Kim H.W., Hwang O. Protective effect of sulforaphane against dopaminergic cell death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007. In press.
47. Jakubikova J., Sedlak J., Mithen R., Bao Y. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK signalling pathways in sulforaphane- and erucin-induced phase II enzyme and MP2 transcription, G₂/M arrest and cell death in Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, 69, 1543-1552, 2005.
48. Yu R., Wei L., Mandlekar S., Weber M.J. Role of a Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in the Induction of Phase II Detoxifying enzymes by chemicals. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 27545-27552, 1999.
49. Zhang J., Svehlikova V., Bao Y., Howie A.F., Beckett G.J., Williamson G. Synergy between sulforaphane and selenium in the induction of thioredoxin reductase 1 requires both transcriptional and translational modulation. *Carcinogenesis*. 24(3), 497-503, 2003.

50. Mattson M.P., Cheng A. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends in Neurosciences*. 29(11), 632-639, 2006.
51. Zhang Y., Li J., Tang L. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators. *Free Radical Biology & Medicine*. 38, 70-77, 2005.

7. PUBBLICAZIONI

Durante gli anni di Dottorato di Ricerca, sono stati pubblicati i seguenti lavori in extenso e comunicazioni a congressi:

LAVORI IN EXTENSO

1. Tarozzi A., Hrelia S., Angeloni C., **Morrone F.**, Biagi P., Guardigli M., Cantelli-Forti G., Hrelia P. Antioxidant effectiveness of organically and non-organically grown red oranges in cell culture systems. *Eur. J. Nutr.*(2006) 45:152-158.
2. Antonello A., Tarozzi A., **Morrone F.**, Cavalli A., Rosini M., Hrelia P., Bolognesi M.L., Melchiorre. One-molecule-multiple-targets strategy: a novel multifunctional molecule designed to block the epidermal growth factor (EGFR) and to exert pro-apoptotic effects. *J. Med. Chem.* (2006) 49 (23):6642-5.
3. Tarozzi A., **Morrone F.**, Angeloni C., Hrelia S., Marchesi A., Cantelli Forti G., Hrelia P. Neuroprotective effects of Anthocyanins and their compounds generated in vivo during metabolism in SH-SY5Y cells. Submitted to *Brain Research*.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI

1. Tarozzi A., Marchesi A., **Morrone F.**, Cantelli Forti G., Hrelia P. The need for photosafety testing of drugs. *Photobiology 2004 – 2nd*

- Joint Meeting of the Italian Society for Photobiology and the French Society for Photobiology*. Pisa, 10-11 September 2004, pag. 18.
2. Marchesi A., Tarozzi A., **Morrone F.**, Cantelli Forti G., Hrelia P. Photoprotective effects of cyanidin-3-O- β -glucopyranoside against UVA-induced oxidative damage in human keratinocytes. *Photobiology 2004 – 2nd Joint Meeting of the Italian Society for Photobiology and the French Society for Photobiology*. Pisa, 10-11 September 2004, pag. 52.
 3. Tarozzi A., **Morrone F.**, Marchesi A., Angeloni C., Hrelia S., Cantelli Forti G., Hrelia P. New strategies for neurodegenerative diseases: *in vitro* antiapoptotic and antioxidant effects of sulforaphane in SH-SY5Y cells. *32° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia*. Napoli, 1-4 giugno 2005, pag. 72.
 4. Tarozzi A., **Morrone F.**, Marchesi A., Angeloni C., Hrelia S., Merlicco A., Cantelli Forti G., Hrelia P. Protective effects of sulforaphane against oxidative stress-induced apoptosis in human neuronal cells. *Oxidants and antioxidants in biology – A Joint Meeting of the Oxygen Club of California*. Alba, 7-10 settembre 2005, pag 215.
 5. **Morrone F.** Antiapoptotic and antioxidant effects of sulforaphane in SH-SY5Y cells. *IX Seminario Nazionale per Dottorandi in Farmacologia e Scienze affini*. Siena-Certosa di Pontignano, 20-23 settembre 2005.

6. **Morroni F.**, Tarozzi A., Cantelli Forti G., Hrelia P. Effetti antiapoptotici e antiossidanti della cianidina-3-O- β -glucopiranoside e del suo aglicone in una linea neuronale umana. *XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia*. Roma, 6-9 febbraio 2006, pag. 238.
7. Tarozzi A., **Morroni F.**, Merlicco A., Cantelli Forti G., Hrelia P. Effetti neurocitoprotettivi di isotiocianati. *II Congresso Intersocietà sulle Piante Medicinali. FITOMED 2006*. Taormina, 6-8 luglio 2006, pag. 39.
8. **Morroni F.**, Tarozzi A., Merlicco A., Cantelli Forti G., Hrelia P. Effetti neurocitoprotettivi delle antocianine in una linea neuronale umana. *II Congresso Intersocietà sulle Piante Medicinali. FITOMED 2006*. Taormina, 6-8 luglio 2006, pag. 40.
9. **Morroni F.** Sulforaphane protects SH-SY5Y cells against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress. *X Seminario Nazionale per Dottorandi in Farmacologia e Scienze affini*. Siena-Certosa di Pontignano, 25-28 settembre 2006.
10. Tarozzi A., **Morroni F.**, Merlicco A., Angeloni C., Hrelia S., Cantelli Forti G., Hrelia P. Sulforaphane inhibits 6-hydroxydopamine-induced apoptosis by upregulation of MEK/ERK and PI3K/Akt in human neuronal cells. *33° Congresso Nazionale della Società Italiana di Farmacologia*. Cagliari, 6-9 giugno 2007. Submitted

11. Hrelia P., Tarozzi A., **Morroni F.**, Merlicco A., Angeloni C. Hrelia S., Cantelli Forti G. Sulforaphane counteracts oxidative stress-induced apoptosis in human neuronal cells. *International Congress of Toxicology*. Montreal, 15-19 luglio 2007. Submitted.
12. Tarozzi A., **Morroni F.**, Merlicco A., Angeloni C., Hrelia S., Cantelli Forti G., Hrelia P. Sulforaphane protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell apoptosis. *Molecular mechanisms of neurodegeneration. 3RD Meeting*, Milano, 19-21 maggio 2007. Submitted.
13. Merlicco A., Tarozzi A., **Morroni F.**, Cantelli Forti G., Hrelia P. Protective effects of guanosine against beta amyloid peptide (1-25-35)-induced apoptosis in human neuronal cells. *Molecular mechanisms of neurodegeneration. 3RD Meeting*, Milano, 19-21 maggio 2007. Submitted.

8. APPENDICE

La ricerca oggetto della presente tesi è stata svolta in ottemperanza alle leggi vigenti di sicurezza in ambienti di lavoro (D.L.vo 626/94 e seguenti). Le procedure sperimentali sono state eseguite in accordo alle Procedure Operative Standard (SOPs) dei laboratori di Tossicologia Genetica del Dipartimento di Farmacologia, Università degli Studi di Bologna come previsto dalle OECD-GLP per la valutazione dei composti chimici.

- OECD, 1982. Good Laboratory Practice in the Texting of Chemicals.
- OECD, 1988. Final Report of the Working Group on Mutual Recognition of Compliance with Good Laboratory Practice.
- CEE, 1986. Direttiva del Consiglio del 18/12/86, concernente il riavvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative relative all'applicazione dei principi di buone prassi di laboratorio e al controllo della loro applicazione per le prove sulle sostanze chimiche (87/18/CEE).
- Gazzetta Ufficiale n. 198 del 27/8/86. DM 26 Giugno 1986: applicazione dei principi di buone pratiche di laboratorio sulle sostanze chimiche e criteri per il rilascio delle autorizzazioni previste dal DPR n. 927/81, art. 6.