

**Università degli Studi del Piemonte Orientale  
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca**

**in**

**Medicina Molecolare**

*Ciclo XX*

Relazione III anno

**Effetti di composti polari minori di  
origine vegetale (MPC-OOE) su  
monocito/macrofagi umani.**

**Candidato: Gabriele Gunella  
Tutor: Prof.ssa Sandra Brunelleschi**

## *Introduzione*

Al giorno d'oggi, grazie ad un valido supporto scientifico, è noto come nell'area mediterranea la mortalità per patologie cardiovascolari sia notevolmente bassa: la dieta mediterranea si è dimostrata in grado di prevenire insorgenza e progressione di patologie coronariche, disfunzioni metaboliche ed alcuni tipi di neoplasie (Kris-Etherton et al, 2001; Covas et al., 2007) .In tale dieta il principale apporto di grasso, se non l'unico, è dato dall'olio di oliva, e si pensa che il suo principale effetto "farmacologico" sia associato non solo all'acido oleico, ma anche al contenuto in composti polari minori (MPC); la ricerca sta lavorando in particolare su quelli dotati di rilevanti proprietà antiinfiammatorie quali fenoli semplici e complessi, che sono presenti in buona quantità nell'olio extravergine: Beauchamp et al. nel 2005 hanno infatti mostrato la capacità di oleocantale, il composto responsabile del sapore pungente dell'olio d'oliva, di agire come inibitore di COX-1 e COX-2.

Precedenti studi (Covas et al., 2006) mostrano come l'inibizione dell'ossidazione di LDL dipenda dai composti fenolici contenuti nell'olio d'oliva. Altri studi (Franconi et al., 2006) hanno dimostrato come un estratto di olio d'oliva, simile a quello utilizzato dal nostro lavoro, riduca l'ossidazione delle LDL indotta da ioni rame. In questo caso l'IC50 dell'estratto è di  $0.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , concentrazione assai simile a quella plasmatica indotta dall'apporto dietetico della dieta mediterranea.

I composti polari minori, quali idrossitirosolo e oleuropeina, presentano spiccate capacità cardioprotettive: in uno studio condotto su cellule di linea macrofagica murina (J774) è stato visto come idrossitirosolo riduca l'espressione di COX-2 e di iNOS inibendo l'attivazione di fattori di trascrizione quali STAT-1 e NF- $\kappa$ B (Maiuri et al., 2005). Quest'ultimo regola numerosi geni infiammatori, ed è a sua volta regolato ed attivato da numerosi stimoli proinfiammatori quali citochine, specie reattive dell'ossigeno, metaboliti di batteri e virus. (Li et al., 2002)

Il pathway metabolico di NF- $\kappa$ B, inoltre, viene attivato immediatamente dopo un pasto ricco in grassi animali, ma non dopo un pasto in cui l'unico grasso utilizzato sia stato l'olio d'oliva. (Bellido et al., 2004)

E' stato dunque preparato un estratto, privo di grassi, di olio extravergine di oliva naturalmente ricco in MPC (da qui in poi MPC-OOE); sono stati quindi riconosciuti e quantificati i MPC contenuti ed è stato utilizzato a fini sperimentali su monocito/macrofagi, cellule che rivestono un risaputo ruolo chiave nell'aterosclerosi e nei processi infiammatori ( deWinther et al. ,2005)

## *Scopo del lavoro*

Indagare sugli effetti di un estratto di olio extravergine di oliva (MPC-OOE) impiegato a concentrazioni simili a quelle di un normale apporto dietetico, sulla traslocazione nucleare delle subunità p50 e p65 del fattore NF- $\kappa$ B su monociti e macrofagi derivati da monociti (MDM) isolati da volontari sani.

## *Materiali e metodi*

### *1- Estratto di olio extravergine d'oliva*

L'olio extravergine d'oliva, fornito da una ditta toscana, è stato processato per eliminarne la componente lipidica mediante successive estrazioni con solventi polari quali cicloesano e *n*-esano. L'estratto, interamente preparato dalla Prof.ssa Annalisa Romani e dalla Dott.ssa Francesca Ieri del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Firenze, è stato quindi concentrato sotto vuoto, diluito in soluzione idroalcolica ed analizzato mediante sistema HPLC-

MS (HP-1100 con diode array detector e HP-1100 MSD API Electrospray, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) per determinare, caratterizzare e quantificare i composti polari minori (MPC). (Romani et al., 2001)

I parametri di identificazione dei MPC sono stati il tempo di ritenzione, i dati spettroscopici e spettrometrici, utilizzando come standard tirosolo, 5-idrossitirosolo, luteolina ed oleuropeina. La quantificazione di ogni singolo MPC è stata condotta mediante HPLC-DAD e una curva di regressione a 4 punti costruita con gli standard utilizzati ( $r^2 \geq 0.9998$ ). La concentrazione dei MPC considerati è stata calcolata previa correzione a causa dei cambi in peso molecolare: è stata infatti ottenuta applicando un fattore di moltiplicazione  $PM_x/PM_y$ , dove  $PM_x$  è il peso molecolare di ogni composto e  $PM_y$  è il peso molecolare del composto di riferimento.

L'estratto analizzato per HPLC è stato utilizzato come stimolo per gli esperimenti su monociti ed MDM umani

## *2 - Isolamento di monociti e MDM*

I monociti vengono raccolti da campioni di sangue periferico eparinizzato di volontari sani non fumatori, 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 (Brunelleschi et al., 2001). Le cellule così ottenute vengono lavate due volte in PBS e risospese in terreno (RPMI 1640, 5% FBS, glutamina 2mM, HEPES 10mM, streptomycina 50µg/ml, 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.

MDM vengono ottenuti da monociti mantenuti in coltura per 8-10 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 ed un aumento di CD68. Il processo di differenziazione non conduce alla formazione di cellule dendritiche, come si dimostra dall'assenza di espressione del marcatore CD-1a (Brunelleschi et al., 2001).

Gli esperimenti vengono condotti il giorno stesso del prelievo ematico; le cellule sono incubate per 3 ore con MPC-OOE, a concentrazioni crescenti da 1nM a 10µM, o con ciglitazione come controllo positivo (50µM). In seguito vengono stimulate per 1 ora con PMA (10<sup>-6</sup>M)

## *3 - Preparazione di estratti citoplasmatici e nucleari*

Da monociti e MDM, piastrati in quantità dell'ordine di  $5 \times 10^6$ , sono state ottenute frazioni citoplasmatiche e nucleari, utilizzando Nuclear Extract Kit (Active Motif Europe, Belgium) secondo il protocollo del fornitore. L'estratto proteico, quantificato mediante apposito kit (Bio-Rad) è stato aliquotato e conservato a -80°C fino all'analisi.

## *4 - Attivazione NF-κB*

L'attivazione di NF-κB è stata valutata misurandone la traslocazione nucleare, con metodiche EMSA, e il contenuto nucleare di subunità p65 e p50, con metodiche ELISA.

I saggi EMSA sono stati condotti con 5µg di estratto proteico, incubati con 2µg di poly (dI-dC) e sonda oligonucleotidica  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-ATP (100000-150000 cpm, Promega) in binding buffer (glicerolo 50%, Tris-HCl pH 7.6 10mM, KCl 500 mM, EDTA 10mM, DTT 1mM) per 30 minuti a

temperatura ambiente. Il complesso proteina-oligonucleotide di consenso è stato separato su gel di poliacrilamide al 5% in TBE buffer; le bande radioattive sono state rivelate per autoradiografia. Per avere un più preciso dato quantitativo, l'attivazione del fattore nucleare NF- $\kappa$ B, è stata anche valutata misurando la traslocazione delle subunità p65 e p50 con metodiche ELISA (Trans-AM<sup>TM</sup> NF- $\kappa$ B p50 Chemi e p65 Chemi Transcription Factor Assay Kits, Active Motif Europe, Belgium) su estratti proteici (1 $\mu$ g) di M ed MDM. I kit usati legano su piastra la subunità in analisi grazie alla presenza nel pozzetto del rispettivo oligonucleotide di consenso. Le misurazioni sono state condotte su un luminometro Rosys Anthos Lucy 1 ed espresse come RLU (Relative Luminescence Unit). La quantificazione delle subunità p50 e p65 traslocate viene valutata come rapporto nucleo/citosol. (Bardelli et al.,2005)

### 5 - Espressione di PPAR- $\gamma$

Per valutare il meccanismo antiinfiammatorio dell'estratto in esame, abbiamo testato la sua capacità di influenzare l'espressione recettoriale di PPAR- $\gamma$  in monociti ed MDM umani. Le cellule sono state stimulate (6h, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>) con MPC-OOE a concentrazioni crescenti (1nM-10 $\mu$ M) e con l'agonista PPAR- $\gamma$  ciglitazone (50  $\mu$ M) come controllo positivo. Le cellule (2x10<sup>6</sup>M) vengono lavate 2 volte con PBS freddo e lisate mediante sonicazione in tampone contenente 3%SDS, Tris 0.25M, PMSF 1mM. I lisati così ottenuti (20  $\mu$ g) vengono trattati in SDS-PAGE (acrilamide 10%) e trasferiti su membrana di nitrocellulosa, utilizzando in seguito un anticorpo monoclonale anti PPAR- $\gamma$  (1:1000, TBS-T 5% latte) ed un monoclonale anti  $\beta$ -actina (1:5000, TBS-T 3%BSA). Dopo incubazione con anticorpo secondario legato ad HRP, le proteine risultanti sono state visualizzate mediante chemiluminescenza e quantificate con densitometro (Versadoc, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). (Figura 3) (Amoruso et al., 2007)

### 6 - Analisi statistica

La significatività statistica dei dati è stata controllata con il test di analisi della varianza (ANOVA) seguito dal test di Bonferroni. Un valore di probabilità  $p < 0.05$  è stato ritenuto significativo.

### Risultati

I composti polari minori riscontrabili nell'estratto di olio d'oliva appartengono a 4 classi: fenoli (tirosolo e 5-idrossitirosolo), secoiridoidi (oleuropeina aglicone, deacetossioleuropeina aglicone, oleocantale e derivati dei secoiridoidi), derivati dei lignani (acetossipinoresinolo) e flavonoidi (luteolina). La maggior concentrazione nell'estratto (6mM) è quella di oleocantale e di tirosolo, seguita dai secoiridoidi e dal 5-idrossitirosolo. La concentrazione totale della miscela polifenolica utilizzata per il nostro studio è di 40mM.

Gli effetti di MPC-OOE sul binding su DNA di NF- $\kappa$ B sono stati valutati mediante tecniche EMSA. Come mostrato in figura 2, NF- $\kappa$ B è costitutivamente poco attivato sia in monociti (fig. 2A, lane 4) che in MDM (fig. 2B, lane 4), ed è presente sia come etero dimero p50/p65 sia come omodimero p50/p50. PMA 10<sup>-6</sup>M induce traslocazione nucleare di NF- $\kappa$ B: la lane 1 mostra l'effetto totale, mentre le lanes 2 e 3 mostrano rispettivamente il supershift di p65 e di p50; l'anticorpo utilizzato per il rilevamento di p50 mostra anche il segnale dell'eterodimero p65/p50. L'agonista PPAR- $\gamma$  ciglitazone.(lane 5) è stato qui usato come controllo positivo in quanto noto inibitore dell'attivazione di NF- $\kappa$ B(Zingarelli et al., 2003)

Come evidenziato nelle lane 6 e 7 MPC-OOE 10 $\mu$ M inibisce l'attivazione di NF- $\kappa$ B in M ed MDM, in cellule non stimulate (lane 6) e stimulate con PMA (lane 7)

Per avere una valutazione quantitativa, la traslocazione nucleare delle subunità p65 e p50 è stata valutata anche mediante metodiche ELISA.(Figura 3)

In monociti ed MDM non stimolati si osserva una modesta attivazione basale; al contrario, PMA; noto e florido stimolo pro-infiammatorio, alla concentrazione di  $10^{-6}$ M, induce un'importante traslocazione nucleare delle subunità p65 ( $p < 0.05$  vs M di controllo,  $p < 0.001$  vs MDM di controllo, fig. 3B) e p50 ( $p < 0.01$  vs M di controllo,  $p < 0.05$  vs MDM di controllo, fig.3A).

Nel "range" di concentrazioni 1nM-10  $\mu$ M, MPC-OOE, inibisce in maniera concentrazione-dipendente, la traslocazione nucleare sulla subunità p50 evocata da PMA. Come riportato in figura 3A, alla concentrazione di 10 $\mu$ M MPC-OOE, inibisce la traslocazione nucleare del 70% sia in M ( $p < 0.001$ ) che in MDM ( $p < 0.01$ ), con un effetto paragonabile a quello indotto da ciglitazone, agonista PPAR- $\gamma$  e inibitore di NF- $\kappa$ B, utilizzato come controllo positivo. Alla massima concentrazione di utilizzo, 10 $\mu$ M, MPC-OOE riduce la traslocazione di p50 anche in monociti non stimolati ( $p < 0.05$ , fig.3A)

La subunità p50 è quantitativamente la più abbondante e la più attivata sia in monociti che in macrofagi (Bardelli et al.,2005; Gunella et al.,2006). La traslocazione della subunità p65 in cellule non stimolate non viene modificata in maniera significativa dall'estratto in studio; al contrario, MPC-OOE inibisce l'attivazione di NF- $\kappa$ B indotta da PMA, e si rivela anche più efficace di ciglitazone se utilizzato a concentrazione di 10 $\mu$ M.(Figura 2B)

Inoltre, per meglio verificare il possibile meccanismo dell'azione antinfiammatoria di MPC-OOE, abbiamo valutato la sua capacità di modulare in monociti e MDM l'espressione proteica di PPAR- $\gamma$ , che esercita importanti azioni antiinfiammatorie. (Zingarelli et al.,2003) Come si vede in figura 4, MPC-OOE non ha nessun effetto, mentre l'agonista ciglitazone aumenta di circa il doppio l'espressione di PPAR $\gamma$  (fig. 4B)

## *Discussione*

La composizione degli oli d'oliva dipende da numerosi fattori, quali il terreno di coltivazione, l'esposizione, la cultivar stessa, gli aspetti tecnologici della lavorazione (Covas et al., Nutr Rev 2006) Il nostro prodotto di partenza, grazie a proprie caratteristiche naturali e agronomiche, è costitutivamente ricco in polifenoli totali: in particolare si denota un'alta concentrazione di oleocantale.(Tab. 1). Quest'ultimo composto presenta una struttura chimica molto simile a quella del FANS ibuprofene ed inibisce la via ciclossigenasica (Beauchamp et al., 2005). L'estratto ottenuto ed utilizzato per le indagini sperimentali si presenta ricco in sostanze antiossidanti :in particolare presenta un'alta concentrazione di MPC, mentre è stato privato di altri composti attivi quali acidi grassi, tocoferolo ed altri composti lipofili.

Il nostro studio mostra come MPC-OOE inibisca la traslocazione nucleare delle subunità p65 e p50 del fattore NF- $\kappa$ B, con un risultato paragonabile a quello dell'agonista PPAR- $\gamma$  ciglitazone, in monocito/macrofagi. Come è noto, in cellule a riposo tale fattore viene trattenuto nel citoplasma dalla proteina I $\kappa$ B $\alpha$ .; in seguito ad uno stimolo opportuno, quali citochine, ROS, metaboliti di virus e batteri, si attiva la fosforilazione di I $\kappa$ B $\alpha$  e la conseguente traslocazione nucleare delle subunità che compongono NF- $\kappa$ B. Le subunità coinvolte si legano quindi ai geni coinvolti nella risposta infiammatoria e ne inducono trascrizione. Sono note numerose subunità di NF- $\kappa$ B, omo ed eterodimeriche: p50, p65, c-Rel, RelB, p105; l'eterodimero p50/p65 è quello più frequentemente riscontrato. (De Winther et al., 2005)

A differenza di altri autori(Maiuri et al., 2005; Moreno et al., 2003)) che hanno usato linee cellulari murine, in questo studio abbiamo utilizzato monociti ed MDM di volontari sani: i risultati qui presentati hanno dunque un potenziale interesse clinico, visto che i monociti ed i macrofagi hanno un ruolo chiave per lo studio dell'aterosclerosi. (Ross et al., 1993)

Dati della letteratura dimostrano che i polifenoli, dotati di attività antinfiammatoria, inibiscono l'attivazione di NF- $\kappa$ B data da LPS in cellule endoteliali; in questo caso, l'oleuropeina aglicone è il

composto più attivo, con un'inibizione del 70% ad una concentrazione di 15µmol/L (Carluccio et al.,2003). Recenti studi clinici randomizzati mostrano inoltre come un apporto dietetico di olio d'oliva ricco in MPC aumenti i livelli di colesterolo HDL e diminuisca i livelli sierici di markers di ossidazione.( Covas et al., 2006)

L'estratto da noi utilizzato è dotato di capacità antinfiammatoria. Infatti, a concentrazioni simili a quelle dietetiche, si è rivelato in grado di inibire l'attivazione di NF-kB indotta da PMA in monociti e MDM: tale risultato può corroborare l'idea che le diete di tipo mediterraneo abbiano effetti cardioprotettivi. Tali diete apportano in media un livello plasmatico di MPC di 0.6µM (Visioli et al., 2000) livello che è paragonabile a quello da noi utilizzato *in vitro*.

Dalle nostre osservazioni si nota anche come la subunità p50 sia 6 volte più attivata di p65: come già citato(figura 3), l'omodimero p50/p50 non presenta il dominio di transattivazione, ma si lega ugualmente ai domini consenso su DNA e può agire quindi sulla trascrizione proteica. (Li et al., 2002) . Inoltre, la stessa subunità svolge un ruolo importante nell'aterosclerosi: un'alta espressione di p50 induce la trascrizione di proteina C reattiva, un noto marker di infiammazione cardiovascolare, mentre p65 la inibisce. (Cha-Molstad et al., 2000). Ancora, modelli murini con una delezione di p50 hanno dimostrato una ridotta mortalità da infarto del miocardio.(Frantz et al., 2006)

Concludendo, possiamo dire che MPC-OOE inibisce, in maniera concentrazione dipendente, la traslocazione di p50: ciò può avere un interessante coinvolgimento nella terapia anti-aterosclerosi e sostenere l'idea dell'attività cardioprotettiva dell'apporto dietetico di olio d'oliva.

Si ringrazia la ditta MANNI™ per aver gentilmente fornito l'olio extravergine d'oliva TOSCANO IGP. La preparazione, la determinazione qualitativa e quantitativa di MPC-OOE sono state condotte presso i laboratori del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Firenze.

Amoruso et al., Life Sci 2007 Aug 23; 81 (11): 906-15  
Bardelli et al., Br.J.Pharmacol 2005;145:385-396  
Beauchamp et al., Nature 2005 Sep 1;437(7055):45-6  
Bellido et al., Am J Clin Nutr 2004; 80: 1487-1491  
Brunelleschi et al., Br J. Pharmacol 2001;134:1285-1295  
Carluccio et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003;23:622-629  
Cha-Molstad et al., J Immun 2000; 165: 4592-4597  
Covas et al., Ann Int Med 2006;145:333-341  
Covas et al., Free Rad Biol Med 2006; 40:608-616  
Covas et al., Nutr Rev 2006;64 (10): s20-s30  
Covas et al., Pharmacol Res 2007; 55; 175-186  
De Winther et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:904-914  
Franconi et al., J Agric Food Chem 2006;54: 3121-3125  
Frantz et al., FASEB J 2006; 20: E1309-E1314  
Gunella et al., Br J Pharmacol 2006, Jun;148(4):478-89. Epub 2006 Apr 24.  
Kris-Etherton et al., Circulation 2001; 103; 319-326  
Li et al., Nat Rev Immunol 2002; 2:725-734  
Maiuri et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm 2005; 371:457-465  
Moreno et al., Free Rad Biol Med 2003; 35:1073-1081

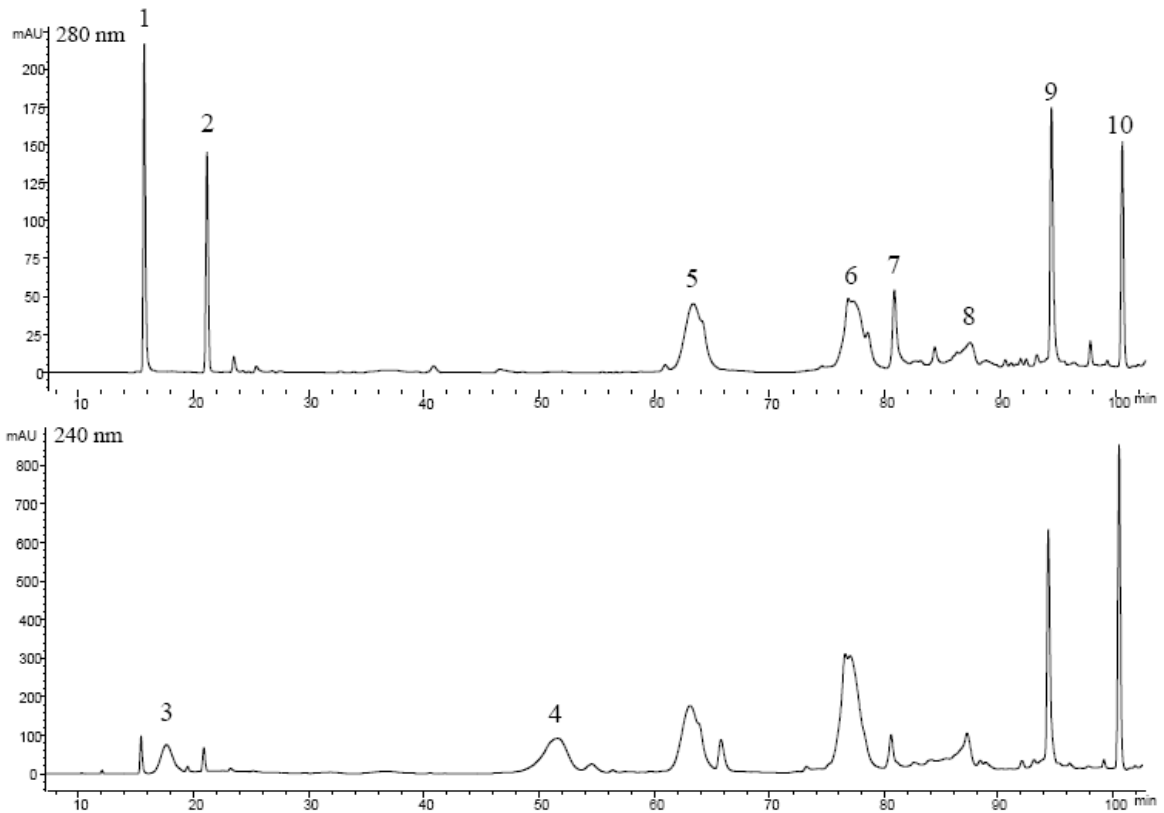
Romani et al. , Chromatographia 2001;53:279-284  
Ross et al., Nature 1993;362: 801-809  
Visioli et al., FEBS Lett 2000;468: 159-160  
Zingarelli et al., J Immunol 2003; 171:6287-6837

| <b>Composti</b>                | <b>g/L</b>    | <b>mM</b>    |
|--------------------------------|---------------|--------------|
| 5-idrossitirosolo              | 0.928         | 4.41         |
| Tirosolo                       | 0.608         | 6.03         |
| Acido elenolico                | 1.195         | 4.94         |
| Derivati acido elenolico       | 0.634         | 2.62         |
| Deacetossioleuropeina aglicone | 1.93          | 6.04         |
| Oleocantale                    | 1.855         | 6.10         |
| Derivati secoiridoidi          | 2.261         | 5.98         |
| Derivati lignani               | 1.104         | 2.65         |
| Oleuropeina aglicone           | 0.486         | 1.29         |
| Luteolina                      | 0.012         | 0.04         |
| <b>Polifenoli totali</b>       | <b>11.015</b> | <b>40.09</b> |

**Tabella 1**

Composizione di estratto di olio extravergine d'oliva ricco in MPC.  
n=3, ognuna condotta in triplicato. S.e.m 1-3%

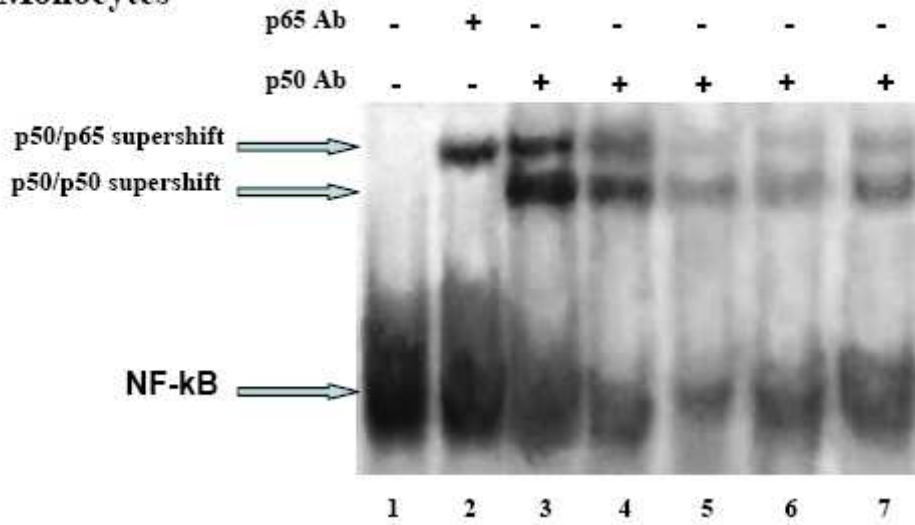




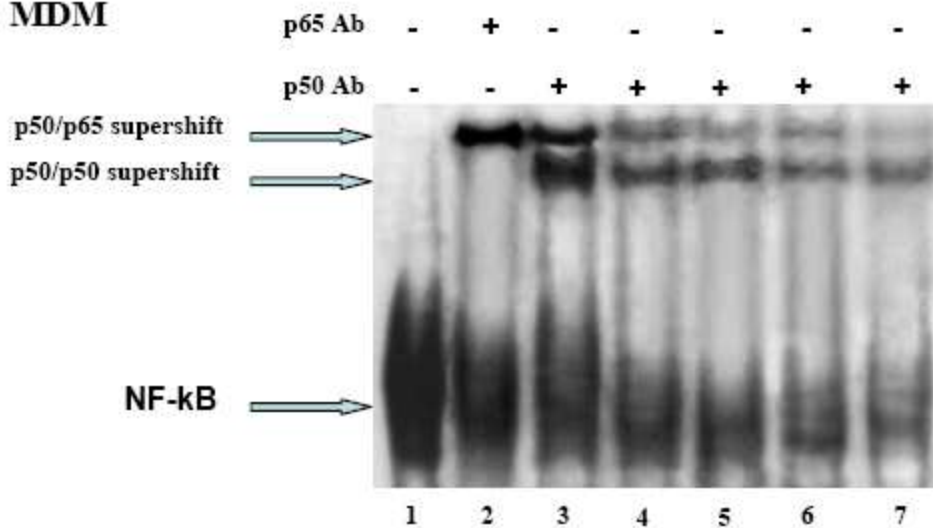
**Figura 1**

Tracciato HPLC-DAD di estratto di olio d'oliva, acquisito a 240 e 280 nm. I picchi salienti sono evidenziati secondo i numeri: 1, 5idrossitirosolo; 2, tirosolo; 3, derivati dell'acido elenolico; 4, acido elenolico; 5, deacetossioleuropeina aglicone; 6, oleocantale; 7, acetossipinoresinolo; 8, oleuropeina aglicone; 9-10, secoiridoidi.

### A) Monocytes



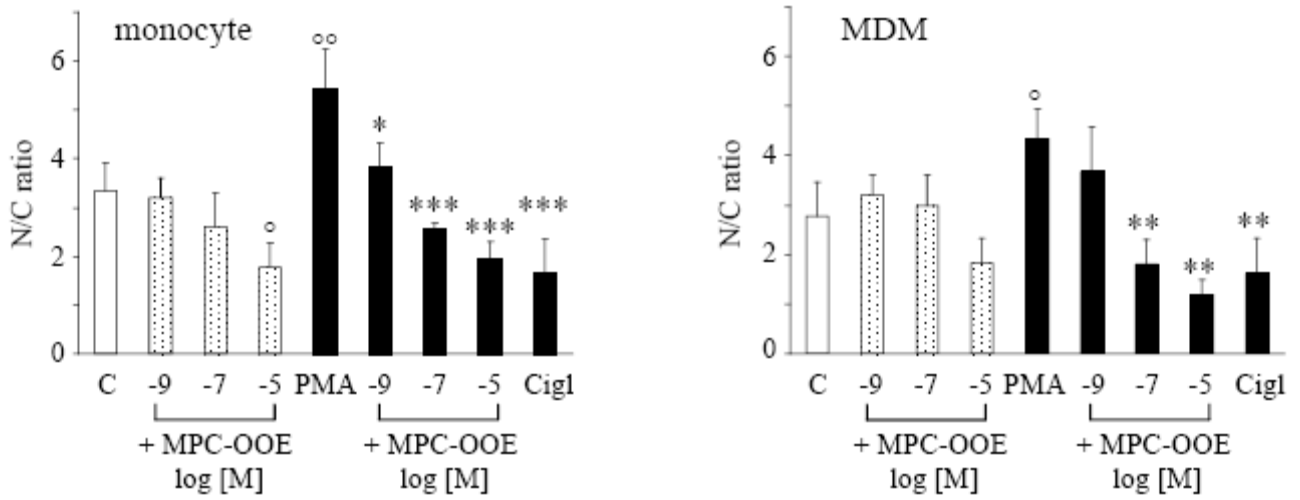
### B) MDM



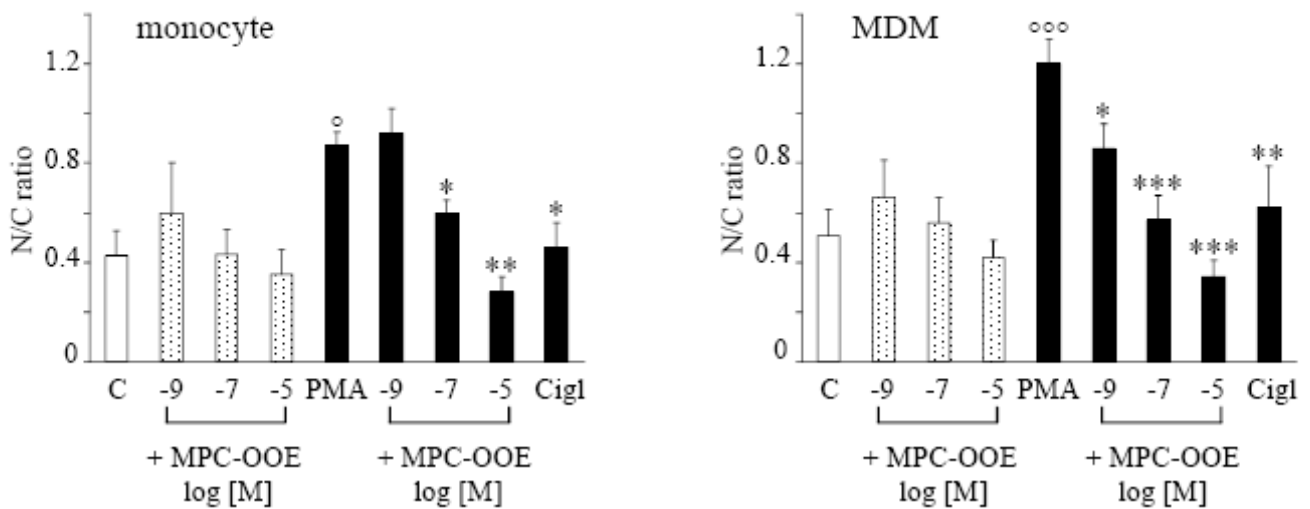
**Figura 2**

Attivazione di NF-κB, supershift delle subunità p50 e p65 in monociti (A) ed MDM (B)  
 Lane 1: PMA 10<sup>-6</sup>M, effetto totale, senza supershift; lane 2: PMA, supershift con anticorpo anti-p65;  
 lane 3: PMA, supershift con anticorpo anti-p50; lane 4: controllo; lane 5: ciglitazone 50 μM; lane 6:  
 supershift con MPC-OOE 10 μM; lane 7: supershift con PMA 10<sup>-6</sup>M + MPC-OOE 10 μM

A) **p50 subunit**



B) **p65 subunit**



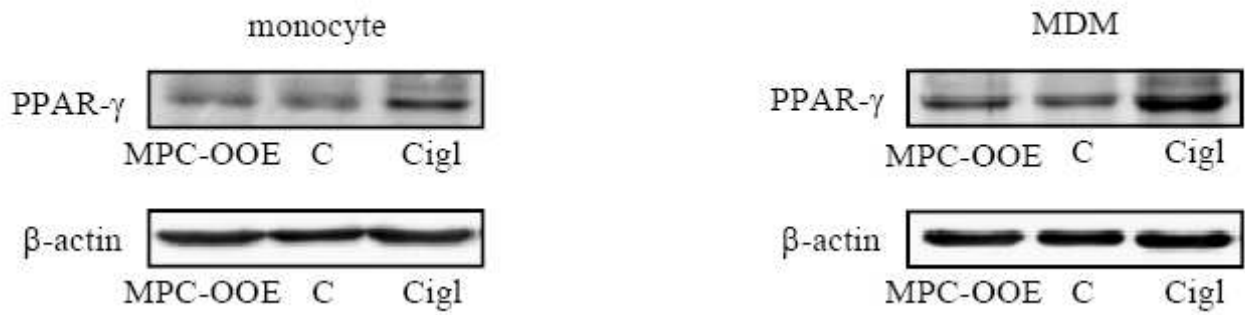
**Figura 3**

Inibizione della traslocazione di NF- $\kappa$ B da parte di estratto di olio extravergine d'oliva (MPC-OOE) MPC-OOE inibisce in maniera concentrazione-dipendente la traslocazione delle subunità p50 e p65 (A e B, rispettivamente) in cellule stimulate con PMA  $10^{-6}$ M, rispetto a cellule non stimulate (C, controllo). Lo stimolo con ciglitazone (Cigl 50 $\mu$ M) viene utilizzato come controllo positivo. Risultati espressi come rapporto nucleo/citosol (Ratio N/C): media  $\pm$  s.e.m., n=5

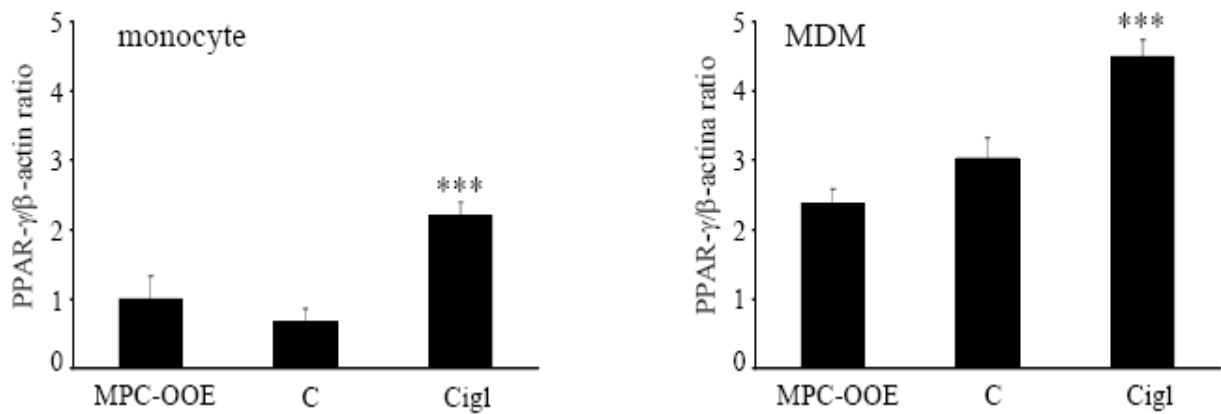
°p<0.05 °°p<0.01 °°°p<0.001 vs controllo

\*p<0.05 \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001 vs cellule stimulate con PMA

A)



B)



#### Figura 4

Espressione di PPAR- $\gamma$  in monociti ed MDM

A) WB di PPAR- $\gamma$  e  $\beta$ -actina in monociti (A) e MDM (B) da donatori sani.

C: controllo; MPC-OOE: 10 $\mu$ M, 6ore; Cigl: 50mM

B) Quantificazione secondo rapporto densitometrico PPAR- $\gamma$ / $\beta$ -Actina

Media  $\pm$  s.e.m. n=3 p<0.001 vs controllo

### ***Elenco corsi seguiti :***

Corso di statistica tenuto dal Prof. Magnani, coadiuvato dalla Dott.sa Migliore e dal Dott. Vidali. (termine 5 ottobre 2005)

Corso di inglese tenuto dal Prof. Irving-Bell, anno accademico 2005-2006

### ***Elenco seminari seguiti l'anno dottorato.***

25 / 11 / 2004, Novara, Dip. Sci. Med.

REPERTAXIN, UN NUOVO INIBITORE DI IL-8: RISULTATI PRECLINICI E IDENTIFICAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE

Dr. Riccardo Bertini, Centro Ricerche Dompé, L'Aquila

11 / 03 / 05, Novara, Dip. Sci. Med.

PROTEOMICA DELL'EPITELIO INTESTINALE

Prof. Margherita Ruoppolo, Dip. Biochimica e Biotecnologie, Facoltà di Medicina, Università Federico II, Napoli

06 / 04 / 2005, Novara, Dip. Sci. Med.

TOWARDS REGULATION OF GENE EXPRESSION BY CHROMATIN MODIFICATION: SOME BIOMEDICAL MODEL.

Prof. Gerardo Lopez-Rodas, Dipartimento de Bioquímica y Biología Molecular, Universitat de Valencia.

30 / 05 / 2005 Novara, Dip. Sci. Med.

IL DOLORE ARTICOLARE: UN PROBLEMA CLINICO O BIOCHIMICO?

Prof. Giampiero Pescarmona, Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica, Università di Torino

1 / 06 / 05 Novara, Dip. Sci. Med

GENI E TRAPIANTI

Prof. Antonio Amoroso, Università di Torino

8 Giugno 2005 Novara, Dip. Sci. Med

PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA: ASPETTI MEDICI, BIOLOGICI E LEGALI

Prof. Torre (Procreazione assistita: aspetti psicologici)

Dott.ssa Fortina (Fecondazione medicalmente assistita: aspetti tecnici)

Prof. Momigliano (Diagnosi genetica pre-impianto)

Prof. Pelissero (Il difficile equilibrio tra procreazione medicalmente assistita e diritti del concepito)

Prof. Prat (Cellule staminali: stato dell'arte)

17 / 06 / 2005 Novara, Dip. Sci. Med.

LA TOSSINA DELLA PERTOSSE ED IL SUO B-OLIGOMERO: NUOVI FARMACI IMMUNOSTIMOLANTI ED ANTI-HIV?

Dr. Guido Poli, DIBIT-Ist. San Raffaele, Milano

12 / 09 / 05 Novara, Dip. Sci. Med.

CARATTERISTICHE E POTENZIALITA' DELLE CELLULE FETALI ISOLATE DALLE MEMBRANE FETALI UMANE: AMNION E CORION

Dr. Ornella Parolini, Centro Ricerche E. Menni (CREM), Fondazione Istituto Ospedaliero Poliambulanza, Brescia

13 / 09 / 05 Dip. Sci. Med.

FUNCTION OF RIBOSOMAL PROTEIN S19: IMPLICATIONS FOR DIAMOND-BLACKFAN ANEMIA

Prof. Steven R. Ellis, Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, University of Louisville, Louisville, Kentucky

20 / 09 / 05 Dip. Sci. Med.

REGOLAZIONE DELL'APOPTOSI DA PARTE DI GLUCOCORTICOIDI E ANNESSINA-1

Prof. Luca Parente, Dip. Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università di Salerno.

***Elenco seminari seguiti Il 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 SIN 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

### ***Elenco seminari seguiti III anno dottorato***

19 / 10 / 2006

STEM CELLS IN CARDIAC PATHOPHYSIOLOGY AND TREATMENT.

Prof. Paolo Di Nardo (Laboratorio di cardiologia molecolare e cellulare; Dip. Medicina interna; Facoltà di Medicina; Università Tor Vergata - Roma)

12 / 4 / 2007

RELAZIONI TRA STRUTTURA E FUNZIONE DELLE PROTEINE MEDIANTE ANALISI DEL PROTEIN DATA BASE.

Prof. Marco Milanese (DISTA - Alessandria)

25 / 5 / 2007

THE REGULATION OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS BY SMAD SIGNALLING..

Prof Stefan Carlsson (Università di Lund-Svezia)

28 / 5 / 2007

TRANSLATING BASIC SCIENCE INTO THERAPEUTIC STRATEGIES FOR SHWACHMAN DIAMOND SYNDROME.

Prof. Steve Ellis (Università di Louisville-Kentucky)

21 / 6 / 2007

BIOINFORMATICS TOOLS FOR THE ANALYSIS OF UTRS AND FOR THE PREDICTION OF ALTERNATIVE SPLICED TRANSCRIPTS.

Dr Flavio Mignone (Università di Milano)

## **Seminari esterni**

06 / 05 / 2005, Torino, Facoltà di Farmacia  
THE JOURNEY OF CO FROM SEAL TO MAN  
Prof. P.F. Mannaioni, Università di Firenze

14 / 06 / 2005

Convegno: "Le sperimentazioni cliniche ed il ruolo del comitato etico"  
A cura del Comitato Etico dell' AO "Maggiore della Carità" di Novara

## **Partecipazione a congressi**

- 32° Congresso Società Italiana di Farmacologia (S IF)  
Napoli, 1-4 Giugno 2005
- XII Convegno Monotematico: Nicotina, neurobiologia, neuropsicofarmacologia.  
Genova, 5 giugno 2006
- 33° Congresso Società Italiana di Farmacologia (S IF)  
Cagliari 6-9 giugno 2007
- 4<sup>th</sup> International Summit on Acute Coronary Care  
Verona 19-21 giugno 2007

## **Comunicazioni a congressi**

### *A) Personalmente presentate*

Gunella G., Bardelli C., Amoruso A., Fresu LG., Brunelleschi S.

Effects of nicotine on human monocyte/macrophages: cytokine release, superoxide anion production and NF-kB activation.

32° Congresso SIF, Napoli, 1-4 giugno 2005, p.187 . Poster

Gunella G., Bardelli C, Amoruso A., Fresu L.G., Zeppego P., Brunelleschi S.

Sostanza P e depressione: espressione del recettore NK1, attivazione di NF-kB e rilascio di citochine in monociti di pazienti psichiatrici.

33° Congresso SIF, Cagliari 6-9 giugno 2007, abstract su CD. Comunicazione orale

Amoruso A., Bardelli C., Gunella G., Brunelleschi S., Ribichini F., Ferrero V., Vassanelli C.  
Gender differences-in PPAR-gamma expression in monocyte/macrophages from coronary artery disease (CAD) patients.

4<sup>th</sup> International Summit on Acute Coronary Care, Verona 19-21 giugno 2007. Abstract su CD. Premio per il miglior poster



## B) *Altre comunicazioni*

Bardelli C., Gunella G., Balbo P., Amoruso A., Brunelleschi S.

Functional NK1 receptors are present on human alveolar macrophages (AM): comparison between healthy smokers and non-smokers.

First Annual Winter Tachykinin Meeting 2005, Breckenridge (Colorado) 2-4 febbraio 2005.

Amoruso A., Gunella G., Rondano E., Ribichini F., Bardelli C., Vassanelli C., Brunelleschi S.  
PPAR- $\gamma$  expression in monocyte/macrophages of healthy smokers, healthy non-smokers and patients with cardiovascular diseases.

32° Congresso SIF, Napoli, 1-4 Giugno 2005, p. 97. Poster

Bardelli C., Gunella G., Amoruso A., Balbo P., Viano I., Brunelleschi S.

NK1 receptors induce superoxide anion production, cytokine release and NF- $\kappa$ B activation in alveolar macrophages from healthy smokers and non-smokers.

32° Congresso SIF, Napoli, 1-4 Giugno 2005, p. 147. Poster

Bardelli C., Amoruso A., Gunella G., Fresu LG., Brunelleschi S

Effects of nicotine on human monocyte/macrophages in smokers and non-smokers

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

Bardelli C., Gunella G., Amoruso A., Brunelleschi S., Romani A., Ieri F., Coinu R., Franconi F.  
A tuscan olive oil extract inhibits Nuclear Factor Kappa B activation in monocyte/macrophages from healthy donors

33° Congresso SIF, Cagliari 6-9 giugno 2007, abstract su CD. Poster.

## **Articoli Pubblicati nel corso del Dottorato**

BARDELLI C., GUNELLA G., VARSALDI F., BALBO P., DEL BOCA E., SERENBERNARDONE I., AMORUSO A., BRUNELLESCHI S.

Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF- $\kappa$ B pathway.

Br J Pharmacol. 2005 Jun;145(3):385-96.

GUNELLA G., BARDELLI C., AMORUSO A., VIANO I., BALBO P., BRUNELLESCHI S.

Macrophage-stimulating protein differently affects human alveolar macrophages from smoker and non-smoker patients: evaluation of respiratory burst, cytokine release and NF- $\kappa$ B 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.

Life Sci. 2007 Aug 23;81(11):906-15. Epub 2007 Jul 28.

BRUNELLESCHI S., BARDELLI C., AMORUSO A., GUNELLA G.,  
IERI F., ROMANI A., MALORNI W., FRANCONI F.  
Minor polar compounds extra-virgin olive oil extract (MPC-OOE)  
inhibits NF- $\kappa$ B translocation in human monocyte/macrophages  
Pharmacological Research, accettato per pubblicazione, ottobre 2007

AMORUSO A., BARDELLI C., GUNELLA G., RIBICHINI F. & BRUNELLESCHI S.  
A novel activity for substance P: stimulation of peroxisome proliferator activated receptor-  
gamma protein expression in human monocyte/macrophages  
British Journal of Pharmacology, submitted