

Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”

Effetti di nicotina su monocito/macrofagi umani:  
produzione di anione superossido, liberazione di  
citochine e attivazione del fattore NF- $\kappa$ B

**Dottorato in Medicina Molecolare XX ciclo**  
**Tutor: Prof.ssa Sandra Brunelleschi**  
**Dottorando: Dr. Gabriele Gunella**

E' ben noto come il fumo di sigaretta contribuisca all'insorgere di numerose patologie: polmonari, cardiovascolari e neoplastiche (Conti-Fine et al. 2000). Data l'elevata complessità di composizione e di costituenti (Stedman, 1968) è poco agevole individuare quale sia il componente più dannoso o direttamente implicato in una data patologia. Numerosi studi indicano come le specie reattive dell'ossigeno e i radicali policiclici aromatici siano i maggior responsabili della tossicità del fumo, e la nicotina sia il principale responsabile della dipendenza.

Il fumo di tabacco viene considerato il maggior fattore di rischio nell'aterosclerosi e in patologie cardiovascolari correlate. I macrofagi rappresentano la prima linea di difesa verso una grande quantità di stimoli infiammatori e infettivi. Tali cellule rilasciano numerosi fattori tra cui citochine proinfiammatorie, le quali inducono espressione e rilascio di molecole di adesione in cellule endoteliali, promuovendo l'interazione endotelio-leucociti nella risposta infiammatoria. (Wang et al. 2004)

La nicotina presenta svariate azioni sul sistema immunitario. Somministrata per via transdermica inibisce la secrezione di citochine da monociti (van Dijk et al. 1998). Utilizzata per studi in vitro, alla concentrazione di 200 ng/ml, inibisce il release di citochine fino al 40% (Ouyang et al 2000). In linfociti da sangue periferico, utilizzata a concentrazioni da  $10^{-7}$ M a  $10^{-5}$ M, inibisce la produzione di IL-2 e TNF- $\alpha$  fino al 50%. (Madretsma et al. 1996). Utilizzando linee cellulari monocito-macrofagiche, come ad esempio U937, la nicotina riduce l'espressione di IL-1, IL-8 e PGE<sub>2</sub> indotta da trattamento con LPS (Sugano et al. 1998)

Nicotina ed agonisti nicotinici intervengono anche sulla produzione di anione superossido. In macrofagi alveolari di cavia la nicotina a basse concentrazioni (0.5-5nM) potenzia la produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> indotta da zimosano, mentre ad alte dosi (50-500 nM) la inibisce (Ogunbiyi e Misra, 1989). In mitocondri cerebrali di ratto, nicotina inibisce il release di specie reattive dell'ossigeno (ROS) interagendo con il complesso I della catena respiratoria, in particolare con l'enzima NADH/ubichinone reduttasi (Cormier et al., 2001)

Le diverse azioni della nicotina e dei suoi agonisti dipendono dalla grande varietà di subunità che compongono il recettore colinergico nicotinico; sono state clonati infatti i geni di almeno 17 subunità: da  $\alpha 1$  ad  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 4$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ . (Colquhoun et al. 97). Recettori nicotinici neuronali sono espressi anche in cellule di derivazione non-neuronale, come linfociti e granulociti. (Conti-Fine et al. 2000)

Recenti studi hanno dimostrato come in monociti umani da donatore sano nicotina a basse concentrazioni ( $10^{-8}$ M) sia in grado di inibire l'attivazione del fattore NF-kB attraverso l'inibizione della fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$ ; tale meccanismo ha luogo attraverso l'interazione con la subunità alfa7 del recettore nicotinico (Yoshikawa et al. 2006).

## Scopo del lavoro

Al fine di meglio comprendere il ruolo di nicotina e di alcuni agonisti nicotinici, abbiamo valutato la capacità di tali sostanze di modulare il release di citochine, la produzione di anione superossido, l'attivazione del fattore NF-kB in popolazioni monocito-macrofagiche, in vitro, stimulate con PMA LPS , fMLP e tachichinine quali Sostanza P ed NKA

## Materiali e metodi

### *Isolamento di monociti*

I monociti vengono raccolti da campioni di sangue periferico di volontari sani, ottenuti da prelievi tipo “buffy-coat” ed isolati attraverso metodiche standard di sedimentazione in destrano, separazione in gradiente di Ficoll-Paque ( $d=1.077$ , Histopaque®, Sigma) e recupero dall’interfaccia mediante attenta aspirazione. Le cellule così ottenute vengono lavate in PBS e risospese in opportuno terreno (RPMI 1640, 5% FBS, glutamina 2mM, HEPES 10mM, streptomicina 50µm, penicillina 5U/ml) per la conta cellulare (vitalità al test del blu tripano >98%)

L’isolamento dei monociti viene condotto per adesione su piastra di coltura (90 min, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>): le cellule non adese, prevalentemente linfociti, vengono eliminati mediante delicato lavaggio con PBS ed aspirazione.

### *Isolamento di Macrofagi derivanti da Monociti (MDM)*

MDM vengono ottenuti da monociti mantenuti in coltura per 7-10 giorni con terreno RPMI 1640 arricchito da FBS al 20%. Le cellule così trattate vanno incontro a cambiamenti conformazionali e vengono riconosciute come macrofagi mediante la valutazione della diminuzione della presenza del marcatore di superficie CD14. (Brunelleschi et al., 2001).

### *Produzione di anione superossido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)*

La produzione di anione superossido è stata valutata su MDM adesi ( $0.5 - 1 \times 10^6$  cellule/pozzetto), preincubati con nicotina ed agonisti nicotinici a concentrazione crescente, da  $10^{-9}$ M a  $10^{-5}$ M, stimolati con PMA, LPS, SP, fMLP.

Lo studio è stato condotto mediante valutazione spettrofotometrica ( $\lambda=550$  nm) della reazione di riduzione superossido dismutasi (SOD)-sensibile del ferricitocromo C presente nel medium. I dati sono espressi come nmol citocromo C ridotto /  $1 \times 10^6$  cells / 30min, usando un coefficiente di estinzione di 21.1 mM (Brunelleschi *et al.*, 2001; Bardelli *et al.*, 2005). Per evitare interferenze in sede di lettura spettrofotometrica, le cellule sono incubate in terreno RPMI senza rosso fenolo (Brunelleschi *et al.* 1996). Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato o triplicato.

### *Liberazione di citochine*

Monociti e macrofagi (MDM) ( $1 \times 10^6$  cell/pozzetto) sono stati preincubati con nicotina e agonisti nicotinici per 30’ ed in seguito stimolati con PMA, LPS, tachichinine (SP-NKA)

I surnatanti, prelevati e conservati a -20°C, sono stati testati mediante kit ELISA (Pelipair, Sanquin, Olanda) per la valutazione di TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10, secondo le istruzioni del produttore. I limiti di sensibilità per i test ELISA sono stati 1.4 pg/ml, 1.5 pg/ml and 1.3 pg/ml per TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 rispettivamente. IL-10 è stata valutata in quanto principale citochina antinfiammatoria. Non è stata osservata reattività crociata con altre citochine.

## *Valutazione dell'attivazione di NF- $\kappa$ B*

L'attivazione del fattore nucleare NF- $\kappa$ B, mediata da PMA; LPS e tachichinine, è stata valutata su estratti proteici di M e MDM sia mediante tecniche di analisi di migrazione di dimeri attivati nel nucleo, con metodiche EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), che della quantità delle subunità p65 e p50 con metodiche ELISA.

Estratti nucleari (5 $\mu$ g) sono stati incubati con poli (dI-dC) e con una sonda oligonucleotidica marcata con [ $^{32}$ P]-ATP, per 30 minuti in opportuno tampone di binding. Il complesso oligonucleotide-proteina viene separato su gel e le bande radioattive valutate per autoradiografia ed analisi densitometrica. (Bardelli *et al.*, 2005)

Quantità minori di estratto nucleare (1 $\mu$ g) sono state utilizzate per l'analisi delle subunità p50 e p65 presenti nel nucleo mediante test ELISA (Trans-Am<sup>TM</sup> Chemi Kits , Active Motif, Belgio) secondo le istruzioni del produttore. I kit usati legano su piastra la subunità in analisi grazie alla presenza nel pozzetto del rispettivo oligonucleotide di consenso. I dati vengono ottenuti mediante letture in chemiluminescenza ed espressi in RLU (Relative Luminescence Unit).

## **Risultati**

### *Produzione di anione superossido*

Come si può vedere in tabella 1, PMA è lo stimolo più potente nell'indurre la produzione di O<sub>2</sub><sup>-</sup> sia su monociti che su MDM, mentre il peptide chemotattico fMLP (n-formil Met-Leu-Phe), la sostanza P, il principale ligando endogeno del recettore NK1, ed NKA, principale ligando NK2, hanno minore effetto.

La figura 1 espone la produzione basale di anione superossido da monociti e da macrofagi: è chiaro come nicotina di per sé potenzi il release, soprattutto alla concentrazione di 10<sup>-8</sup>M.

Su MDM possiamo vedere (figura 2) come nicotina, utilizzata in un range da 10<sup>-9</sup>M a 10<sup>-5</sup>M inibisca, in maniera concentrazione-dipendente, la produzione di anione superossido indotta da PMA, SP ed NKA. Possiamo rilevare come un massimo di inibizione del 70% venga raggiunto con nicotina 10<sup>-7</sup>M, concentrazione alla quale le curve di inibizione raggiungono il plateau. Interessante notare come la stimolazione con fMLP non produca alcun effetto inibitorio.

L'agonista nicotinico epibatidina presenta un comportamento sostanzialmente simile a quello di nicotina, causando infatti inibizione del 60-70% circa. Il pretrattamento con citisina e con lobelina, agonisti parziali del recettore nicotinico, presenta una minore inibizione, con un massimo di 40% rispetto al controllo. La preincubazione con tutti gli agonisti nicotinici presi in considerazione non produce alcuna inibizione dopo la stimolazione con fMLP.

### *Release di citochine*

Il rilascio di citochine in seguito alla stimolazione con sostanze proinfiammatorie, segue una cinetica tempo-dipendente. Come descritto in tabella 2, il tempo di stimolazione a 24 ore è quello che assicura il release massimale di ogni citochina presa in considerazione. Inoltre, si può vedere come LPS a 10ng/ml sia lo stimolo in assoluto più efficace nel promuovere il release delle principali citochine infiammatorie. La produzione di IL-10, la principale citochina antinfiammatoria, viene assai poco influenzata dagli stimoli proinfiammatori utilizzati.

Al fine di comprendere il ruolo di agonisti nicotinici nel release di citochine, è stata condotta una preincubazione su monociti con citisina e lobelina, oltre che con nicotina, a concentrazioni crescenti

da  $10^{-9}\text{M}$  a  $10^{-5}\text{M}$ , per 24h. In seguito le cellule sono state stimulate con LPS  $10\text{ng/ml}$ , SP  $10^{-6}\text{M}$  ed fMLP  $10^{-6}\text{M}$ . Come esposto in figura 3, la nicotina potenzia in maniera concentrazione-dipendente il release di TNF- $\alpha$  indotto da LPS, fino al 160% rispetto al controllo, alla concentrazione di  $10^{-8}\text{M}$ . La curva di potenziamento espressa da lobelina ha sostanzialmente lo stesso andamento, ma il massimo di potenziamento alla stessa concentrazione di agonista è del 130% circa. L'agonista nicotinico parziale citisina presenta una curva simile a quella di lobelina, ma più spostata verso destra, segno di minor efficacia.

In seguito la preincubazione con nicotina, alle stesse concentrazioni usate in precedenza, è stata condotta a tempi diversi, 6h e 24h, ed è stato valutato il release di TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  da monociti stimolati con PMA  $10^{-7}\text{M}$  ed LPS  $10\text{ng/ml}$ . Anche in questo caso (figura 4) possiamo notare come LPS sia lo stimolo proinfiammatorio più efficace. Inoltre, vediamo come l'azione di nicotina sia tempo-dipendente: infatti le curve relative al tempo 6h non indicano un apprezzabile potenziamento rispetto al controllo. Anche in questo caso il massimo effetto della nicotina si raggiunge quando viene utilizzata tra  $10^{-8}\text{M}$  e  $10^{-7}\text{M}$ .

### *Attivazione di NF-kB*

Studi da noi precedentemente condotti su popolazioni macrofagiche alveolari mostrano come in tali tipologie cellulari, PMA ed LPS attivino il fattore di trascrizione NF-kB (Bardelli et al, 2005, Gunella et al, 2006). Le nostre analisi si sono focalizzate sulla traslocazione delle subunità p65 e p50: infatti il dimero da esse composto è la forma predominante del fattore di trascrizione (Baldwin, 1996).

L'attivazione del fattore NF-kB e la susseguente traslocazione nucleare delle subunità p65 e p50, viene influenzata dalla preincubazione con nicotina. L'effetto di nicotina sull'attivazione di NF-kB è stata valutata mediante metodiche EMSA. Su MDM (figura 5) si può vedere come nicotina, alla concentrazione di  $10^{-6}\text{M}$ , non interviene apprezzabilmente sulla traslocazione, anzi pare inibirla. Al contrario, la preincubazione con nicotina  $10^{-6}\text{M}$  potenzia l'attivazione indotta da LPS  $500\text{ ng/ml}$  di circa 2 volte. Minor modulazione si può constatare su MDM stimolati con sostanza P  $10^{-6}\text{M}$ .

Al fine di ottenere un dato quantitativo riguardo alla traslocazione delle subunità di NF-kB sono state condotti studi con metodiche ELISA. Possiamo vedere in figura 6 come, anche per NF-kB, LPS sia lo stimolo più efficace, e come la subunità p50 sia quella più sensibile agli effetti di traslocazione. Osserviamo infatti un potenziamento del 200% per p65 e del 300% per p50. Nicotina modula in maniera concentrazione-dipendente la traslocazione di entrambe le subunità del fattore NF-kB, con un picco di attivazione alla concentrazione di  $10^{-6}\text{M}$ .

In seguito è stata analizzata la traslocazione di p50 in MDM. Come esposto in Figura 7, nicotina potenzia, anche in questo caso in maniera concentrazione-dipendente, l'attivazione di questa subunità su MDM stimolati con LPS  $100\text{ng/ml}$ . Analogamente ai monociti, il massimo di attivazione, oltre 4 volte rispetto al controllo, si ha alla concentrazione di  $10^{-6}\text{M}$ .

Analoga modulazione si può osservare (Figura 8) in MDM stimolati con le tachichinine sostanza P ed NKA, nei quali avviene alla concentrazione di  $10^{-7}\text{M}$ .

### *Discussione.*

I dati in nostro possesso confermano la capacità di nicotina di modulare l'attività di cellule immunitarie. Già il release basale di anione superossido viene potenziato da nicotina usata da sola, a concentrazione di  $10^{-8}\text{M}$ , su popolazioni monocito-macrofagiche. Tale considerazione ben si accorda a nostre precedenti osservazioni su macrofagi alveolari umani: infatti la produzione basale

di  $O_2^-$  da macrofagi provenienti da fumatori sani è maggiore di quella osservata in soggetti sani non fumatori.(Bardelli et al. 2005). Valutando invece gli effetti di una preincubazione su monocito-macrofagi, in seguito cimentati con stimoli infiammatori, vediamo un'inibizione dose-dipendente modulata da nicotina, utilizzata in un range da  $10^{-9}$  a  $10^{-5}$ M. Le curve di inibizione raggiungono il plateau intorno alla concentrazione di  $10^{-7}$ M.

L'utilizzo di agonisti nicotinici ha mostrato un andamento simile per epibatidina, potente agonista nicotinico con alta specificità per la subunità recettoriale  $\alpha 7$ ; gli agonisti parziali lobelina e citisina non hanno evidenziato un apprezzabile effetto.

Siccome sono già note le caratteristiche del release di citochine da monociti umani stimolati con PMA, LPS, fMLP e tachichinine, abbiamo valutato un' eventuale azione diretta di nicotina su tale effetto. Vediamo infatti che nicotina modula, potenziandolo, il rilascio di citochine proinfiammatorie in maniera concentrazione-dipendente, con ridotta azione su cellule stimulate con fMLP. La concentrazione a cui nicotina sviluppa il maggior effetto è quella intorno a  $10^{-8}$ M. In questo caso, i nostri dati sono in accordo con Aicher et al (2003), che indicava una up-regulation della secrezione citochinica data da nicotina.

Inoltre, precedenti studi hanno dimostrato come la trascrizione di geni codificanti per citochine sia dipendente dall'attivazione di complessi dimerici di NF-kB: in Carter et al (1998) si vede infatti come, in macrofagi alveolari di donatori sani, p50 e p65 si leghino alla sequenza per IL-6, mentre quella per TNF- $\alpha$  sia legata solo da p50; i dati qui esposti mostrano infatti una maggior secrezione di TNF- $\alpha$  ed IL-6 rispetto alle altre citochine prese in considerazione.

Nei monociti ed MDM stimolati con PMA, LPS e tachichinine, il fattore di trascrizione NF-kB è modulato da nicotina, in maniera. concentrazione-dipendente. In questo caso, la concentrazione alla quale nicotina esercita azione di potenziamento si situa intorno a 100nM - 1 $\mu$ M

In conclusione, possiamo dire che la nicotina influenza la produzione di anione superossido, il rilascio di citochine e l'attivazione del fattore NF-kB. Tali dati potrebbero contribuire a spiegare l'aumentata attività basale in monocito-macrofagi alveolari di fumatore sano ( Bardelli et al., 2005; Gunella et al.,2006; Brunelleschi et al 2001)

## Bibliografia

- Aicher et al. Circulation 107 (2003)  
Bardelli *et al.*, Br.J. Pharmacol 145 (2005)  
Brunelleschi et al, Neuropeptides 30 (1996)  
Brunelleschi et al., Br.J. Pharmacol 134 (2001)  
Carter et al Am. J. Respir. Cell. Mol Biol 18 (1998)  
Colquhoun et al. . Adv. Pharmacol. 39 (1997)  
Conti-Fine et al. Eur. J. Pharmacol. 393 (2000)  
Cormier et al., Brain Res 900 (2001)  
Gunella et al, Br.J. Pharmacol (2006)  
Madretsma et al. Immunopharmacology 35 (1996)  
Ogunbiyi e Misra, Toxicol. Appl. Pharmacol. 98 (1989)  
Ouyang et al J. Allergy Clin. Immunol (2000)  
Stedman, Chem Rev 12 (1968)  
Sugano et al. Biochem.Biophys.Res.Comm. 252 (1998)  
van Dijk et al. Eur. J. Clin. Invest. 28 (1998)  
Wang et al. Int.Immunopharm 4 (2004)  
Yoshikawa et al., Clin Exp Immunol, 146 (2006)

**Tabella 1**

**Produzione di anione superossido generato da diversi stimoli**

<b>Tipo cellule</b>	<b>PMA 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>FMPLP 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>SP 10<sup>-6</sup> M</b>	<b>NKA 10<sup>-6</sup> M</b>
Human monocytes (M)	16.5 ± 3.1 (n = 12)	6.5 ± 1 (n = 6)	3.8 ± 0.1 (n = 6)	4.8 ± 0.3 (n = 5)
Monocyte-derived macrophages (MDM)	27.1 ± 2.1 (n = 5)	4.3 ± 0.8 (n = 5)	3.4 ± 0.2 (n = 5)	4.5 ± 0.2 (n = 5)

Produzione di superossido espressa come nmoli citocromo C ridotto / 10<sup>6</sup>cellule/ 30 minuti. Dati espressi come media ± e.s.

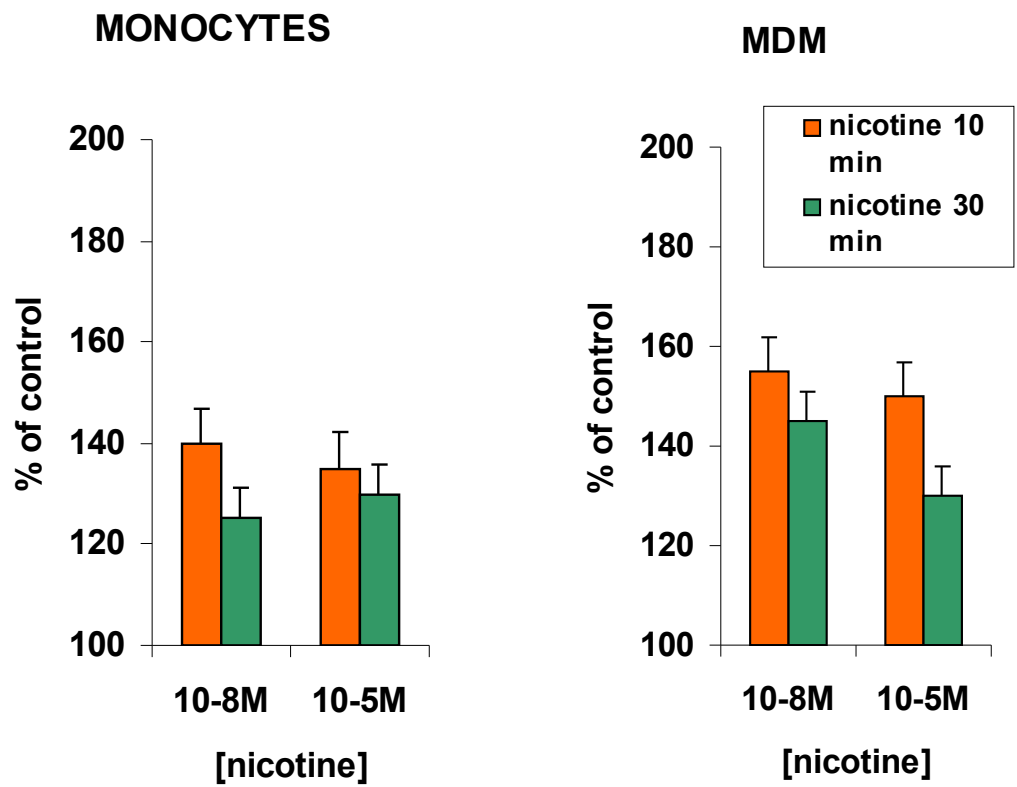
**Tabella 2****Release di citochine da monociti umani**

<b>Stimolo</b>	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> 6 ore	<b>TNF-<math>\alpha</math></b> 24 ore	<b>IL-1<math>\beta</math></b> 6 ore	<b>IL-1<math>\beta</math></b> 24 ore	<b>IL-6</b> 6 ore	<b>IL-6</b> 24 ore	<b>IL-10</b> 6 ore	<b>IL-10</b> 24 ore
<b>PMA</b> 10 <sup>-6</sup> M	214 $\pm$ 10	312 $\pm$ 30	150 $\pm$ 20	277 $\pm$ 30	270 $\pm$ 30	380 $\pm$ 20	10 $\pm$ 5	30 $\pm$ 12
<b>LPS</b> 10 ng/ml	1520 $\pm$ 105	2998 $\pm$ 250	860 $\pm$ 40	1330 $\pm$ 157	683 $\pm$ 178	1557 $\pm$ 120	25 $\pm$ 5	60 $\pm$ 10
<b>FMLP</b> 10 <sup>-6</sup> M	65 $\pm$ 15	94 $\pm$ 15	n.d.	60 $\pm$ 10	65 $\pm$ 15	110 $\pm$ 20	n.d.	n.d.
<b>SP</b> 10 <sup>-6</sup> M	56 $\pm$ 3	96 $\pm$ 20	23 $\pm$ 6	50 $\pm$ 4	142 $\pm$ 13	233 $\pm$ 7	n.d.	30 $\pm$ 5
<b>NKA</b> 10 <sup>-6</sup> M	50 $\pm$ 4	88 $\pm$ 10	25 $\pm$ 3	60 $\pm$ 5	n.d.	n.d.	n.d.	20 $\pm$ 4

Monociti umani stimolati con le sostanze indicate per 6 e 24 ore. Il release viene espresso in pg/ml. dati indicate come media  $\pm$  e.s di 4-8 esperimenti in duplicato. N.d=non determinato.

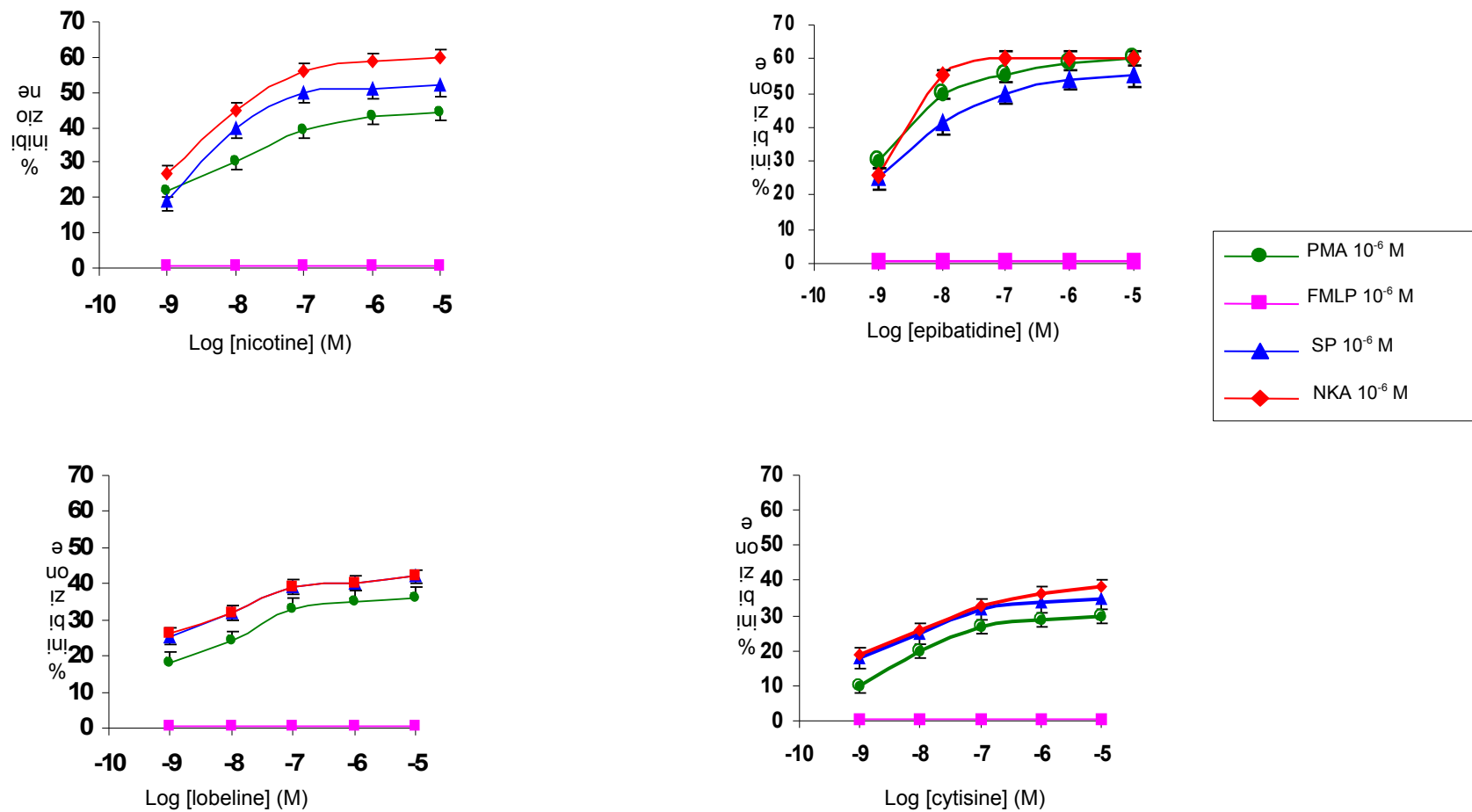


Figura 1 - Produzione basale di anione superossido da monociti e macrofagi



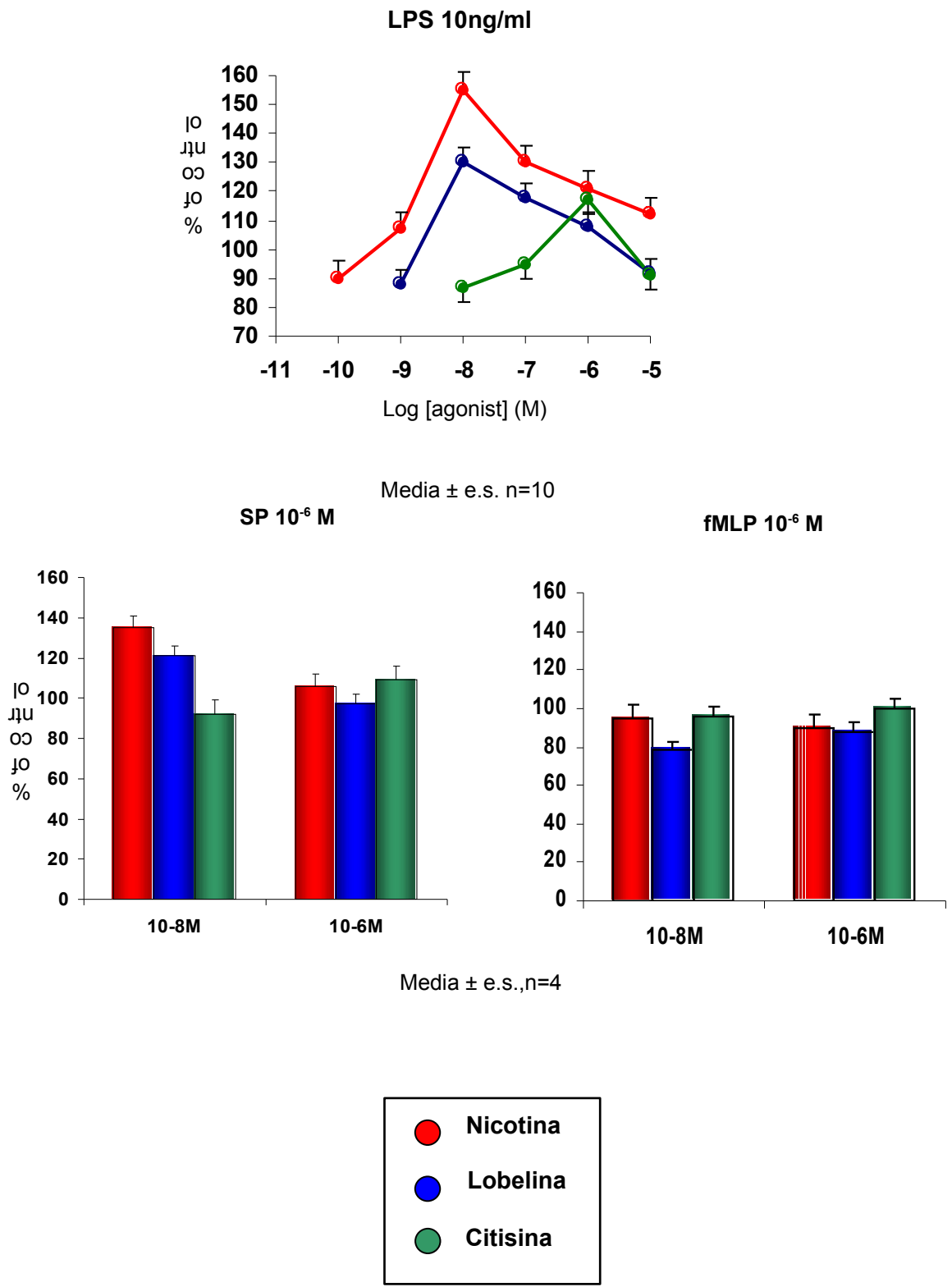
Media  $\pm$  e.s., n=4

Figura 2 - Azione di nicotina ed agonisti nicotinici sulla produzione di  $O_2^-$  in MDM



Media  $\pm$  e.s., n=4

Figura 3 - Effetti di nicotina ed agonisti nicotinici sul release di TNF alfa in monociti



**Figura 4 - Effetto di nicotina sul release di citochine da monociti stimolati con PMA ed LPS**

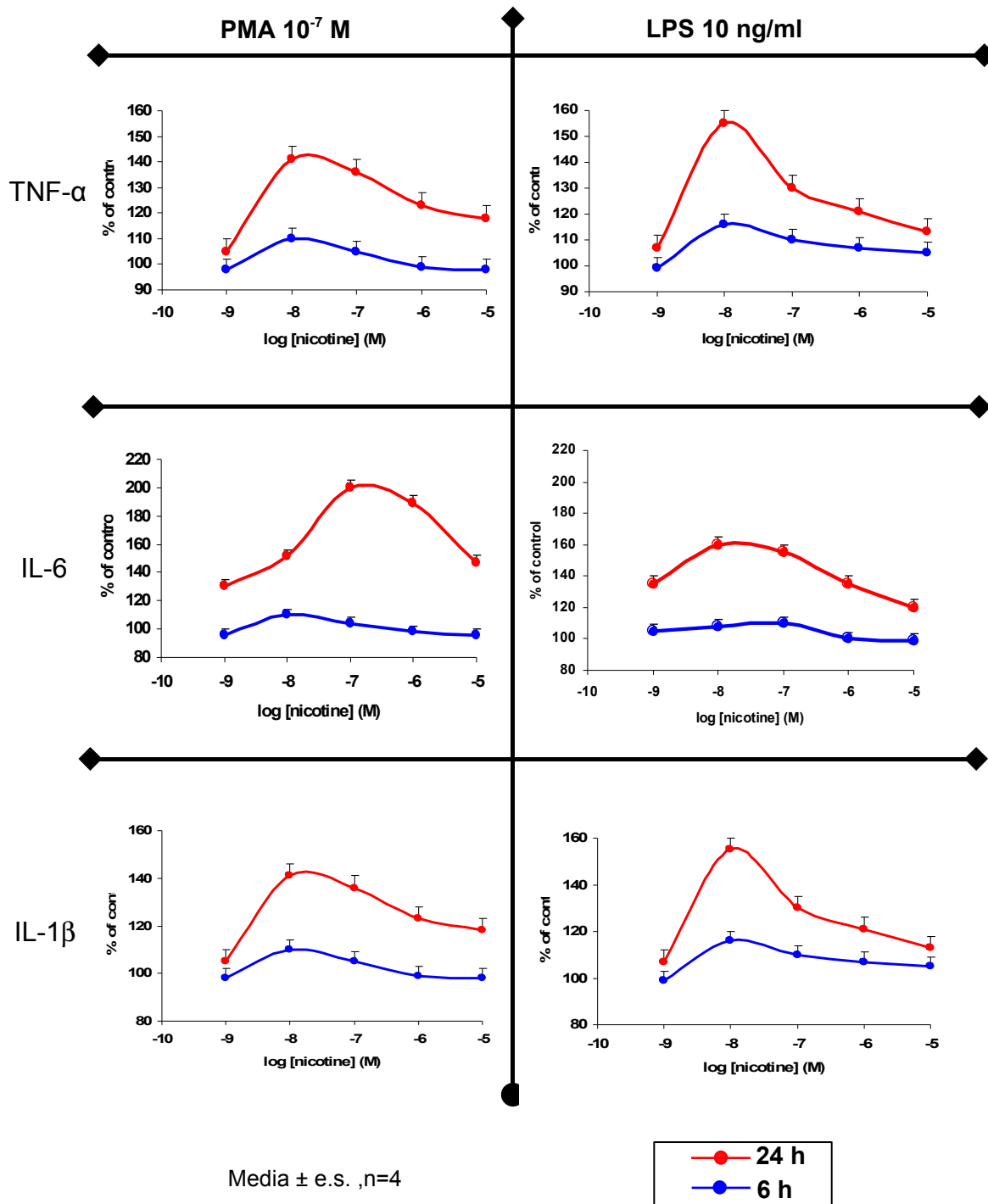


Figura 5 - Effetti di nicotina su attivazione di NF- $\kappa$ B in MDM

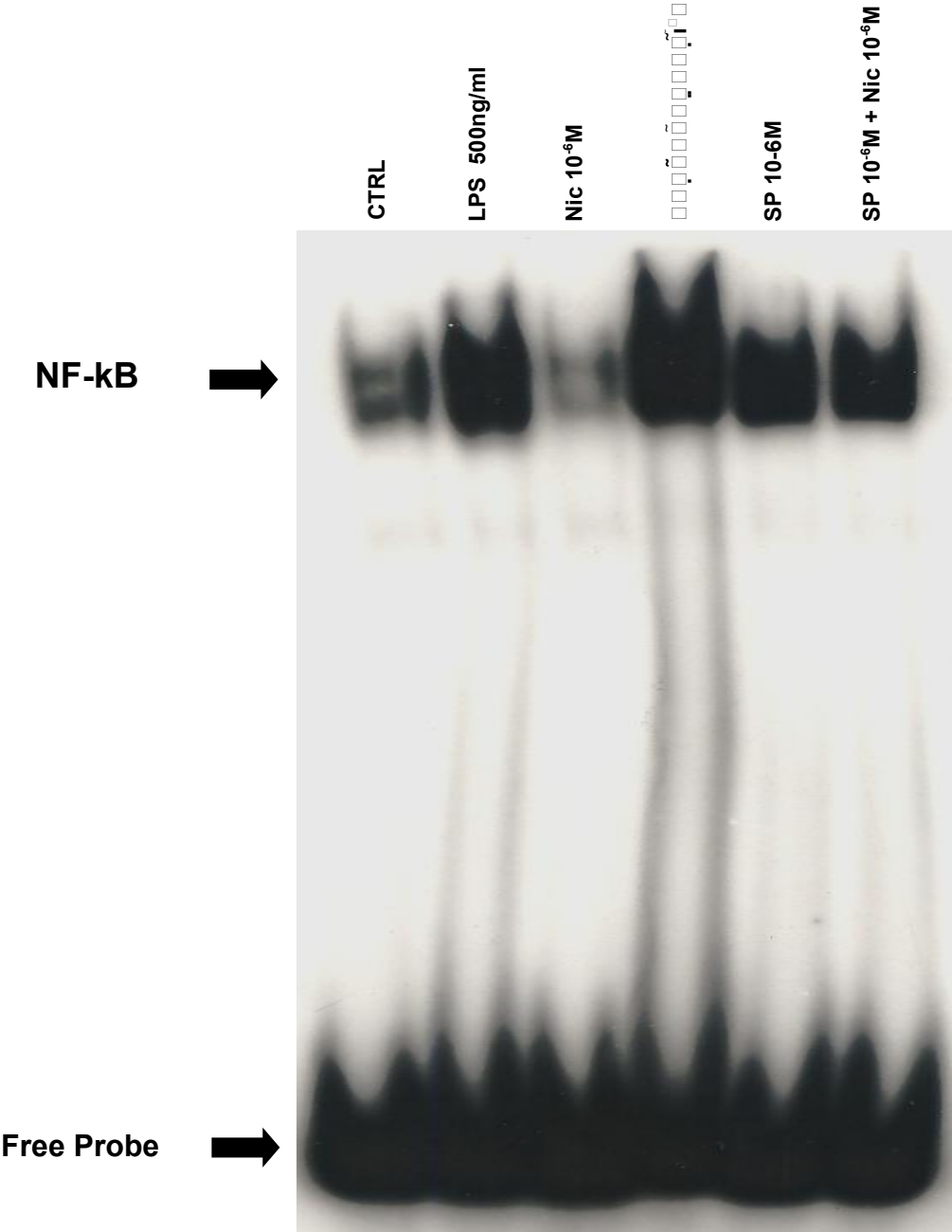


Figura 6 - Effetti di nicotina sull'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta da PMA e LPS su monociti

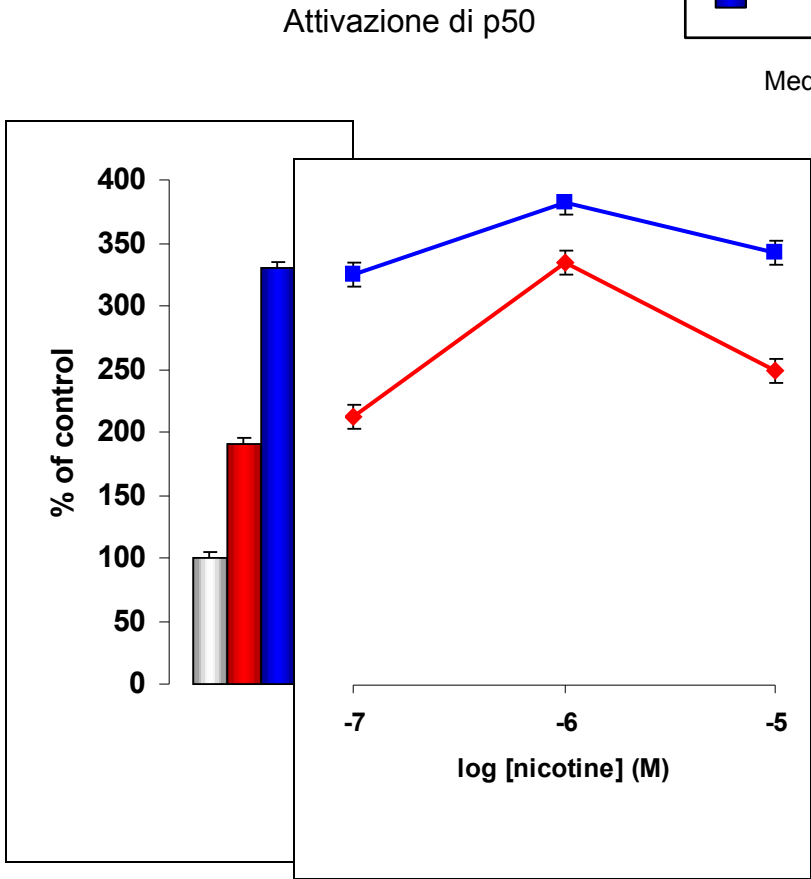
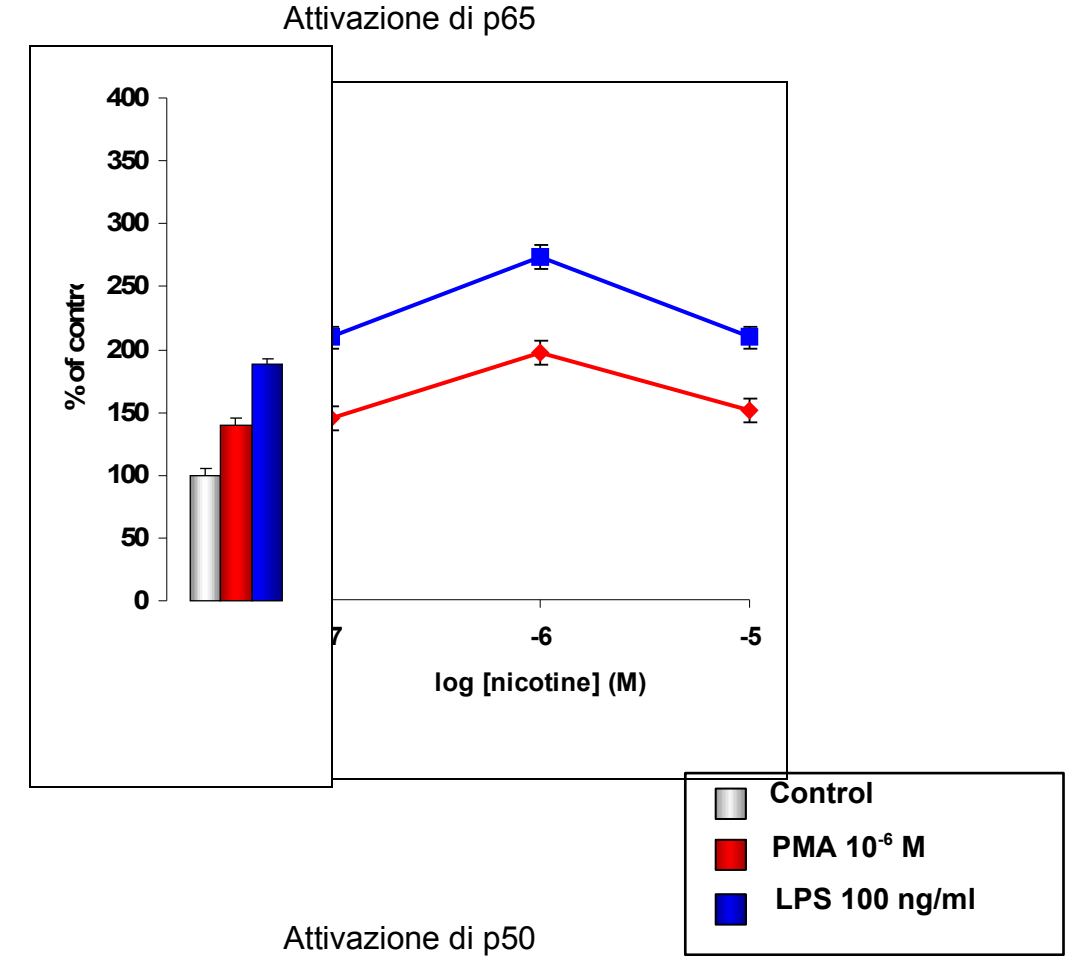
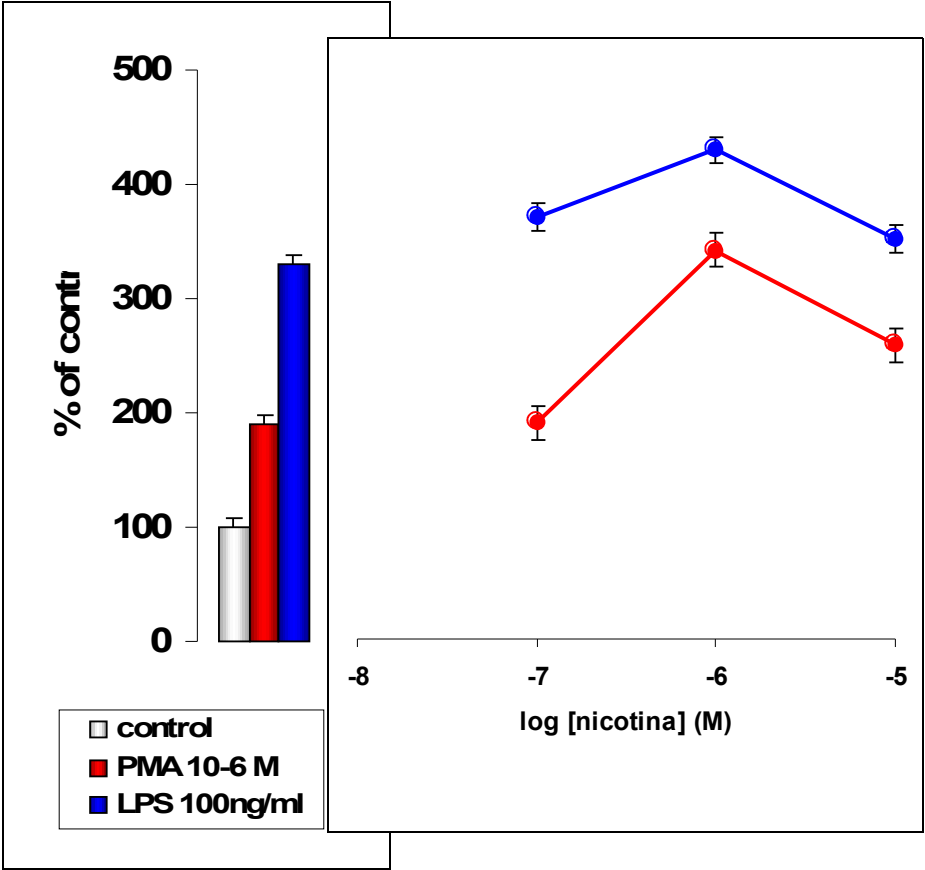


Figura 7 - Azione di nicotina sull'attivazione di NF- $\kappa$ B in MDM stimolati con PMA-LPS

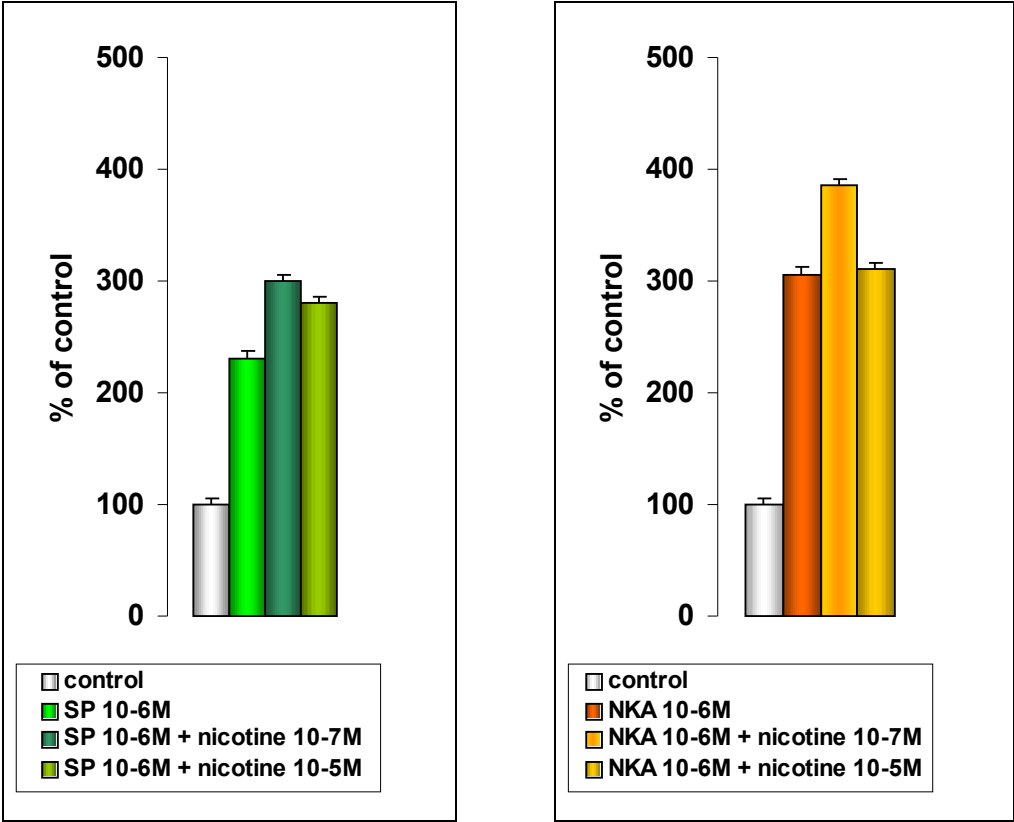
Attivazione di p50



Media  $\pm$  e.s., n=4

Figura 8 - Azione di nicotina sull'attivazione di NF- $\kappa$ B in MDM stimolati con tachichinine

Attivazione di p50



Media  $\pm$  e.s., n=4



## **Elenco seminari seguiti II anno dottorato.**

18 / 10 / 05 Novara, Dip Sci Med  
GENETICA DELLA SORDITA'  
Prof. Paolo Gasparini, Università di Trieste, Ist. Burlo Garofolo

18 / 11 / 05 Novara, Dip. Sci. Med.  
CARDIAC POTASSIUM CHANNEL REGULATION BY ACCESSORY SUBUNITS  
Dr. Diego Cotella, Dept. of Pharmacology, Dresden University of Technology, Germany

23 / 11 / 05 Novara, Dip. Sci. Med.  
HCV-RELATED STEATOSIS: PATHOGENIC MECHANISMS AND CLINICAL IMPLICATIONS  
Prof. Luigi Elio Adinolfi, Dip. Medicina interna ed Epatologia, II Università di Napoli

25 / 11 / 05 Novara, Dip. Sci. Med.  
MECHANISMS OF TRANSCRIPTIONAL REGULATION AND DISEASE  
Prof. Robert Tijan, Dept. of Molecular and Cell Biology, University of California, Berkeley

19 / 01 / 2006  
MECHANISMS OF OSTEOCLYTIC LESION IN MULTIPLE MYELOMA: UNCOUPLING BETWEEN BONE RESORPTION AND FORMATION  
Prof.ssa Maria Grano, Dip. Anatomia e Istologia, fac. Medicina Università di Bari

20 / 01 / 2006  
TECNICHE DI BIOLOGIA E GENETICA MOLECOLARE NELLA DIAGNOSTICA DEL CARCINOMA DEL COLON  
Dott.ssa Daniela Furlan, Università dell'Insubria, Varese

15 / 02 / 2006  
ANTICORPI RICOMBINANTI: UN POTENTE TOOL BIOTECNOLOGICO  
Dott. Daniele Sblattero, Università del Piemonte Orientale, Novara

20 / 03 / 2006  
THE NATURAL COURSE OF PRECLINICAL TYPE 1 DIABETES  
Prof. Mikael Knip, Professor of Pediatrics, Hospital for children and adolescents, University of Helsinki, Finland

30 / 05 / 2006:  
SPERM MEDIATED GENE TRANSFER. STORIA E APPLICAZIONI-  
Prof.ssa Marialuisa Lavitrano, Università Milano Bicocca

5 / 07 / 2006-  
DNA AND PROTEIN ARRAYS IN INFECTION DISEASES: FROM BASIC RESEARCH TO VACCINE DESIGN.  
Dott.ssa Renata Grifantini, Novartis Vaccines, Siena

11 / 09 / 2006-:  
THE ROLE OF CATHEPSIN K IN ARTHRITIS AND ATHEROSCLEROSIS  
Prof. Dieter Broemme, University of British Columbia

## **PUBBLICAZIONI E CONGRESSI 2005-2006**

GUNELLA G, BARDELLI C, AMORUSO A, VIANO I, BALBO P & S. BRUNELLESCHI. Macrophage-stimulating protein differently affects human alveolar macrophages from smoker and non-smoker patients: evaluation of respiratory burst, cytokine release and NF-kappaB pathway.

Br J Pharmacol. 2006 Jun;148(4):478-89. Epub 2006 Apr 24.

AMORUSO A.,BARDELLI C.,GUNELLA G.,FRESU LG.,FERRERO V.,BRUNELLESCHI S. Quantification of PPAR- $\gamma$  protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine.

Br. J. Pharmacol, submitted settembre 2006

BARDELLI C, AMORUSO A, GUNELLA G, FRESU LG., & S. BRUNELLESCHI. Effects of nicotine on human monocyte/macrophages in smokers and non-smokers (POSTER)

XII Convegno Monotematico: Nicotina, neurobiologia, neuropsicofarmacologia, 5 giugno 2006, Genova.

## **CONGRESSI 2005-2006**

XII Convegno Monotematico: Nicotina, neurobiologia, neuropsicofarmacologia, 5 giugno 2006, DBA, Ospedale S.Martino, Genova.