

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



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XXIII

Relazione 2° anno

**Espressione del sistema degli endocannabinoidi (CB1-CB2) nel
tessuto adiposo epicardico umano**

Candidato: Cristiano Ariatti

***Responsabile del progetto:* Prof. Umberto Dianzani**

1.1 Introduzione e razionale

Le malattie cardiovascolari rappresentano la principale causa di morte nel mondo occidentale.

Il diabete di tipo 2, l'obesità e l'insulino-resistenza rappresentano i più importanti fattori di rischio cardiovascolare.

La nozione che l'infiammazione giochi un ruolo importante nello sviluppo dell'insulino-resistenza e del diabete è sostenuta da molteplici linee di evidenza.

Il concetto di infiammazione associato alle malattie metaboliche, come l'obesità e l'insulino-resistenza, risale alle osservazioni fatte da Hotamisligil agli inizi degli anni Novanta, il quale dimostrò che gli adipociti esprimono costitutivamente la citochina proinfiammatoria TNF α e che l'espressione di TNF α negli adipociti di animali obesi (topi *ob/ob*, e ratti *fa/fa* Zucker) è marcatamente aumentata. Inoltre, in questo modello sperimentale, la neutralizzazione di TNF α mediante recettori solubili del TNF α comportava la riduzione dell'insulino-resistenza. ⁽¹⁾

Tali osservazioni furono la prima dimostrazione del legame esistente tra aumentata espressione di citochine, livelli di citochine proinfiammatorie ed insulino-resistenza.

Successivamente veniva dimostrato che anche il tessuto adiposo umano era capace di esprimere costitutivamente TNF α e che la sua espressione si riduceva dopo perdita di peso. ⁽²⁾ Comunque, i tentativi per ridurre l'attività del TNF α nell'uomo, mediante infusione di anticorpi anti-TNF α non hanno avuto successo nel migliorare la sensibilità insulinica. ⁽³⁾

Un'altra recente acquisizione riguarda la compartimentalizzazione del tessuto adiposo. Diversi studi hanno oramai dimostrato che solo alcuni distretti di tessuto adiposo umano sono in grado di determinare insulino-resistenza e tra questi vanno ricordati quello sottocutaneo, quello omentale e quello epicardico, viceversa il tessuto adiposo gluteo-femorale sembra avere un ruolo protettivo nei confronti delle malattie cardiovascolari. ⁽⁴⁻⁸⁾

Il tessuto adiposo epicardio viene dunque considerato come un vero e proprio organo endocrino in grado di secernere, oltre al TNF α , diversi mediatori tra cui la leptina, l'adiponectina, la resistina, e il PAI 1. ⁽⁹⁻¹⁰⁾ Queste molecole, definite adipocitochine, giocano un ruolo importante nell'omeostasi metabolica e quando la loro produzione non è correttamente regolata possono contribuire alla genesi di disordini metabolici come la sindrome metabolica, il diabete di tipo 2 e l'aterosclerosi.

Il 1994 è stato l'anno in cui venne identificata per la prima volta la leptina, un ormone prodotto principalmente, anche se non esclusivamente, dall'adipocita. Da tale scoperta si è venuta a generare nuova luce sui meccanismi deputati al controllo dell'introito alimentare e dell'omeostasi energetica.

L'ipotalamo infatti è prepotentemente emerso come centralina di segnali circa lo stato nutrizionale percepito in periferia che qui vengono integrati e quindi nuovamente direzionati verso gli organi periferici deputati al controllo energetico.

Tra i molteplici attori di questa comunicazione centro-periferia il sistema cannabinoide endogeno si è posto recentemente in luce per l'insolita capacità d'azione di interagire a livello di bilancio energetico sia a livello centrale che periferico.⁽¹¹⁻¹³⁾

1.2 Gli endocannabinoidi e i loro recettori

I cannabinoidi endogeni o endocannabinoidi sono una famiglia numerosa di mediatori lipidici. Si tratta di molecole di piccole dimensioni e con proprietà lipofile, accomunate, dal punto di vista strutturale, dal fatto di essere delle amidi di acidi grassi. I principali cannabinoidi endogeni presenti nei tessuti e nei liquidi biologici sono l'arachidonil-etanolamide (AEA), noto anche come anandamide, ed il 2-arachidonoil-glicerolo (2AG).⁽¹⁴⁾ Si tratta di due molecole entrambe derivate dall'acido arachidonico e che legano con diversa affinità i recettori CB1 e CB2. Numerose sono inoltre le molecole sintetiche in grado di legare i recettori CB1 e CB2 con azione agonista o antagonista e con un potenziale sviluppo farmacologico nelle diverse funzioni biologiche in cui il sistema endocannabinoide è coinvolto.⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

Gli endocannabinoidi vengono sintetizzati "a domanda" per l'azione di specifiche vie enzimatiche che utilizzano, come substrato di partenza, dei fosfolipidi abbondantemente presenti nella struttura della membrana plasmatica. La fosfatidil-etanolamina è utilizzata per la sintesi dell'AEA mentre la sintesi del 2-AG utilizza il fosfatidil-inositolo.

La degradazione degli endocannabinoidi è altrettanto rapida e prevede la degradazione dell'AEA ad acido arachidonico ed etano lamina ad opera dell'enzima FAAH (fatty acids amide hydrolase) mentre la degradazione del 2-AG prevede l'idrolisi della molecola da parte dell'enzima monoacilglicerolo-lipasi (MAGL).⁽¹⁷⁾ E' possibile pertanto ritenere che in condizioni normali il sistema degli endocannabinoidi non sia attivo, e che questi mediatori lipidici vengano prodotti acutamente su domanda, agiscano localmente e vengano rapidamente inattivati.

I cannabinoidi esercitano la loro azione farmacologica attraverso le interazioni con specifici recettori CB1 e CB2, che sono stati descritti e clonati tra gli anni '80 e '90. CB1 è espresso in maniera preferenziale a livello del SNC, del tessuto adiposo, muscolare scheletrico e miocardico,

nel tratto gastrointestinale, nel fegato e a livello delle cellule endoteliali. Il recettore CB2 invece, è localizzato nelle cellule del sistema linfatico e nei macrofagi periferici.⁽¹⁸⁾

I recettori per gli endocannabinoidi hanno un'elevata affinità per i due ligandi endogeni l'anandamide e il 2-AG che appartengono ad una vasta famiglia di composti lipidici (lipid mediators) con affinità variabile con i recettori CB1 e CB2.

1.3 Gli endocannabinoidi e la regolazione ipotalamica del bilancio energetico

Dopo la scoperta dei recettori per i cannabinoidi e la disponibilità di molecole di sintesi ad azione agonista ed antagonista, la ricerca sugli effetti del sistema cannabinoide endogeno subì una forte accelerazione ed il ruolo di questo sistema nel controllo centrale e periferico del bilancio energetico iniziò a chiarirsi.

Nel 2001 venne chiaramente dimostrato come i livelli di anandamide e 2-AG erano aumentati nell'ipotalamo di topi *ob/ob*, *db/db* e ratti Zucker, 3 modelli di obesità animale geneticamente determinati. Inoltre il trattamento con leptina, un ormone anoressante periferico prodotto dall'organo adiposo, era in grado di ridurre i livelli di endocannabinoidi ipotalamici sia nei topi normali che nei topi *ob/ob* che sono geneticamente privi di leptina circolante.⁽¹⁹⁾

Complessivamente i risultati di questi esperimenti hanno indicato nel sistema cannabinoide ipotalamico un importante regolatore del consumo di cibo, integrato con altre vie ipotalamiche di controllo del bilancio energetico già da tempo note, in particolare con il sistema leptina-neuropeptide Y. Nei topi *knockout* per il gene CB1 si osserva una lieve, ma significativa riduzione della percentuale di peso corporeo e di massa grassa.⁽²⁰⁾

1.4 Gli endocannabinoidi e la regolazione del metabolismo periferico

Recentemente alcuni dati sperimentali, ottenuti in modelli animali ed in linee cellulari, hanno mostrato che il sistema cannabinoide è presente con i suoi recettori ed i suoi enzimi di sintesi e degradazione, a livello di numerosi tessuti periferici.⁽²¹⁻²⁴⁾ Il recettore CB1, inizialmente ritenuto espresso solo nel SNC, è presente anche negli adipociti.⁽²⁵⁾ Inoltre è stato dimostrato che ratti geneticamente obesi (Zucker *fa/fa*) hanno livelli aumentati di espressione di CB1 nel tessuto adiposo.

E' stato quindi ipotizzato che nell'obesità sia presente un'iperattivazione del sistema endocannabinoide anche nel tessuto adiposo e che questa iperattivazione sia anch'essa responsabile

dell'eccessiva deposizione di tessuto adiposo. In linee cellulari di adipociti come la linea 3T3-F442A è stata evidenziata una up-regolazione del sistema cannabinoide nello stadio che precede la differenziazione adipocitaria, responsabile probabilmente della differenziazione della cellula ad adipocita maturo.⁽²⁶⁾ Questi dati, però, non sono stati confermati nell'uomo, dove i livelli d'espressione sia del recettore CB1 che dell'enzima FAAH nel tessuto adiposo sottocutaneo sono risultati francamente down-regolati nell'obesità.

I recettori CB1 sono presenti anche nel fegato e sembrano coinvolti, almeno nel topo, nella lipogenesi e nello sviluppo della steatosi epatica. Infatti, Osei-Hyiaman et al.⁽²⁷⁾ hanno dimostrato nel modello murino che l'attivazione del recettore CB1 aumenta l'espressione epatica del fattore di trascrizione SREBP 1c e dei geni da esso regolati (acetil CoA carbossilasi, acido-grasso sintetasi). Il trattamento con un antagonista recettoriale del CB1 riduce la lipogenesi epatica.

Questi dati, anche se necessitano di dimostrazioni dirette nell'uomo, indicherebbero che il sistema endocannabinoide è profondamente coinvolto nella lipogenesi epatica ed è potenzialmente implicato nella patogenesi del patologico accumulo di trigliceridi nella steatosi epatica associata alla sindrome metabolica.

Studi condotti su modelli animali di obesità genetica hanno dimostrato che il recettore CB1 è up-regolato nei topi.⁽²⁸⁾ Inoltre, come è noto, l'espressione nel tessuto adiposo ed i livelli circolanti di adiponectina sono ridotti nell'obesità. Il trattamento con un antagonista CB1 è in grado di up-regolare l'espressione dell'adiponectina nel tessuto adiposo degli animali obesi.⁽²⁸⁾ Questi dati suggeriscono che gli effetti benefici del trattamento con l'antagonista CB1 possa essere, almeno in parte, mediato attraverso un meccanismo dipendente dall'adiponectina.

2.1 Disegno e obiettivi dello studio

Durante il primo di dottorato è stato dimostrato che il tessuto adiposo epicardico umano esprime il sistema degli endocannabinoidi (CB1 e CB2) sia come RNA messaggero che come proteina. L'immunoistochimica ha inoltre permesso di chiarire che i recettori CB1 e CB2 sono espressi dagli adipociti maturi.

Il lavoro, svolto durante il secondo anno di dottorato, si è prefissato i seguenti obiettivi :

1) dimostrare che i preadipociti e gli adipociti maturi derivati dal tessuto epicardico esprimono i recettori degli endocannabinoidi (CB1 e CB2): *i)* questo è stato valutato isolando dal tessuto adiposo la frazione vascolare stromale, frazione che contiene i pre-adipociti che se seminati in un terreno di differenziamento adipogenico divengono adipociti maturi; *ii)* il fenotipo adipogenico è stato valutato osservando la morfologia delle cellule e colorando con un reagente commerciale i vacuoli; valutando poi negli adipociti maturi l'espressione mediante RT-PCR del messaggero dell'adiponectina, un noto marcatore di adipogenesi; *iii)* l'espressione dei recettori CB1 e CB2 è stata infine valutata mediante RT-PCR e real time PCR.

2) valutare se vi sono differenze nell'espressione del messaggero di CB1 in due gruppi distinti di pazienti: un primo gruppo è rappresentato da malati affetti da cardiopatia ischemica in attesa di rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico (CAD) e un secondo gruppo di pazienti senza fattori di rischio cardiovascolare da sottoporre a cardiocirurgia valvolare (non-CAD). L'espressione di CB1 nei due gruppi di pazienti verrà valutata mediante real time PCR

3. Materiali e metodi

3.1 Prelievo dei campioni di tessuto adiposo epicardio

Il tessuto adiposo epicardio è stato prelevato in due gruppi distinti di pazienti, un primo gruppo rappresentato da malati affetti da cardiopatia ischemica in attesa di rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico (CAD: $n=8$) e un secondo gruppo rappresentato da pazienti senza fattori di rischio cardiovascolare sottoposti a cardiocirurgia valvolare (non-CAD: $n=10$).

Il prelievo è stato eseguito con le seguenti modalità: un frammento di tessuto adiposo di circa 2-3 grammi è stato biopsiato in prossimità del tratto prossimale della coronaria destra prima di iniziare la circolazione extracorporea.

In due pazienti, per lo studio del grasso perivascolare, il campione è stato prelevato a ridosso della coronaria; come controllo, è stato eseguito il prelievo di tessuto adiposo lontano dai vasi coronarici, lungo la parete libera del ventricolo destro.

Il campione è stato conservato in soluzione fisiologica e congelato in azoto liquido ad una temperatura di -80°C nel corso della prima ora dal prelievo.

La frazione stromale vascolare (SFV) è stata isolata partendo da materiale fresco, in soluzione fisiologica.

3.2 Isolamento delle cellule stromali da tessuto adiposo epicardio e sottocutaneo umano

I tessuti umani adiposo epicardico e sottocutaneo sono stati frammentati ed in seguito digeriti a 37°C in PBS 2% BSA e collagenasi (1mg/ml, Worthington) per 40 min. Al termine della digestione, le cellule sono state filtrate usando un filtro di $70\ \mu\text{m}$ (Falcon) per rimuovere i detriti cellulari ed i tessuti indigeriti. In seguito, le cellule sono state centrifugate per rimuovere gli adipociti (presenti nel surnatante) ed il pellet cellulare ottenuto è stato così risospeso in un terreno completo (DMEM con 10% FBS). Infine, le cellule sono state contate e pilastrate ad una densità di 50.000 cellule/cm².

La frazione aderente delle cellule stromali, derivate dal tessuto adiposo sottocutaneo ed epicardico (tra il passaggio P1 e P4), è stata indotta verso il differenziamento adipogenico usando uno specifico kit commerciale (Cambrex). Il fenotipo adipogenico è stato valutato morfologicamente colorando i vacuoli con il reagente specifico ADIPORED (Cambrex) e mediante RT-PCR (sezione 3.3 e 3.4) ricercando specifici marcatori di adipogenesi.

3.3 Estrazione dell'RNA e reazione di retrotrascrizione (RT-PCR)

Il campione di pre-adipociti e adipociti maturi tessuto adiposo epicardico e sottocutaneo è stato disgregato manualmente e l'RNA è stato successivamente estratto utilizzando il kit commerciale Nucleospin RNAII (Machery-Nagel, Germany) seguendo le istruzioni fornite dal costruttore. 500 ng di tale RNA sono stati utilizzati come stampo per generare la prima elica di cDNA, tramite impiego del ThermoScriptTM RT-PCR System (Invitrogen). Questa metodica consiste in una prima fase di denaturazione delle strutture secondarie dell'RNA condotta a 65°C per 5'. I random primers presenti nella miscela vengono utilizzati come innesco della reazione di retrotrascrizione. Il

campione viene quindi trasferito in ghiaccio, che permette l'appaiamento tra l'oligonucleotide e il suo stampo. Al campione vengono poi aggiunti: il Buffer di reazione 5X (compreso nel kit), il ditiotritolo (DTT), un inibitore delle Rnasi, RNaseOUT™, e 1U di trascrittasi inversa ThermoScript™ RT. L'acqua utilizzata durante la manipolazione dell'RNA è stata trattata con DietilPirocarbonato (DEPC). Il ciclo di reazione prevede 25°C a 10', 50°C a 5' ed infine 5' a 85°C per eliminare l'RNA.

3.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

I geni CB1, CB2, adiponectina e GAPDH [numeri di accesso presenti nella banca dati curata dall'NCBI: CB1 (NM_016083); CB2 (NM_001841); GAPDH (AF261085); ADIPOQ (NM_004797.2)] sono stati amplificati mediante PCR con i primers mostrati in tabella 1. La reazione di PCR è stata allestita con 1 µl di cDNA in volume finale di 25 µl contenente il tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0.5 µM di ciascun oligonucleotide, 0.2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi e 1U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen). Le concentrazioni di MgCl₂ impiegate per l'amplificazione sono: 1mM (CB1 e CB2) e 1.5 mM (adiponectina, GAPDH).

Le condizioni di reazione sono le seguenti:

CB1: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 30'', una di appaiamento a 52°C per 30'', e una di sintesi a 72°C per 40'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.

CB2: il programma è sovrapponibile a quello utilizzato per CB1 con l'unica differenza che la fase di appaiamento avviene a 54°C.

ADIPONECTINA: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 15', una di appaiamento a 58°C per 15'', e una di sintesi a 72°C per 20'. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.

GAPDH: 1 ciclo di denaturazione a 94° 5'; seguito da 35 cicli composti da una fase di denaturazione a 94°C per 20'', una di appaiamento a 57°C per 20'', e una di sintesi a 72°C per 40''. Segue infine un ciclo di sintesi a 72°C per 10'.

Tabella 1. Sequenze dei primers impiegati per l'amplificazione dell' mRNA di *CB1*, *CB2*, *ADIPONECTINA* e *GAPDH*

Gene	Primers	Dimensioni amplificato(bp)
<i>CB1</i>	Forward GAGCTCAGCCTAATCAAA G	676
	Reverse TATGTACCTGTCGATGGC	
<i>CB2</i>	Forward ACAAGCTCAGTGGAAATCT G	378
	Reverse ATAGTCACGCTGCCAATC	
<i>adipoQ</i>	Forward TGGGCCATCTCCTCCTCA	100
	Reverse GCAGTAGAACAGCTCCCA GC	
<i>GAPDH</i>	Forward ACCACAGTCCATGCCATC	500
	Reverse TCCACCACCCTGTTGCTGT A	

3.5 Real time PCR

L'RNA messaggero è stato estratto dai pre-adipociti e adipociti derivati da tessuto adiposo epicardio e sottocutaneo. Come descritto in precedenza nella sezione 3.2, 500 ng di RNA totale sono stati poi retrotrascritti utilizzando il kit ThermoScript RT-PCR System. Le sonde relative all'RNA codificante per CB1 (assay ID: Hs00275634_m1) e per 18s (assay ID: Hs99999901_m1), utilizzato come gene *housekeeping* di controllo, sono state acquistate da Applied Biosystems. Tutti gli step relativi sono stati eseguiti in un ABI Prism 7000 Sequence Detector, e i dati ottenuti sono stati analizzati tramite metodo del Cycle Threshold.

3.6 Elettroforesi su gel d'agarosio

Il gel è stato preparato sciogliendo l'agarosio in Tampone Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1% contenente gel red (10,000X). L'esposizione agli UV del gel permette il rilevamento del DNA grazie alla fluorescenza emessa dal gel red incorporato dal campione.

3.7 Estrazione delle proteine e Western Blot

I preadipociti e gli adipociti isolati dal tessuto adiposo epicardio e da quello sottocutaneo sono stati omogeneizzati usando il sonicatore (3 pulse 10 secondi) in ghiaccio fino a completa disgregazione del pezzo. I pre- e/ adipociti sono stati lisati per estrarne le proteine totali, in volume di 100-150 μ l di buffer RIPA (Tris Hcl pH 7.2 20mM, Na-desossicolato 0.5%, Triton-X-100 1%, SDS 0.1%, NaCl 150 MM, EDTA 5mM). Dopo un'incubazione di 30' in ghiaccio, è stata eseguita una centrifugazione a 12000 rpm a 4°C per 15'. Il surnatante così ottenuto rappresenta l'estratto proteico che viene dosato mediante l'uso di Protein Assay (Biorad), una variante del metodo Braedford.

50 μ g di proteine di estratto cellulare sono stati separati mediante SDS-PAGE su gel di poliacrilammide al 10% secondo protocollo standard (*current protocols in molecular biology*).

I campioni sono stati quindi trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Hybond-C Extra, Amersham Biosciences) per 1,5 ore a 100V in tampone di trasferimento (Tris base 3g/l, Glicina 14,4 g/l, SDS 1 g/l, Metanolo 10%). Per verificare l'avvenuto trasferimento delle proteine dal gel alla nitrocellulosa, la membrana è stata colorata con Rosso Ponceau (Sigma Aldrich) e poi lavata con TBS (Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g/l pH 7,6) 1% Tween-20. La nitrocellulosa viene quindi saturata con una soluzione di 5% latte in polvere sciolto in TBS-T, e quindi incubata 2 ore a temperatura ambiente oppure 16 ore a +4°C con anticorpo primario specifico diluito in TBS-T 5% latte o BSA. Successivamente il filtro di nitrocellulosa è stato incubato con anticorpo secondario coniugato ad HRP (perossidasi di rafano) per 1 ora. Dopo 3 lavaggi in TBS-T, il filtro viene incubato con i substrati specifici per chemiluminescenza (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences), ed il segnale luminoso emesso dalla reazione viene utilizzato per impressionare i film da autoradiografia. Il segnale ottenuto sulle lastre impressionate rappresenta quindi le bande proteiche riconosciute dall'anticorpo primario specifico. Gli anticorpi impiegati nell'analisi delle proteine sono: α -CB1 (Santa Cruz. policlonale), α -CB2 (Cayman, monoclonale).

Per la rivelazione degli anticorpi primari, sono stati utilizzati un anticorpo anti-rabbit (CB2) e un anticorpo anti-goat (CB1) (Sigma Aldrich), coniugati ad HRP.

3.8 Analisi statistica.

E' stato utilizzato il test non parametrico Mann-Whitney U per valutare se vi era una differenza statisticamente significativa dell'espressione di CB1 nei due gruppi di pazienti analizzati.

Per l'analisi densitometrica è stato utilizzato il software Quantity one (Bio-Rad).

4. RISULTATI

4.1 Isolamento delle cellule stromali da tessuto adiposo epicardio.

Le cellule stromali, isolate dal tessuto adiposo omentale e da quello di derivazione sottocutanea, quando vengono fatte crescere in un terreno di differenziamento adipogenico sono in grado di differenziarsi in adipociti maturi ⁽²⁵⁾.

Abbiamo valutato se anche le cellule stromali di derivazione epicardica fossero in grado di differenziarsi in adipociti maturi.

I campioni di tessuto adiposo epicardico sono stati trattati con collagenasi e gli adipociti maturi separati dalla frazione stromale vascolare (SFV), contenente i pre-adipociti.

Le cellule della SFV sono state seminate in un terreno completo DMEM con FBS al 10%. In parallelo, come controllo, è stato impiegato tessuto adiposo sottocutaneo.

I pre-adipociti sono state poi indotti verso il differenziamento adipogenico usando un terreno commerciale (Cambrex) (come descritto in Mat&Met). Parallelamente, le stesse cellule stromali sono state mantenute in un terreno DMEM (controllo negativo).

Dopo 2 settimane, le cellule nel terreno adipogenico, hanno iniziato a differenziarsi in adipociti maturi con la comparsa di grossi vacuoli contenenti gocce lipidiche nel citoplasma delle cellule, come mostrato nella **figura 4.1**.

Inoltre, il fenotipo adipogenico dei pre-adipociti indotti al differenziamento è stato confermato, valutando mediante RT-PCR, la presenza del messaggero per l'adiponectina, marcatore espresso dagli adipociti maturi (**Fig. 4.2**). Come mostrato in figura, solo le cellule differenziate in adipociti (A) esprimono il messaggero per l' adiponectina.

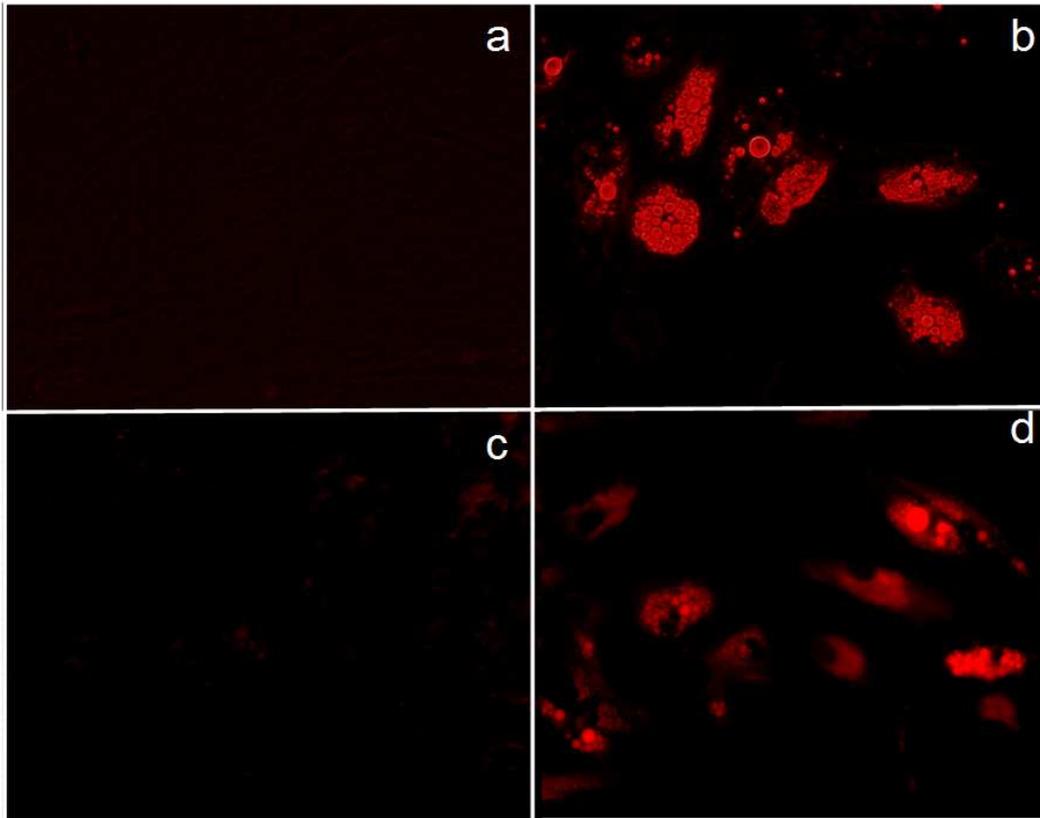


Fig. 4.1. Pre-adipociti e adipociti maturi di derivazione sottocutanea e epicardica. In *b)* e *d)* sono mostrati gli adipociti “sottocutanei” (b) e epicardici (d) i cui vacuoli sono stati marcati con ADIPO RED assay reagent. In *a)* e *c)* le cellule indifferenziate rispettivamente di derivazione sottocutanea ed epicardica.

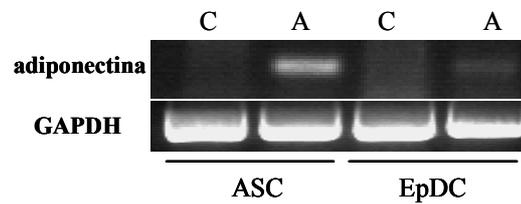


Figura 4.2. RT-PCR del gene adiponectina su cellule indifferenziate (C) e mature (A) di derivazione adiposottocutanea (ASC) e adipo-epicardica (EpDC).

4.2 Espressione dei messaggeri per CB1 e CB2 nei pre-adipociti e negli adipociti maturi.

Abbiamo poi valutato l'espressione dei messaggeri per CB1 e CB2 nei pre-adipociti (C) e adipociti maturi (A) mediante RT-PCR di derivazione epicardica e sottocutanea (controllo positivo). Come mostrato in **figura 4.3**, gli adipociti epicardici, come i loro precursori, esprimono i messaggeri di CB1 e CB2.

Dalla analisi densitometrica è emerso che solo l'espressione del messaggero di CB1 aumenta nelle cellule con fenotipo adipogenico (**Fig 4.4A**). Tale aumento è di circa 5 volte, nel caso delle cellule di derivazione sottocutanea, e 2,5 volte in quelle di derivazione epicardica. Tale dato è stato successivamente confermato mediante real time PCR (**Fig 4.4B**).

Per quanto riguarda CB2, il suo messaggero è risultato essere incrementato nei pre-adipociti rispetto alle cellule adipose mature, come mostrato in **figura 4.5**.

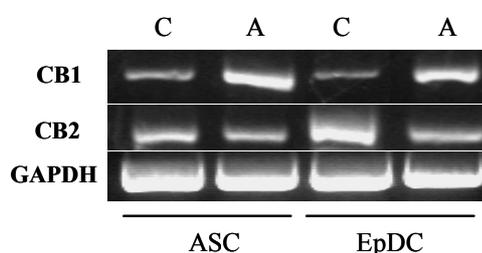


Figura 4.3. RT-PCR dei geni CB1, CB2 e GAPDH su cellule indifferenziate (C) e mature (A) di derivazione adipo-sottocutanea (ASC) e adipo-epicardica (EpDC)

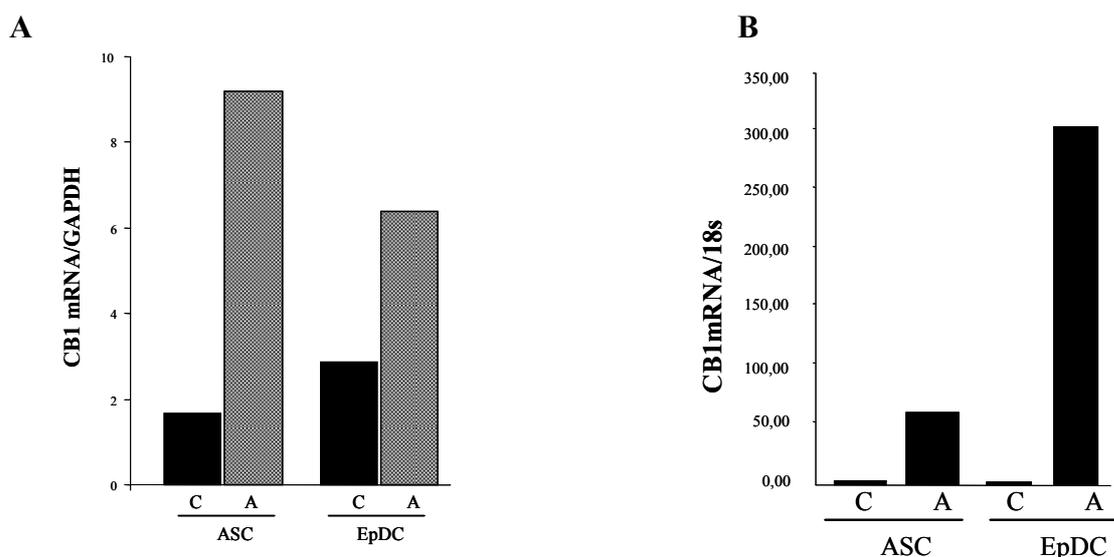


Figura 4.4. A) Analisi densitometrica e B) Real time PCR dell'mRNA di CB1 su cellule indifferenziate (C) e mature (A) di derivazione adipo-sottocutanea (ASC) e adipo-epicardica (EpDC).

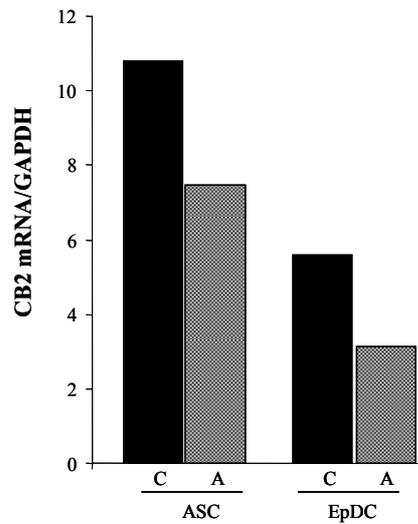


Figura 4.5. Analisi densitometrica dell'mRNA di CB2 su cellule indifferenziate (C) e mature (A) di derivazione adipo-sottocutanea (ASC) e adipo-epicardica (EpDC).

4.3 Espressione delle proteine CB1 e CB2 nei pre-adipociti e negli adipociti maturi.

Per valutare se nei pre-adipociti e adipociti maturi erano presenti le corrispettive proteine, abbiamo allestito un esperimento di Western Blot partendo da differenti concentrazioni di proteine estratte. La concentrazione ottimale è risultata essere di 50 microgrammi, in quanto concentrazioni superiori non permettevano la discriminazione delle bande attese.

Le bande dal peso atteso (55 KDa per CB1 e di 40 KDa per CB2) sono state rilevate usando gli anticorpi primari descritti in Materiali & Metodi (**figura 4.6**).

Al fine di verificare la specificità degli anticorpi primari utilizzati abbiamo usato come controllo negativo per CB1 la linea cellulare Jurkat, poiché in letteratura è descritto che tali cellule non esprimono (se si, a bassi livelli) il messaggero e la corrispettiva proteina. Tale dato è stato da noi confermato sia in Western Blot sia in RT-PCR (dato non mostrato). Invece, come controlli positivi (sia per CB1 che CB2) sono stati utilizzati i lisati proteici estratti dai distretti adiposi omentale e sottocutaneo (dati non mostrati)

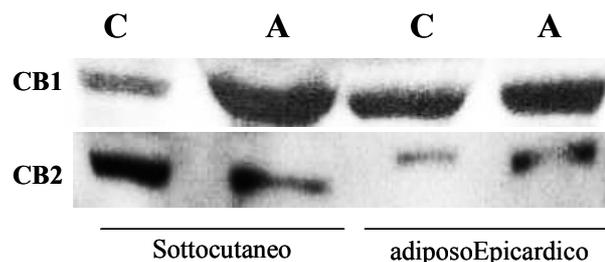


Figura 4.6. Western Blot su estratti proteici da cellule indifferenziate (C) e mature (A) di derivazione adiposottocutanea (ASC) e adipo-epicardica (EpDC).

4.4 Valutazione dei livelli di CB1 nei pazienti con cardiopatia ischemica (CAD).

L'espressione di CB1 è stata valutata mediante real time PCR in 8 pazienti con cardiopatia ischemica (CAD) e in 10 pazienti non-CAD (come descritto in Mat&Met). Il tessuto adiposo epicardico dei pazienti CAD mostra una maggior espressione di CB1 (mediana: CAD 0.72 vs 0.46 non-CAD). Tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa nei due gruppi di pazienti ($p=0,2$) (**Fig 4.7**).

Dal momento che il prelievo della biopsia di tessuto adiposo epicardico è del tutto casuale, è stata valutata l'espressione di CB1 in biopsie di tessuto epicardico aventi due differenti locazioni: vicino (V) e lontano dalla coronarie (L) nello stesso paziente.

Sono stati eseguiti prelievi di tessuto adiposo epicardio (V e L) da due pazienti CAD e da due pazienti non-CAD. L'espressione di CB1 è stata valutata successivamente mediante real time PCR. Come mostrato in **figura 4.8** l'espressione di CB1 è risultata essere aumentata nel tessuto epicardico V dei pazienti CAD rispetto ai pazienti non-CAD (mediana CAD 1.3 vs 0.33 non-CAD); tale differenza non è statisticamente significativa a causa della poca numerosità dei campioni.

Per quanto riguarda l'espressione di CB1 nei distretti adiposo epicardici "L" non sono state osservate differenze tra i due gruppi di pazienti (dati non mostrati).

Questo dato molto interessante verrà confermato ampliando la casistica di pazienti.

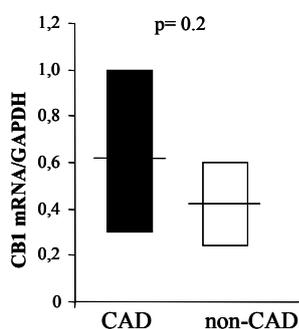


Figura 4.7. Real time PCR sull'mRNA di CB1 di 8 pazienti CAD e 10 pazienti non-CAD. In figura è riportata la regione interquartile (box 75° e 25° percentile) dei valori di normalizzati della quantità di CB1 espressa nei vari soggetti. La linea orizzontale indica la mediana dei valori ottenuti.

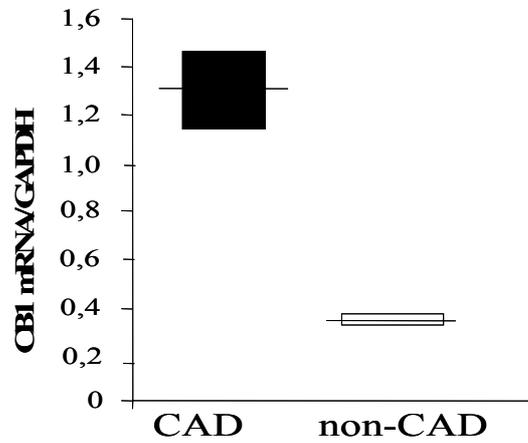


Figura 4.8. Real time PCR sull'mRNA di CB1 di 2 pazienti CAD e 2 pazienti non-CAD, su mRNA estratto da tessuto adipo-epicardico vicino alle coronarie (V). . In figura è riportata la regione interquartile (box75° e 25°) dei valori di normalizzati della quantità di CB1 espressa nei vari soggetti. La linea orizzontale indica la mediana dei valori ottenuti.

5. Discussione

Durante il primo anno di dottorato è stata dimostrata la presenza dei recettori CB1 e CB2 nel tessuto adiposo epicardico umano attraverso tre differenti tecniche di biologia molecolare.

Il tessuto adiposo epicardico, come il tessuto adiposo omentale e sottocutaneo, esprime i messaggeri per CB1 e CB2 (dimostrato mediante **RT-PCR**) e le corrispettive proteine (mediante **Western Blot**). Inoltre, è stato confermato (mediante **Immunoistochimica**) che gli adipociti maturi esprimono in membrana le corrispettive proteine .

Il lavoro qui presentato dimostra che i recettori per gli endocannabinoidi sono presenti anche negli adipociti isolati da tessuto adiposo epicardio umano; il dato interessante è la dimostrazione che tali recettori sono presenti non solo sugli adipociti maturi ma anche in precursori più immaturi, presenti nella frazione stromale. La differenziazione in senso adipocitario è stata valutata da un lato osservando la morfologia delle cellule e colorandone i vacuoli con un reagente commerciale (oil red o-staining) e dall'altro valutando l'espressione mediante RT-PCR del messaggero dell'adiponectina, un noto marcatore di differenziazione adipocitaria.

Un dato interessante è emerso anche dall'analisi densitometrica che ha mostrato che l'espressione di CB1 risulta essere incrementata negli adipociti maturi, sia in quelli di derivazione epicardica sia in quelli di derivazione sottocutanea (controllo positivo). Tale aumento è di circa 5 volte, nel caso delle cellule di derivazione sottocutanea, e 2,5 volte in quelle di derivazione epicardica. Questo risultato è stato poi da noi validato mediante real time PCR.

Tale osservazione è in linea con lavori sperimentali eseguiti utilizzando linee cellulari di preadipociti murini, messe in differenziamento in presenza di insulina e desametasone. Gli autori dimostrano che nella differenziazione adipocitaria esiste una up-regolazione sia dei recettori per gli endocannabinoidi che degli agonisti endogeni (2 AG e anandamide).⁽³⁰⁾

Per quanto riguarda il recettore CB2, il suo messaggero è risultato essere meno espresso negli adipociti maturi. Tale dato non stupisce poiché è nota la sua marcata espressione principalmente nelle cellule del sistema immunitario (linfociti T e B, natural killer e macrofagi).

Recentemente, in letteratura, è stato dimostrato che gli adipociti perivascolari mostrano una ridotta capacità a differenziarsi in adipociti, paragonati a quelli derivati da tessuto adiposo omentale e sottocutaneo. Inoltre, tali cellule secernono alti livelli di adipochine pro-infiammatorie (IL6, IL-8)⁽³¹⁾.

Inoltre, Sugamura et al hanno dimostrato che i macrofagi presenti nelle lesioni arterosclerotiche esprimono CB1 e che antagonizzando il recettore con il farmaco Rimonabant viene ridotta la

produzione dei mediatori proinfiammatori da parte dei macrofagi stessi ⁽³²⁾.-Infine, l'infiammazione del tessuto adiposo riveste un ruolo importante nella patogenesi dell'insulino-resistenza, che a sua volta rappresenta un fattore di rischio importante per lo sviluppo di aterosclerosi e malattie cardiovascolari. ⁽³³⁻³⁶⁾

Con le precedenti premesse, abbiamo analizzato mediante real time PCR l'espressione di CB1 in due gruppi distinti di pazienti :i) un primo gruppo è rappresentato da malati affetti da cardiopatia ischemica in attesa di rivascolarizzazione miocardica mediante by-pass aortocoronarico (CAD) e ii) un secondo gruppo di pazienti senza fattori di rischio cardiovascolari da sottoporre a cardiocirurgia valvolare (non-CAD). Sebbene il tessuto adiposo epicardico dei pazienti CAD mostrerebbe una maggior espressione di CB1 (mediana: CAD 0.72 vs 0.46 non-CAD), tale differenza non è risultata essere statisticamente significativa ($p=0,2$).

Alla luce di questi risultati e analizzando i dati recentemente emersi in letteratura sul tessuto adiposo perivascolare, abbiamo iniziato a campionare le biopsie diversamente, e più precisamente prelevando il tessuto adiposo a ridosso delle coronarie (tessuto adiposo perivascolare) e lontano dai vasi epicardici. Sono stati prelevati i due differenti frammenti di tessuto adiposo epicardico in 2 pazienti affetti da cardiopatia ischemica e in due controlli sani sottoposti a chirurgia valvolare. L'espressione di CB1 è stata valutata mediante real time PCR

I dati sperimentali ottenuti mostrano che l'espressione di CB1 è risultata essere aumentata nel tessuto epicardico perivascolare dei pazienti affetti da cardiopatia ischemica rispetto ai controlli (mediana CAD 1.3 vs 0.33 non-CAD); tale differenza non è statisticamente significativa a causa della poca numerosità dei campioni.

Questo dato, seppur non significativo, ma con un trend interessante, è importante, in quanto è ampiamente dimostrato un ruolo di CB1 nella modulazione della meta-infiammazione. Tale recettore risulta inoltre up-regolato assieme ai suoi agonisti endogeni nell'adipocita maturo. La maggiore espressione nell'adipocita perivascolare coronarico, potrebbe suggerire un ruolo diretto di questo recettore e dei suoi agonisti nella genesi della disfunzione endoteliale e successivamente dell'aterosclerosi coronarica.

Tali dati andranno confermati incrementando la numerosità del campione e valutando parallelamente se la patologia aterosclerotica coronarica, oltre ad essere associata ad una maggiore espressione di CB1 nel tessuto adiposo perivascolare, risulta essere associata anche a un incremento dei mediatori endogeni di CB1 (2-AG e anandamide).

Questo lavoro ha dimostrato inoltre che i recettori per gli endocannabinoidi sono presenti anche in cellule adipose più immature, chiamate pre-adipociti, che fanno parte del compartimento stromale. Entrambi i recettori sono presenti in sia nelle cellule più mature che negli adipociti differenziati con

una differenza; CB1 tende a essere up regolato durante la differenziazione, mentre CB2 sembra essere più espresso nei pre-adipociti. Tale dato, se confermato, potrebbe suggerire un ruolo di CB2 nella maturazione del compartimento adiposo epicardico.

Bibliografia

- 1 Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; 259: 87-91.
- 2 Kern PA, Saghizadeh M, Ong JM, et al. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J Clin Invest* 1995; 95: 2111-2119.
- 3 Ofei F, Hurel S, Newkirk J, et al. Effects of an engineered human anti-TNF α antibody (CDP571), on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 1996; 45: 881-885.
- 4 Tai ES, Lau TN, Ho SC, Folk AC, Tan CE Body fat distribution and cardiovascular risk in normal weight women. Associations with insulin resistance, lipids and plasma leptin. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2000; 24: 751-757.
- 5 Messerli FH. Obesity and essential hypertension. Hemodynamics, intravascular volume, sodium excretion, and plasma renin activity. *Arch. Intern. Med.* 1981; 141: 81-85.
- 6 Liuzzi A Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors. 1999; *J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 1999; 23: 1066-1073.
- 7 Iacobellis G, Ribaldo MC, Assael F, Vecci E, Tiberti C, Zappaterreno A, Di Mario U, Leonetti F Echocardiographic epicardial adipose tissue is related to anthropometric and clinical parameters of metabolic syndrome: a new indicator of cardiovascular risk. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 5163-5168.
- 8 Iacobellis G, Leonetti F Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90: 6300-6302.

- 9 Mazurek T, Zhang L, Zalewski A, Mannion J, Diehl J, Arafat h, Sarov-Blat L, O'Brien S, Keiper E, Johnson A, Martin J, Goldstein B, Shi Y. Human epicardial adipose tissue is a source of inflammatory mediators. *Circulation* 2003; 108: 2460-2466.
- 10 Iacobellis G, Pistilli D, Gucciardo M, Leonetti F, Miraldi F, Brancaccio G, Gallo P, Di Gioia C. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2005; 29: 251-255.
- 11 Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its yherapeutgic exploitation. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 771-784.
- 12 Di Marzo V, Matias I. Endocannabinoid control of food intake and energy balance. *Nat Neurosci* 2005; 8: 585-589.
- 13 Vickers SP, Kennett GA. Cannabinoids and the regulation of ingestive behaviour. *Drug Targets* 2005; 6: 215-223.
- 14 Piomelli D The molecular logico f endocannabinoid signalling. *Nat. Rev. Neurosci* 2003; 4: 873-884.
- 15 Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain *Science*; 2002; 296 (5568): 678-682.
- 16 Di Marzo V, De Petrocellis L, Bisogno T. The biosynthesis, fate and pharmacological properties of endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005; 168: 147-85.
- 17 Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat. Rev. Drug. Discov* 2004; 3: 771-784.
- 18 Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. International union of pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *PharmacolRev* 2002; 54: 161-2002.

- 19 Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Bãtkai S, Jãrai Z, Fezza F, Miura GI, Palmiter RD, Sugiura T, Kunos G. Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake. *Nature* 2001; 410 (6830): 763-765.
- 20 Ravinet Trillou C, Delgorge C, Menet C, Arnone M, Soubrie P. CB1 cannabinoid receptor knockout in mice leads to leanness, resistance to diet-induced obesity and enhanced leptin sensitivity. *Int. J. Obes. Relat Metab. Disord* 2004; 28: 640-648.
- 21 Croci T, Manara L, Aureggi G, Guagnini F, Rinaldi-Carmona M, Maffrand JP, Le Fur G, Mukenge S, Ferla G. In vitro functional evidence of neuronal cannabinoid CB1 receptors in human ileum. *British Journal of Pharmacology* 1998; 125; 1393-1395.
- 22 Pertwee RG Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut* 2001; 48: 859-867.
- 23 Szabo B, Nordheim U, Niederhoffer N. Effects of cannabinoids on symphatetic and parasympathetic neuroeffector transmission in the rabbit heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2001; 297; 819-826.
- 24 Wagner JA, Jarai Z, Batkai S, Kunos G. Hemodynamic effects of cannabinoids: coronary and cerebral vasodilation mediated by cannabinoid (CB (1) receptors. *European Journal of Pharmacology*. 2001; 423: 203-210.
- 25 Roche R, Hoareau L, Houtmann SB, Gonthier MP, Laborde C, Baron JF, Haffaf Y, Cesari M, Festy F. Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes. *Histochem Cell Biol* 2006; 126 (2): 177-87.
- 26 Matias I, Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festy F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P, Di Marzo V. Regulation, function and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin. Metab.* 2006; 91 (8): 3171-80.
- 27 Bensaid M, Gary-Bobo M, Esclangon A, Maffrand JP, Le Fur G, Oury-Donat F, Soubriè P. The cannabinoid CB1 receptor antagonist SR141716 increases Acrp30 mRNA expression in

- adipose tissue of obese fa/fa rats in cultured adipocyte cells. *Mol Pharmacol* 2003; 63 (4): 908-14.
- 28 Osei-Hyiaman D, DePetrillo M, Pacher P, Liu J, Radaeva S, Bòtkai S, Harvey-White J, Mackie K, Offertàler L, Wang L, Kunos G. Endocannabinoid activation at hepatic CB1 receptors stimulates fatty acid synthesis and contributes to diet-induced obesity. *J Clin Invest*. 2005; 115 (5): 1298-305.
- 29 Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 4;328(1):258-6
- 30 Matias I , Gonthier MP, Orlando P, Martiadis V, De Petrocellis L, Cervino C, Petrosino S, Hoareau L, Festi F, Pasquali R, Roche R, Maj M, Pagotto U, Monteleone P Di Marzo V. Regulation, function, and dysregulation of endocannabinoids in models of adipose and beta-pancreatic cells and in obesity and hyperglycemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Aug;91(8):3171-80.
- 31 Chatterjee TK, Stoll LL, Denning GM, Harrelson A, Blomkalns AL, Idelman G, Rothenberg FG, Neltner B, Romig-Martin SA, Dickson EW, Rudich S, Weintraub NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: influence of high-fat feeding. *Circ Res*. 2009 Feb 27;104(4):541-9. Epub 2009 Jan 2. PubMed PMID: 19122178.
- 32 Sugamura K, Sugiyama S, Nozaki T, Matsuzawa Y, Izumiya Y, Miyata K, Nakayama M, Kaikita K, Obata T, Takeya M, Ogawa H. Activated endocannabinoid system in coronary artery disease and antiinflammatory effects of cannabinoid 1 receptor blockade on macrophages. *Circulation* 2009; 119; 28-36.
- 33 Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Totani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *The journal of Clinical Investigation* 2006; 116:1494-1505.
- 34 Weisberg s, Hunter D, Huber r, lemieux J, slaymaker S, Vaddi K, Charo i, Leibel R, Ferrante A. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *The journal of Clinical Investigation* 2006; 116:115-124

- 35 Neels J, Olefsky J. Inflamed fat: what start the fire?. The journal of Clinical Investigation 2006; 116:33-35.
- 36 Kintscher U, Hartge M, Hess K, Forist-ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fisher-Posovszky P, Barth T, dragun D, Skurk T, Hauner H, Bluer M, Unger T, Wolf A-M, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: A primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2008; 28: 1304-1310.

CORSI DOTTORATO I anno:

Corso di Inglese: Docente: Prof. Irving Bell.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2007/08

Human Papilloma Viruses loads and its association with non melanoma skin cancer
Dott. S. Weissenbrau
19-12-2007

Biologia molecolare e genetica in ambito forense, principali applicazioni e sviluppo delle nuove
tecniche
Dott. G. Portera
14/1/2008

K⁺ channels in the heart: in and out of control
Dr. R. Radicke
21-1-2008

Integrin traffickng and tumor cells invasiveness
Dott. J. Norman
23/1/2008

La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni
Prof. M. Ruspanti

24-1- 2008

Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo

Dott. G. De Bellis

6/2/2008

La proteina HMGB1 e un segnale di danno tissutale

Prof. ME. Bianchi

7/2/2008

New treatment strategies for multiple mieloma

Prof. A. Palumbo

21/2/2008

Caratterizzazione molecolare della leukemia linfatica cronica

Prof. V. Gattei

28/2/2008

Analytic vaccinology and human citomegalovirus human monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination

Dott. A. Maccagno

5/3/2008

Applications of gene expression profile to cancer research

Prof. E. Medico

6/3/2008

Fatty liver preservation against ischemia reperfusion injury

Dott. JR. Catafau

7/3/2008

Il sistema Ghrelin aspetti endocrini e metabolici

Prof. F. Broglio e Prof. C. Gauna

13/3/2008

To repress gene expression just take out vinegar role of the class 2 histone deacetylase HDAC4

Prof. C. Brancolini

13/3/2008

Immunologia della psoriasi

Prof. G. Girolomoni

20/3/2008

Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile un nuovo esempio da malattia da misfoding

Prof. F. Barbetti

3/4/2008

Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria

Prof. G. Cairo
9/4/2008

Interazione tra tumori e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica il ruolo della via metabolica del mevalonato

Prof. M. Massaia
14/4/2008

The herpesvirus DNA polymerases a model for new antiviral drug discovery

Prof. G. Palu
16/4/2008

Epidemiologia dell'infezione HPV e del cancro della cervice uterina un modello dinamico

Dr. J. Baussano
17/4/2008

Ghrelin e pancreas endocrino

Prof. R. Granata
24/4/2008

The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions

Prof. A. Budkowska
15/5/2008

La ricerca farmacologica, dal laboratorio alla clinica

Dott. D. Valle
22/5/2008

Sistema degli endocannabinoidi nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche

Prof. U. Pagotto
23/5/2008

Copy number variations non solo ritardo mentale

Prof. O. Zuffardi
26/5/2008

Cap Analyses Gene Expression Analyses of transcriptional complexity and regulation

Dr. P. Carninci
5/6/2008

Mechanical ventilation and multiple organ failure

Dr. Fraus B Plotz
12/6/2008

Problem solving in epatologia epatica

Prof. G. Faa
13/6/2008

Tecniche FISH nello studio di linfomi non-Hodgkin

Drssa. MG. Tibiletti
26/6/2008

From mekacaryocytes to platelets regulation, microenvironment and patholssa. ogy
Drssa. A. Balduini
30/6/2008

Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate
Prof. F. Scolari
3/7/2008

Recombinant protein expression
1/7/2008

Recombinant antibodies and other affinity reagents
2/7/2008

Display technologies phage, yeast, bacteria and ribosoma
16/7/2008

Fluorescent protein
18/7/2008
Prof. A. Bradbury

CONGRESSI FREQUENTATI 1 ANNO:

1. SALO' 23-24 maggio 2008: Esperienze sull'uso delle statine ad alto dosaggio".
2. ARONA 28 giugno 2008: Progetto GAME ON: gestione ambulatoriale delle malattie endoteliali ossido nitrico correlate (RELATORE).

CONGRESSI FREQUENTATI: 2 ANNO

Veruno 12 giugno 2009: L'ecocardiografia nello scompenso cardiaco – Dai dati strumentali alla clinica.

SEMINARI interni al Dipartimento di Scienze Mediche AA 2008-2009

Production of biopharmaceuticals in plants

Prof. L. Santi

5/12/08

Utilizzo delle cellule staminali mesenchimali nelle malattie neurologiche

Prof. A. Uccelli

12/12/08

La malattia celiaca

Prof. R. Troncone

9/01/09

Porpora trombocitopenia autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici

Prof. F. Zaja

13/01/09

Interazioni geni-ambiente nell'eziologia della sclerosi multipla: studi su gemelli

Prof. M. Salvetti

27/01/09

Non solo motoneuroni: il contributo del muscolo scheletrico alla patogenesi della sclerosi laterale amiotrofica

Prof. A. Musarò

10/2/09

Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei melanomi

Prof.ssa. G. Bianchi Scarrà

12/2/09

The use of the cytomegalovirus as a novel vaccine vector for Simian immunodeficiency virus

Prof. Jay A. Nelson

19/2/09

When a fine tuner of signaling pathway becomes a dangerous amplifier: the case of the prolyl isomerase

Pin1 in cancer

Prof. G. Del Sal

20/2/09

Il metabolismo degli endocannabinoidi e la sua rilevanza terapeutica

Prof. M. Maccarone

26/2/09

La proteomica un nuovo modo di guardare al mondo delle proteine

Prof. P. Pucci

18/3/09

51

Cellule staminali tumorali implicazioni terapeutiche

Prof. G. Stassi

18/3/09

Le nanotecnologie applicate alla medicina

Prof. Peluso

19/3/09

Regulation of integrin functions in vascular system

Prof. F. Bussolino

26/3/09

Carcinoma differenziato della tiroide: novità nel follow-up e nella terapia

Prof.ssa B. Biondi

- 2/4/09
I bioreattori nella medicina rigenerativa: dalla ricerca alla realtà di una start-up
Dott.ssa S. Mantero
9/4/09
- Patologie dei tumori neuro-cerebrali: recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi
Dott. D. Schiffer
22/4/09
- Polycystin-1 , the product of the PDK1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Disease (ADPKD) is an orphan receptor regulating cell migration and polarity
Dott.ssa A. Boletta
28/4/09
- Polarized inflammation in tumor development
Prof. A. Sica
30/4/09
- Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo
Prof. A. Columbo
5/5/09
- Integrated nanoparticle- biomolecule hybrid system: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy
Dott.ssa B. Palazzo
6/5/09
- Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana
Prof. G. Poli
12/5/09
- Neutotossicità delle proteine misfolded nelle malattie del motoneurone
Prof. A. Poletti
12/5/09
- Functional genomics of brain
Prof. S. Gustincich
13/5/09
- Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla terapia alla pratica clinica
Prof. M. Frattini
10/6/09
- Il lupus eritematoso cutaneo: quadro clinico e immunopatologico
Prof. E. Berti
6/7/09