



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE

Direttore della Scuola: Prof. Andrea Piana

INDIRIZZO IN NEUROSCIENZE

Responsabile di Indirizzo: Dott.ssa Rossana Migheli

XXVIII CICLO

**Stress ossidativo e patologie neurodegenerative:
ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi
su modelli cellulari**

Direttore:

Prof. Andrea Piana

Tutor:

Dott.ssa Rossana Migheli

Tesi di dottorato di:

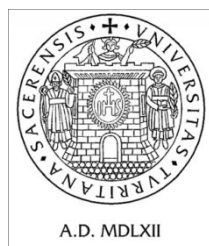
Dott.ssa Sara Cossu

Anno Accademico 2014 - 2015

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

*There is more to life
when you stop and notice...*

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari



Durante i tre anni di Scuola di Dottorato ho frequentato il laboratorio del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi di Sassari e, per un periodo di sette mesi, il laboratorio di Neuroimmunology del Netherlands Institute for Neuroscience di Amsterdam.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Sommario

Introduzione.....	1
Stress ossidativo nel sistema nervoso centrale	2
Neurodegenerazione e malattia di Parkinson	4
Neurotossicità del manganese.....	7
L'ossido di cerio.....	10
Il composto AD838.....	13
Scopo della ricerca	16
Materiali e metodi	18
Colture cellulari.....	19
Saggio di vitalità MTT.....	20
Saggio di vitalità LDH.....	20
Saggio di vitalità Trypan Blue	21
Analisi citofluorimetrica.....	21
Quantificazione del picco sub-G1	21
Apoptosi.....	22
Uptake.....	22
Microscopia confocale.....	23
Analisi cromatografica	23
Test della diclorofluoresceina.....	24
Quantificazione del glutatione.....	24
Analisi statistica	25
Risultati	26
Risultati nanoceria	27
Risultati AD838.....	32
Discussione.....	37
Prospettive future	Error! Bookmark not defined.
Next step: Amsterdam	Error! Bookmark not defined.
Bibliografia	46

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Introduzione

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Stress ossidativo nel sistema nervoso centrale

I radicali liberi, specie reattive presenti fisiologicamente nell'organismo, sono molecole altamente reattive per la presenza di un elettrone spaiato. Qualsiasi radicale libero che coinvolga l'ossigeno può essere definito come una specie reattiva dell'ossigeno (ROS) (Aiken, Kaake et al. 2011). I ROS comprendono sia specie radicaliche quali lo ione superossido ($O^{\bullet-}$), e il radicale idrossilico (OH^{\bullet}) che quelle non radicaliche come il perossido di idrogeno (H_2O_2) (Gilgun-Sherki, Melamed et al. 2001). L'ossigeno è essenziale per la sopravvivenza degli organismi eucarioti. All'interno dell'organismo, i tessuti hanno un diverso fabbisogno di ossigeno in relazione alle loro esigenze metaboliche. I neuroni e gli astrociti, i due principali tipi di cellule cerebrali, sono in gran parte responsabili del massiccio consumo del cervello di O_2 e glucosio; infatti, benché il cervello rappresenti soltanto ~2% del peso corporeo totale esso è responsabile di oltre il 20% del consumo totale di ossigeno (Halliwell 2006). Nonostante l'ossigeno sia essenziale per gli organismi viventi, un suo eccesso e quindi lo stato di iperossia, determina tossicità (Ahdab-Barmada, Moosy et al. 1986; Davydov, Drobyshev et al. 1988). Infatti, l'ossigeno nelle sue forme parzialmente ridotte è molto attivo perché i radicali liberi sono instabili e possono fungere sia da accettori che da donatori di elettroni. I ROS e altre specie reattive vengono continuamente prodotte dal nostro organismo attraverso numerosi processi biochimici (Uttara, Singh et al. 2009). Un esempio è la produzione di ATP, che avviene nei mitocondri attraverso la fosforilazione ossidativa e che rappresenta il processo biochimico fondamentale per garantire l'energia necessaria alle funzioni cellulari. In condizioni fisiologiche, la catena respiratoria mitocondriale per via della perdita di elettroni determina una conversione in ROS pari a circa il 2% dell'ossigeno molecolare consumato dalle cellule animali. I mitocondri infatti rappresentano la fonte endogena primaria di ROS (McCord 2000; Mancuso, Coppede et al. 2006). Anche numerosi fattori esogeni quali gli agenti ambientali

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

sono determinanti nella produzione diretta o indiretta di ROS (Valko, Rhodes et al. 2006).

Le cellule possiedono un pool di sostanze deputate alla protezione delle strutture subcellulari dagli effetti nocivi dei ROS: il sistema di antiossidanti cellulari, che comprende composti enzimatici e non enzimatici dotati di attività riducente (Kadiiska, Basu et al. 2013). Degli antiossidanti enzimatici fanno parte la glutazione reduttasi, la catalasi, la superossido dismutasi (SOD), e la glutazione perossidasi, mentre tra gli antiossidanti non enzimatici si annoverano il glutazione (GSH), i flavonoidi, le vitamine E, C ed A e proteine come l'albumina. Questi composti in condizioni fisiologiche mantengono le specie reattive al sotto dei livelli dannosi e proteggono le cellule e i tessuti (Uttara, Singh et al. 2009).

Uno squilibrio tra i livelli di antiossidanti e la produzione di ROS determina stress ossidativo e di conseguenza danno cellulare. I ROS in eccesso infatti possono indurre danno ossidativo e quindi alterare l'attività di varie molecole all'interno della cellula, dalle proteine agli acidi nucleici ai lipidi (Gandhi and Abramov 2012).

Neurodegenerazione e malattia di Parkinson

I neuroni sono cellule incapaci di dividersi e in gran parte persistono nel sistema nervoso durante tutta la vita dell'organismo. La morte neuronale (neurodegenerazione) può avvenire fisiologicamente durante lo sviluppo del SNC o a causa di fattori esogeni (esposizione a metalli, radiazioni U.V., tossine) e genetici, che possono determinare neurotossicità (Yuan, Lipinski et al. 2003). La neurodegenerazione può essere determinata da diversi meccanismi tra i quali l'apoptosi e la necrosi. L'apoptosi è un processo attivo, altamente organizzato, caratterizzato dalla condensazione e frammentazione nucleare e conseguente formazione di corpi apoptotici dovuti a frammentazione delle cellule morte, (Schweichel and Merker 1973). La necrosi è invece un evento passivo, caratterizzato da infiammazione indotta dalla lisi cellulare (Clarke 1990). La neurodegenerazione è alla base di numerose malattie neurodegenerative tra cui la malattia di Parkinson (PD). La malattia di Parkinson è una patologia neurodegenerativa caratterizzata dalla morte dei neuroni dopaminergici della *substantia nigra pars compacta* e di conseguenza da un grave deficit di dopamina (DA) con conseguenze sintomatiche nel movimento e nella coordinazione.

L'eziologia del PD è ancora sconosciuta, le ipotesi sono molteplici: ereditarietà, lesioni cerebrali, infezioni, neurotossine endogene, fattori ambientali e alterate espressioni geniche (Semchuk, Love et al. 1993; Taylor, Saint-Hilaire et al. 1999). Fattori genetici e ambientali danno origine a due forme distinte di malattia, il Parkinson genetico o familiare e Parkinson sporadico o idiopatico (IPD). Numerosi studi sono stati eseguiti inducendo forme di parkinsonismo su modelli cellulari neuronali (Migheli, Godani et al. 1999; Shi, Zhao et al. 2015).al fine di studiare la malattia.

È stato dimostrato che nella patogenesi del PD riveste un ruolo importante lo stress ossidativo, dovuto ad uno squilibrio di ROS rispetto al pool di antiossidanti deputati alla difesa del SNC dalle specie reattive. Infatti, è stato dimostrato che

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

nella *substantia nigra* di pazienti affetti da PD (Sian, Dexter et al. 1994) vi è una notevole riduzione dei livelli di antiossidanti endogeni. Anche il metabolismo della DA può contribuire ad aumentare la condizione di stress ossidativo (Fig 2). La degradazione della DA avviene ad opera delle monoamminossidasi (MAO) e delle catecol-O-metiltrasferasi intracellulari, che degradano la DA producendo come sottoprodotti perossido di idrogeno e altre specie reattive dell'ossigeno (anione superossido, O_2^- e radicali idrossilici, $\bullet OH$) (Jenner 2003). La degradazione di tipo non-enzimatica della dopamina è dovuta invece alla sua auto-ossidazione, processo che dà origine a sottoprodotti tossici quali la 6-idrossidopamina (6-OH-DA) e il dopachinone (Hattoria, Wanga et al. 2009). Inoltre, nella *substantia nigra* sono presenti elevati livelli di ferro bivalente (Fe^{2+}) che prende parte alle reazioni di Fenton e di Haber-Weiss (Fig.1) insieme al perossido di idrogeno generando radicali idrossilici ($\bullet OH$) e anioni superossido ($O_2^{\bullet -}$), altamente citotossici.

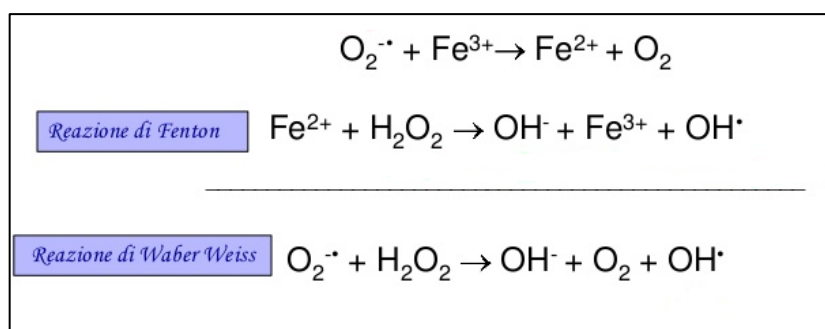


Figura 1. Reazioni di Fenton e Haber-Weiss.

Per riportare i livelli di DA ai livelli fisiologici, il farmaco di elezione nella terapia del PD è la L-3,4-dihydroxyphenylalanine (levodopa, L-DOPA), il precursore della sintesi della dopamina, utile soprattutto nel controllo della sintomatologia della malattia stessa (Serra, Pluchino et al. 2008). La L-DOPA è somministrata per via

orale generalmente in associazione ad un inibitore delle decarbossilasi periferiche al fine di prevenire una sua precoce conversione nel circolo periferico e aumentare la biodisponibilità del farmaco nel sistema nervoso centrale (CNS). I migliori risultati nel trattamento del PD con la L-DOPA si ottengono nei primi anni di terapia in cui i processi neurodegenerativi vengono rallentati. Con il progredire della terapia si manifestano con frequenza sempre maggiore fluttuazioni nella risposta clinica alla L-DOPA con i conseguenti ben noti fenomeni di on/off. Nonostante la L-DOPA sia quindi ad oggi il farmaco di scelta nella terapia PD, il suo utilizzo risulta controverso, poiché è stato dimostrato che può andare incontro ad autossidazione e ossidazione enzimatica generando specie reattive dell'ossigeno (ROS), e aggravando la condizione preesistente di stress ossidativo (Basma, Morris et al. 1995; Spencer, Jenner et al. 1995).

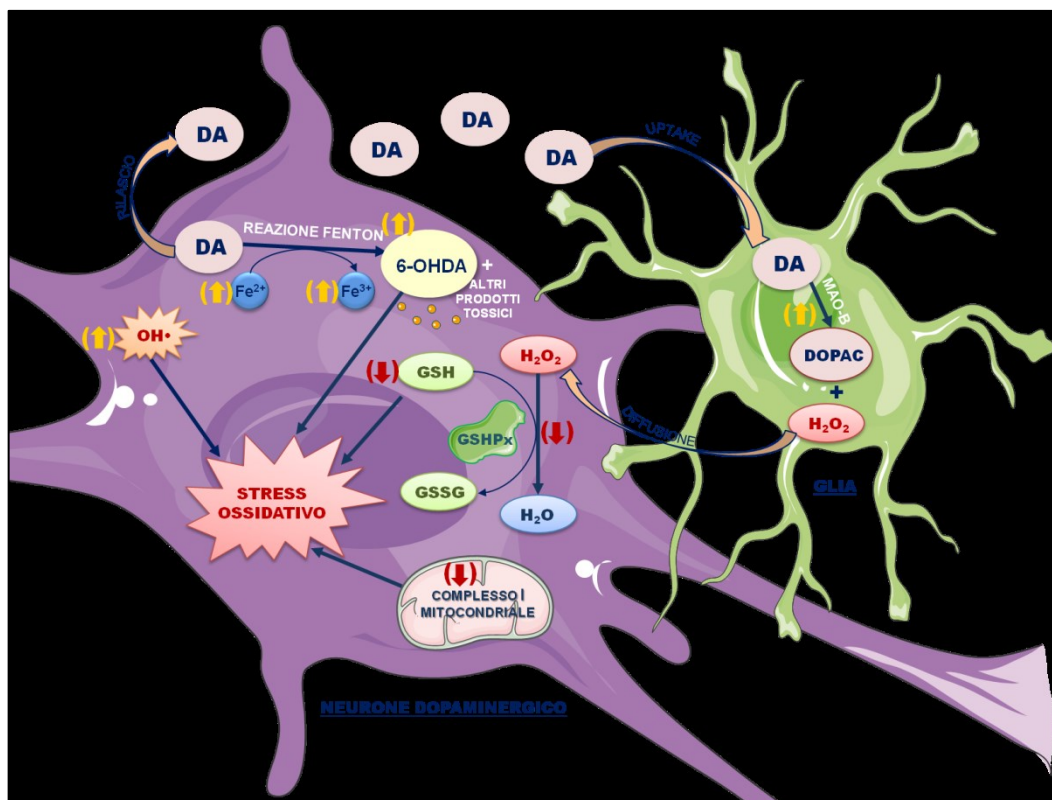


Figura 2. Stress ossidativo nella substantia nigra. Le frecce tra parentesi indicano l'aumento o il decremento dei componenti i cui livelli sono alterati in pazienti di PD. DA, dopamina; DOPAC, acido diidrofenilacetico; Fe^{2+} , ione ferroso; Fe^{3+} , ione ferrico; GSH, glutazione ridotto; GSSG, glutazione ossidato; H_2O_2 , perossido di idrogeno; $\text{OH}\cdot$, radicale idrossilico; GSHPx, glutazione perossidasi; 6-OHDA, 6-idrossidopamina; MAO-B, monoamino ossidasi-B.

Neurotossicità del manganese

Il manganese (Mn) è un oligoelemento essenziale nei mammiferi per il normale sviluppo e funzionalità dell'organismo per tutta la durata della vita (Keen, Ensunsa et al. 2000). Il Mn lega e/o regola molti enzimi, è infatti un co-fattore necessario per l'arginasi, responsabile della produzione di urea nel fegato, per la superossido dismutasi, fondamentale contro lo stress ossidativo cellulare, e per la piruvato carbossilasi, enzima essenziale nella gluconeogenesi (Carl, Keen et al. 1986). Nel cervello, circa l'80% di Mn è associato all'enzima specifico degli

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

astrociti glutammina sintetasi (Wedler and Denman 1984) dove il Mn gioca un ruolo chiave, anche se non è un richiesto come cofattore. Alterazioni dell'omeostasi del Mn sono associate a diversi stati patologici. È stato appurato per esempio che una dieta povera di Mn determina lesioni epidermiche e malformazioni ossee nell'uomo (Friedman, Freeland-Graves et al. 1987). In ratti alimentati per un lungo periodo con una dieta a ridotto contenuto di Mn (<1ppm vs le fisiologiche 66 ppm) sono stati rilevati aumentati livelli di fosforo e calcio e una deficienza di calcio nelle ossa (Strause, Hegenauer et al. 1986). Numerosi studi sulla tossicologia del Mn sono però legati ad un suo eccesso, che può causare un danno neurodegenerativo progressivo con conseguenti sintomi simili alla malattia di Parkinson idiopatica (Mena, Marin et al. 1967; Barbeau 1984). La assorbimento del Mn nel cervello può avvenire attraverso tre vie: attraverso le cellule della barriera emato-encefalica, attraverso il plesso coroide della barriera cerebrospinale, o attraverso il nervo olfattivo dalla cavità nasale direttamente al cervello. Quest'ultimo è il più importante, dato che la maggior parte dei dati riportati sulla tossicità del Mn sono riferiti all'esposizione per inalazione (Huang, Chu et al. 1989). Infatti, la neurotossicità per inalazione del manganese è stata riscontrata nei minatori delle miniere di biossido di Mn (Couper 1837), nei lavoratori delle fabbriche di batterie (Keen 1995), di fonderie (Huang, Chu et al. 1989) e saldatori (Chandra, Shukla et al. 1981; Ono, Komai et al. 2002). Nell'uomo, il Mn in eccesso nel cervello induce neurotossicità che può determinare la sindrome del manganismo (Crossgrove and Zheng 2004). Numerose evidenze (Hudnell 1999; Iregren 1999) suggeriscono che il manganismo presenta somiglianze nei sintomi extrapiramidali con la malattia di Parkinson idiopatica (IPD), nonostante i siti delle lesioni neurologiche e quindi i sintomi clinici, siano diversi da quelli osservati nella IPD (Inoue 1996). Per quanto riguarda il preciso meccanismo con il quale il Mn induce neurotossicità, numerose evidenze ne suggeriscono l'interazione con altri oligoelementi

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

essenziali tra cui ferro (Aschner, Vrana et al. 1999; Verity 1999; Zheng, Zhao et al. 1999), zinco, rame (Lai, Minski et al. 1999) e alluminio (Kao, Chen et al. 1999). In particolare, gli studi hanno dimostrato che l'esposizione cronica a Mn sembra essere associato con alterate concentrazioni di ferro (Fe) nel sangue e nel liquido cerebrospinale (Zheng, Ren et al. 1998; Chen, Tsao et al. 2001). Inoltre è stato dimostrato che l'intossicazione da Mn nelle scimmie causa un accumulo di Fe nel *globus pallidus* e nella *substantia nigra pars reticulata* (Olanow, Good et al. 1996). Analoghi aumenti di Fe intracellulare sono stati osservati *in vitro* su cellule trattate con composti del Mn (Zheng and Zhao 2001). L'eccesso di Fe nei neuroni può dare origine a stress ossidativo cellulare e sfociare nel danno neuronale. Una disfunzione nel metabolismo Fe è stata dimostrata infatti anche in pazienti con IPD: alti livelli di ferro totale, diminuzione della ferritina, stress ossidativo ferro-associato, e anomalie del complesso I mitocondriale sono state più volte riportate nella *substantia nigra post-mortem* di pazienti con IPD (Sofic, Paulus et al. 1991). Poiché il Mn può partecipare alla reazione di Fenton, induce un aumento delle specie reattive dell'ossigeno, e di conseguenza del danno ossidativo, all'interno delle cellule (Li, Zhang et al. 2004). Inoltre, esperimenti condotti su cellule PC12, una linea tumorale in grado di produrre e secernere e metabolizzare DA, hanno dimostrato che il manganese (Mn) è in grado di indurre apoptosi. (Desole, Sciola et al. 1997). Inoltre studi *in vitro* (Migheli, Godani et al. 1999) e *in vivo* (Serra, Esposito et al. 2000) hanno dimostrato che concentrazioni sub-tossiche di Mn in associazione con L-DOPA, ne incrementano la citotossicità

L'ossido di cerio

Negli ultimi anni si è assistito ad un enorme aumento della produzione, sviluppo, e commercializzazione di diversi tipi di nanoparticelle (NP). Le applicazioni delle NP vanno dall'ingegneria alla medicina e gli usi vanno dai dispositivi elettronici a possibili usi in sistemi di *drug delivery* (De Marzi, Monaco et al. 2013). In particolare il cerio, ha attirato molta attenzione da parte dei ricercatori in fisica, chimica, biologia e scienza dei materiali. Se combinato con l'ossigeno in una formulazione di nanoparticelle, l'ossido di cerio adotta la struttura della fluorite cristallina che lo rende un materiale interessante (Conesa 1995). Nell'ossido di cerio coesistono gli stati di ossidazione di cerio (IV) e di cerio (III) ottenendo la forma stabile (Trovarelli 2002), da cui si origina una coppia redox che è responsabile dell'attività catalitica (Zhang, Wang et al. 2004) (fig.3).

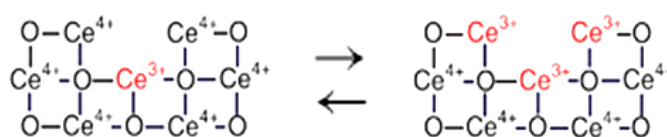


Figura 3. Stati di ossidazione del nanocerio.

Le nanoparticelle di ossido di cerio sono state utilizzate in varie applicazioni, quali celle a combustibile ossido solido (Boudghene Stambouli and Traversa 2002), materiali catalitici (Trovarelli 1996), celle solari (Corma, Atienzar et al. 2004), per la protezione dagli U.V. (Yamashita, Kameyama et al. 2002) e potenziali agenti farmacologici (Celardo, Pedersen et al. 2011). Diversi studi preliminari hanno evidenziato molteplici proprietà dell'ossido di cerio: citoprotezione (Colon, Hsieh et al. 2010), neuro-protezione (Das, Patil et al. 2007; Singh, Cohen et al. 2007),

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

cardio-protezione (Niu, Azfer et al. 2007), miglioramento dell'adesione delle cellule staminali (Mandoli, Pagliari et al. 2010) suggerendone il potenziale uso in ingegneria tissutale (Karakoti, Tsigkou et al. 2010), e come anti-infiammatorio (Hirst, Karakoti et al. 2009). La presenza dei due stati di valenza 3+ / 4+ rende il nanoceria simile nel meccanismo agli enzimi redox, che utilizzano metalli come cofattori per catalizzare reazioni redox reversibili nelle cellule e nei tessuti. Il nanoceria con un elevato rapporto Ce^{3+} / Ce^{4+} è in grado di ridurre lo ione superossido e di produrre perossido di idrogeno. Tale reazione corrisponde alla riduzione del superossido da parte dell'enzima superossido dismutasi (SOD) (Fig.X), per cui il nanoceria è stato definito SOD-mimetico (Korsvik, Patil et al. 2007). Riportare allo stato ossidato il metallo presente nella SOD richiede un'azione enzimatica, mentre è stato ipotizzato che il nanoceria sia in grado di "auto-rigenerarsi", nonostante il meccanismo sia ancora sconosciuto. In altri studi, è stato dimostrato che anche il H_2O_2 è in grado di ossidare il nanoceria da Ce^{3+} a Ce^{4+} . Il meccanismo di tale reazione ha implicazioni importanti per quanto riguarda la capacità di agire come *scavenger* di radicali *in vivo* (Pirmohamed, Dowding et al. 2010). Il Ce^{4+} viene ridotto a Ce^{3+} con la concomitante ossidazione di H_2O_2 a O_2 molecolare, reazione simile a quella catalizzata dalla catalasi (Celardo, Pedersen et al. 2011) (Fig.4).

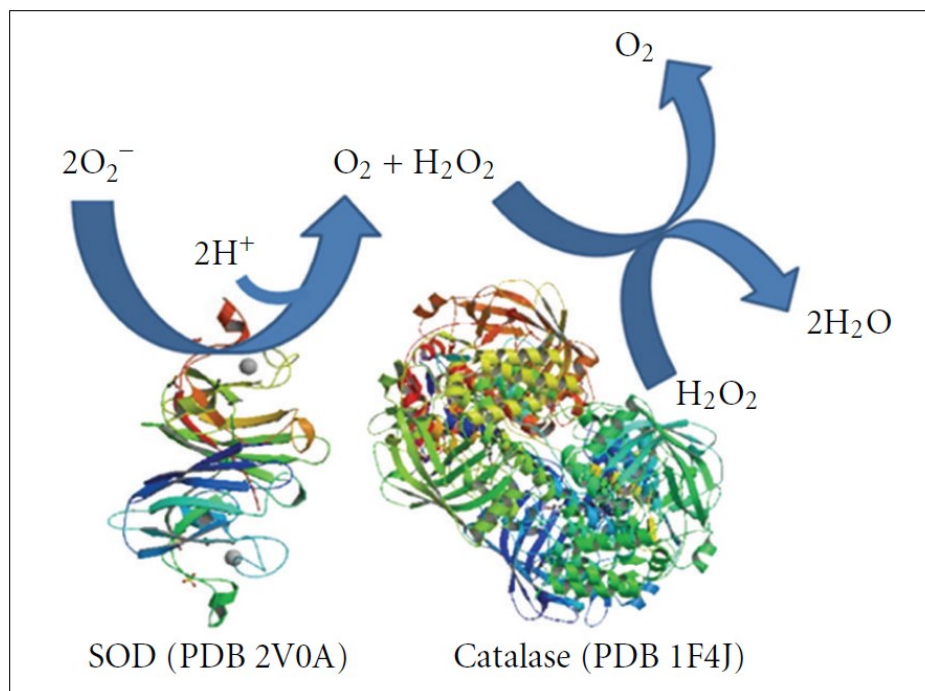


Figura 4. Reazioni degli enzimi SOD e catalasi. Le strutture proteiche in questa figura sono disponibili nel Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Gli ID di riferimento di PDB sono indicati tra parentesi. Modificata da Melo et al., 2011.

Il H_2O_2 generato nel processo SOD-mimetico può entrare nel ciclo catalasi-mimetico e produrre H_2O e O_2 (Xu and Qu 2014). La combinazione dell'attività SOD-mimetica e catalasi-mimetica del nanoceria lo rende un composto molto interessante come *scavenger* dei ROS. In letteratura molti studi sottolineano la facilità con cui il cerio passa dalla forma ossidata a quella ridotta. Un antiossidante in grado di autorigenerarsi è infatti un mezzo estremamente utile come agente farmacologico (Tarnuzzer, Colon et al. 2005), nonostante attualmente non sia ancora stato identificato con certezza il meccanismo di rigenerazione redox.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Il composto AD838

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche (molecole, ioni, radicali), che rallentano o prevengono l'ossidazione di altre sostanze, stabilizzando o disattivando i radicali liberi (Velioglu, Mazza et al. 1998). In generale, esistono due categorie fondamentali di antiossidanti, naturali e sintetici. Recentemente, si è assistito ad un considerevole aumento nella ricerca di antiossidanti naturali per l'uso alimentare o farmacologico (Zheng and Wang 2001).

Lo screening di estratti o composti isolati da diverse fonti naturali è ormai la procedura più diffusa nella ricerca di metaboliti biologici attivi. In tali attività di ricerca i ciano batteri sono stati identificati quale ricca fonte di diversi prodotti commerciali, farmaceutici o interesse tossicologico. Infatti sono stati isolati da cianobatteri molti metaboliti primari, come proteine, acidi grassi, vitamine o pigmenti (Borowitzka 1988; Borowitzka 1988; Borowitzka 1995) e vari metaboliti secondari come antifungini, antivirali, antibiotici e altri (Patterson, Larsen et al. 1994; Falch 1996). Recentemente è stato identificato (Volk 2005) e caratterizzato (Volk and Furkert 2006) un composto fenolico bioattivo prodotto come esometabolita dal batterio *Nostoc insulare*, l'alcol aromatico 4,4'-diidrossibifenile (Fig.5).

Tale metabolita ha suscitato interesse in quanto possiede attività farmacologiche antimicrobiche, antivegetative e anticianobatteriche (Reza 2007; Volk 2007; Caicedo, Kumirska et al. 2012). La sua attività antiossidante è peraltro già stata individuata da Moosman e collaboratori, i quali, nell'ambito di uno studio sugli estrogeni, testarono una serie di alcoli aromatici tra cui il 4,4'-diidrossibifenile, dimostrandone l'effetto neuroprotettivo *in vitro* su un modello di danno cellulare indotto da glutammato (Moosmann and Behl 1999). Inoltre, la struttura chimica del 4,4'-diidrossibifenile è stata individuata come building block in diversi lignani, quali Gomisins J and GR-12. I lignani sono composti vegetali che costituiscono un ampio e eterogeneo gruppo di dimeri fenilpropanoidi, in cui le unità fenilpropano

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

sono collegate da un legame carbonio-carbonio tra le posizioni 8 e 80. Questi composti sono noti per avere diverse attività biologiche, come antitumorali, battericidi (Nagata, Hirai et al. 1998), antivirali (Charlton 1998), anti-infiammatori (Cho, Kim et al. 2001), neuroprotettivi e antiossidanti (Kim, Lee et al. 2004). Il 4,4'-diidrossibifenile, parte della struttura molecolare di tali composti, ha mostrato il suo effetto citoprotettivo in vitro su mioblasti murini contrastando la morte cellulare indotta da H₂O₂ mediante l'inibizione del pathway apoptotico della MAPchinasi p38 (Yoshikawa, Saito et al. 2006).

Nel 2004 inoltre Kim e collaboratori caratterizzano il meccanismo d'azione del 4-4' identificandolo come potente inibitore di tirosinasi (Kim, No et al. 2005).

La tirosinasi è un enzima multifunzionale coinvolto nella sintesi della melanina e neuromelanina. Questo enzima catalizza la conversione di tirosina a 3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA) e ossida L-DOPA per formare DOPA chinone, che è un precursore della melanina. Inoltre, è noto che anche la dopamina (DA) è un substrato della tirosinasi, che la ossida per formare melanina rapidamente tramite DA chinone (Miranda and Botti 1983). Nonostante il ruolo della tirosinasi nel cervello sia ancora un punto controverso, alcuni studi hanno rivelato l'espressione della tirosinasi, e del suo promotore, principalmente nella *substantia nigra* (Miranda, Botti et al. 1984; Xu, Stokes et al. 1997; Tief, Schmidt et al. 1998). Inoltre è stato dimostrato che il DOPA chinone, la cui formazione è indotta dalla tirosinasi, inattiva la tirosina idrossilasi, enzima chiave nella sintesi della dopamina (Xu, Stokes et al. 1998).

L'insieme di queste caratteristiche chimiche e funzionali rendono il 4,4'-diidrossibifenile un composto molto interessante nello studio delle malattie neurodegenerative e in particolare, data la sua attività di inibitore di tirosinasi, nella malattia di Parkinson. In questo lavoro è stato testato AD838, un analogo strutturale di 4,4'-diidrossibifenile, sintetizzato e purificato dal gruppo di sintesi organica guidato dalla Dott.ssa Delogu dell'Istituto di Chimica Biomolecolare del

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

C.N.R. di Sassari. La sintesi di analoghi strutturali natural-like del 4,4'-diidrossibifenile ha come scopo quello di ottenere composti che mantenessero le proprietà antiossidanti e neuroprotettive del precursore ma con un maggiore grado di solubilità. La struttura molecolare di AD838 è rappresentata in Fig.4, indicando con R il gruppo sostituente che ne determina la maggior solubilità rispetto al precursore (non mostrato perché in corso di pubblicazione).

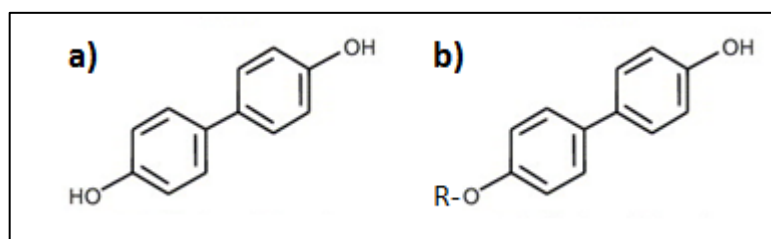


Figura 5. a) Struttura molecolare del 4,4'-diidrossibifenile; b) Struttura molecolare di AD838.

Scopo della ricerca

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Negli ultimi anni la ricerca di antiossidanti naturali o sintetici in grado di agire come nuovi agenti terapeutici ha suscitato sempre maggiore interesse. Lo stress ossidativo infatti è un meccanismo coinvolto nella patogenesi di molte malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson e la Sclerosi Multipla. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di testare su cellule PC12 due composti di diversa origine su modelli di stress ossidativo indotto da manganese e perossido di idrogeno. Il fine ultimo è quello di identificare potenziali agenti, già noti per altre attività farmacologiche, come antiossidanti, antiapoptotici e neuroprotettivi.

Materiali e metodi

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Colture cellulari

Le cellule PC12 sono cellule dopaminergiche di feocromocitoma di ratto, utilizzate come modello di differenziazione neuronale in quanto mimano le caratteristiche principali dei neuroni dopaminergici. Tali cellule infatti sintetizzano, secernono e metabolizzano la dopamina (Ciofani, Genchi et al. 2013). Le cellule sono state cresciute a 37°C in atmosfera umidificata e al 5% di CO₂. Il terreno di coltura utilizzato è il *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) addizionato con il 5% di siero fetale bovino e il 10% di siero di cavallo, oltre al 1% del mix di antibiotici penicillina/streptomina. Durante la crescita le cellule sono state mantenute in piastre Petri da 100 mm di diametro.

Per lo studio sul nanoceria le cellule sono state esposte per 48 ore alle nano particelle in piastre da 24 pozzetti (10⁵ cellule/pozzetto). Per valutare l'attività protettiva delle nano particelle invece è stato effettuato un pretrattamento di 24 ore con nanoceria a seguito delle quali veniva aggiunto il MnCl₂ alla concentrazione 0,75 mM oppure MnCl₂ + L-Dopa 20 mM per altre 24 ore. Per tutti gli esperimenti è stato inserito anche un campione di cellule non trattate (controllo), un campione di cellule trattate con solo nanoceria e con il solo insulto ossidativo (MnCl₂ e MnCl₂ + L-Dopa). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati in triplicato.

Nello studio su AD838 le cellule sono state trattate con il composto per 24 ore in piastre da 24 pozzetti (10⁵ cellule/pozzetto). Per valutare l'attività protettiva di AD838 invece il composto è stato somministrato come pretrattamento 30 minuti prima dell'aggiunta del H₂O₂ alla concentrazione di 100 µM per 24 ore. Anche in questo caso gli esperimenti, eseguiti in triplicato, prevedevano un controllo di cellule non trattate e un campione di cellule trattate con il solo perossido di idrogeno.

Saggio di vitalità MTT

Il saggio di vitalità MTT (Mosmann 1983) prende il nome dal 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, colorante solubile che una volta penetrato in cellule metabolicamente attive viene convertito dalle ossido-reduttasi mitocondriali in sali blu insolubili (in solvente acquoso) di formazano. Nel dettaglio, 200 µl di MTT 5mg/ml veniva aggiunto ad ogni pozzetto e incubato per 4 ore a 37°C. Le cellule venivano quindi lavate con buffer fosfato (PBS) e centrifugate per 15 minuti. Infine il pellet è stato dissolto in 2 ml di isopropanolo e la densità ottica misurata mediante un lettore Bauty Diagnostic alla lunghezza d'onda di 570 nm.

Saggio di vitalità LDH

Il saggio di vitalità LDH è basato sulla quantificazione relativa della lattato deidrogenasi (LDH) nel mezzo di coltura. La LDH è un enzima citoplasmatico presente nelle cellule che a seguito di danno alla membrana plasmatica viene velocemente rilasciato nel mezzo. Di conseguenza, la quantità di LDH nel terreno di coltura è proporzionale alle cellule morte (Cai, Lin et al. 2013). Al termine dei tempi di trattamento, da ogni pozzetto è stato prelevato il terreno di coltura e la determinazione della LDH è stata eseguita secondo il protocollo del kit Biovision K313. Infine, è stata misurata l'assorbanza dei campioni alla lunghezza di 440 nm mediante un lettore Bauty Diagnostic.

Saggio di vitalità Trypan Blue

Il saggio di vitalità Trypan Blue è un cosiddetto saggio di colorazione per esclusione. Tale cromoforo infatti, a causa della sua carica negativa, non è in grado di oltrepassare la membrana cellulare integra. Le cellule apoptotiche e necrotiche invece, per via della disgregazione della membrana plasmatica, assorbono il cromoforo colorandosi di blu. Questo permette la facile discriminazione delle cellule vive (che hanno escluso il colorante) con semplice osservazione al microscopio. Per il conteggio della vitalità cellulare, al termine del trattamento è stata preparata per ogni campione una soluzione contenente 20 µl di Trypan blue 0,4%, e 20 µl di sospensione cellulare. La sospensione è stata quindi incubata per 1 minuto e le cellule sono state caricate nella camera di conta di Burkner per il conteggio delle cellule vive e morte.

Analisi citofluorimetrica

Quantificazione del picco sub-G1

La quantificazione del picco sub-G1 contenente le cellule ipodiploidi è stata effettuata mediante marcatura con ioduro di propidio (PI) secondo il protocollo Sigma Aldrich (APOAF). Dopo il trattamento le cellule venivano raccolte, lavate con due volte per centrifugazione (500 g, 5 min) e fissate in etanolo al 70% in PBS freddo per 60 min a 4° C. Le cellule venivano quindi risospese in 300 µl di PBS contenente 100 µg/ml di PI e 10 µg/ml di RNAsi e incubate al buio per 30 min. La fluorescenza dei nuclei cellulari è stata quindi determinata mediante citofluorimetro BD™ Accuri C6 rilevando 10000 eventi per ogni campione.

Apoptosi

L'analisi dell'apoptosi è stata eseguita mediante il kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Sigma Aldrich). Tale saggio è basato sul legame dell'Annexina V-FITC alla fosfatidilserina esposta sulla membrana plasmatica delle cellule in apoptosi e sul legame del PI al DNA delle cellule con membrana plasmatica danneggiata. Dopo il trattamento le cellule sono state raccolte, lavate con PBS e centrifugate (500 g per 5 min). La marcatura è avvenuta risospesando le cellule in 300 µl di binding buffer contenente 50 µg/ml di Annexin V-FITC e 100 µg/ml di PI e incubando al buio per 10 min. I campioni sono stati quindi analizzati mediante citofluorimetro BD™ Accuri C6 rilevando 10000 eventi per ogni campione. La Annexina V-FITC è rilevata come fluorescenza verde mentre il PI come fluorescenza rossa. L'analisi permette di differenziare le cellule localizzandole nei quadranti del cistogramma: le cellule vive nel quadrante in basso a sinistra (Annexin V-/PI-), le cellule in apoptosi precoce nel quadrante in basso a destra (Annexin V+/PI-), le cellule in apoptosi tardiva o necrotiche nel quadrante in alto a destra (Annexin V+/PI+), e le cellule danneggiate meccanicamente quindi necrotiche nel quadrante in alto a sinistra (Annexin V-/PI+). Le cellule apoptotiche sono quindi comprese nei due quadranti di destra.

Uptake

Per valutare l'internalizzazione del nanoceria le cellule PC12 sono state piastrate in piastre a 24 pozzetti e (10^5 cellule/pozzetto) e esposte per 48 ore a varie concentrazioni di FITC-NH₂-nanoceria (20–50–100 mg/ml). Al termine del trattamento le cellule sono state lavate con PBS e risospese in DMEM contenente 0,25% w/w di trypan blue. L'internalizzazione del FITC-NH₂-nanoceria nelle cellule è stata quindi valutata mediante il citofluorimetro FACS Calibur (Becton Dickinson, FACScalibur™, USA).

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Microscopia confocale

Per valutare l'internalizzazione del nanoceria mediante microscopia confocale le cellule sono state piastrate su vetrini coprioggetto rivestiti di gelatina(1 mg/ml) e lasciate aderire *overnight*. Quindi le cellule sono state trattate con nanoceria 10 e 20 mg/ml per ulteriori 24 ore. Al termine del trattamento le cellule sono state lavate con PBS e colorate con DAPI (5 mg/ml in PBS) per 15 minuti al riparo dalla luce. Le cellule sono state quindi lavate una volta con PBS e sigillate su vetrino da microscopio. I campioni sono stati osservati con un microscopio Leica equipaggiato con un Leica Confocal Laser System C2s. Le immagini sono state quindi analizzate con il programma Leica Application Suite Advance Fluorescence Lite (LAS AF).

Analisi cromatografica

Per quantificare la dopamina e i suoi metaboliti acido diidrossifenilacetico (DOPAC), acido omovanillico (HVA) e 3-metossitiramina (3-MT) è stata effettuata un'analisi mediante *High performance liquid chromatography* con rilevamento elettrochimico usando una pompa Alltech 426 HPLC con iniettore Rheodyne, colonna Alltech Adsorbosphere C18 5U da 15 cm con diametro interno 64,6 mm, un rilevatore elettrochimico Antec CU-04-AZ. I cromatogrammi sono stati acquisiti tramite interfaccia Varian Star Chromatographic Workstation v. 4.0 per l'elaborazione e il calcolo. La fase mobile finale era così composta: acido citrico 0,5 M, sodio acetate 1 M, EDTA 12,5 mM, MeOH 10% e sodio octilsolfato 650 mg/l (pH=3,0); è stato utilizzato un flusso 3 ml/min.

Test della diclorofluoresceina

Per valutare i ROS intracellulari è stata utilizzata la diclorofluoresceina diacetato (DCFH-DA, Sigma Aldrich), una molecola non fluorescente che viene convertita in diclorofluoresceina (fluorescente) dalle sostanze ossidanti presenti nella cellula diventando così incapace di attraversare la membrana cellulare. Le cellule sono state piastrate in piastre da 24 pozzetti (10^5 cellule/ml) e sono state trattate per 24 ore con AD838 5 μ M, H_2O_2 100 μ M, o pretrattate con AD838 30 minuti prima dell'insulto ossidativo. Dopo i trattamenti le cellule con DCFH-DA 10 μ M a temperatura ambiente al buio 20 minuti prima di essere lavate e osservate al microscopio a fluorescenza invertito (filtro a 488 nm di eccitazione e 530 nm di emissione).

Quantificazione del glutatione

Il glutatione (GSH) è stato quantificato mediante un saggio di cinetica enzimatica (Sigma Aldrich) che misura la riduzione dell'acido 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) a TNB mediante lettura della densità ottica del composto a 412 nm. Il GSSG formato viene ridotto a GSH dalla glutatione reduttasi e NADPH. Le cellule sono state piastrate in piastre Petri da 100 mm di diametro e trattate per 24 ore con AD838 5 μ M, H_2O_2 100 μ M, o pretrattate con AD838 30 minuti prima dell'insulto ossidativo. I campioni sono stati quindi deproteinizzati con una soluzione al 5% di acido 5- solfosalicilico, centrifugato per rimuovere il precipitato proteico, e quindi testato per la quantificazione del GSH.

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in triplicato. I valori sono espressi come medie \pm errori standard e hanno un intervallo di confidenza del 95%. Le differenze tra i campioni sono state calcolate attraverso il paired o unpaired t-test nel software Graph-Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA) (Student-Newman-Keuls multiple comparison adjustment).

Risultati

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Risultati nanoceria

Il saggio di vitalità MTT è stato utilizzato per valutare l'eventuale tossicità del nanoceria a seguito dell'esposizione delle cellule PC12 a concentrazioni crescenti di nanoparticelle (da 0 a 5000 $\mu\text{g/ml}$). La figura 6 mostra che il nanoceria alle concentrazioni da 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ non altera la vitalità cellulare.

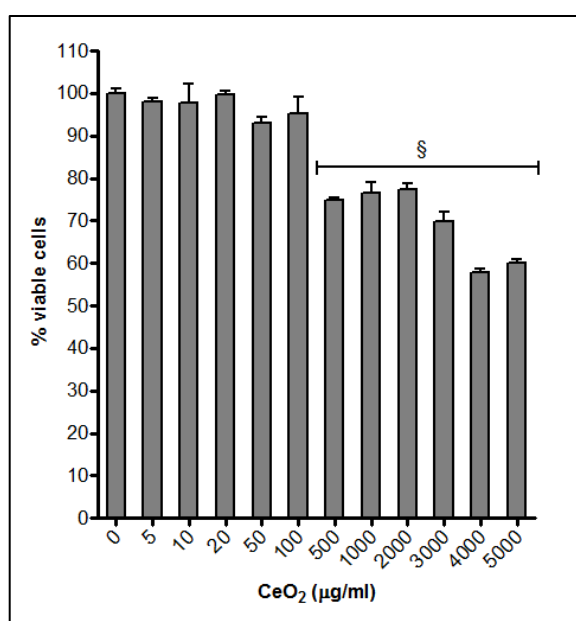


Figura 6. Saggio MTT: effetto del nanoceria (48h; 0-5000 $\mu\text{g/ml}$) sulla vitalità cellulare delle PC12.

Al fine di valutare il grado di internalizzazione delle nanoparticelle nelle cellule è stata eseguita un'analisi di citometria a flusso trattando le PC12 con nanoceria fluorescente. La figura 7 mostra che l'aumento della fluorescenza intracellulare è dipendente dalla concentrazione di nanoceria utilizzato: in particolare, l'intensità media di fluorescenza aumenta da 9,97 unità arbitrarie (u.a.) del trattamento di 20 $\mu\text{g/ml}$ a 137,16 u.a. corrispondenti al trattamento di 100 $\mu\text{g/ml}$.

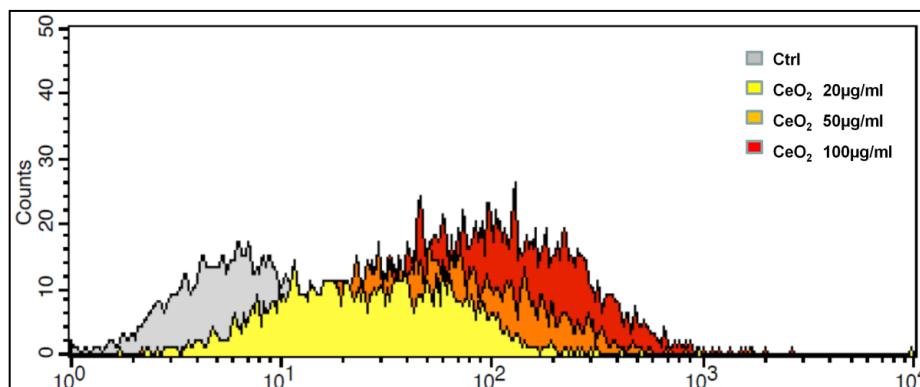


Figura 7. Intensità media di fluorescenza (MFI) delle cellule in funzione della concentrazione di nanoceria.

Per confermare i dati di internalizzazione è stata quindi eseguita un'analisi di microscopia confocale su cellule PC12 trattate con nanoceria alla concentrazione di 20 µg/ml. Come mostrato dalle proiezioni dell'asse Z nella figura 8, dopo 24 ore di trattamento il nanoceria fluorescente è internalizzato nelle cellule e non localizzato sulla superficie cellulare. Non è invece stata rilevata nessuna evidenza di una localizzazione intranucleare. È stato quindi valutato l'effetto della somministrazione di nanoceria su cellule PC12 esposte al solo MnCl₂ o al MnCl₂ e L-Dopa mediante due diversi saggi di vitalità cellulare. Come mostrato in figura 9, entrambi i saggi mostrano lo stesso andamento nei valori di vitalità. Il trattamento con MnCl₂ riduce la vitalità cellulare al 55% (MTT) e 65% (TB) rispetto alle cellule non trattate (controllo). Il pretrattamento con nanoceria alla concentrazione di 10 e 20 µg/ml è in grado di ridurre la mortalità del 15% ($p < 0,05$) rispetto alle cellule trattate con solo MnCl₂. La somministrazione di L-Dopa alla concentrazione di 20 µM insieme al MnCl₂ determina una variazione della vitalità cellulare non statisticamente differente da quella indotta dal solo MnCl₂.

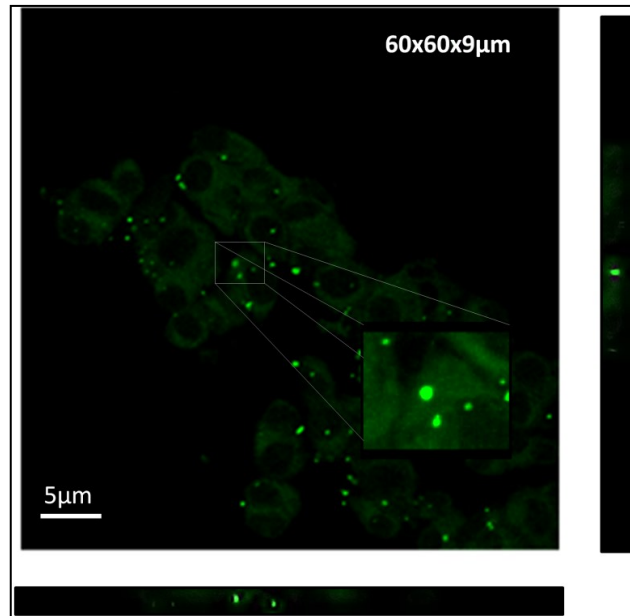


Figura 8. 3D rendering mediante proiezione laterale dell' asse Z che mostra l'internalizzazione delle nanoparticelle di ceria (punti verdi), come confermato dallo zoom 4X.

Inoltre, il trattamento con nanoceria prima del trattamento $\text{MnCl}_2/\text{L-Dopa}$ determina una riduzione della mortalità cellulare di circa il 10%. Il range di concentrazioni di nanoceria che riduce la mortalità cellulare è in questo caso tra 20 e 50 $\mu\text{g/ml}$, a fronte dei 10-20 $\mu\text{g/ml}$ nel caso dell'insulto con solo MnCl_2 .

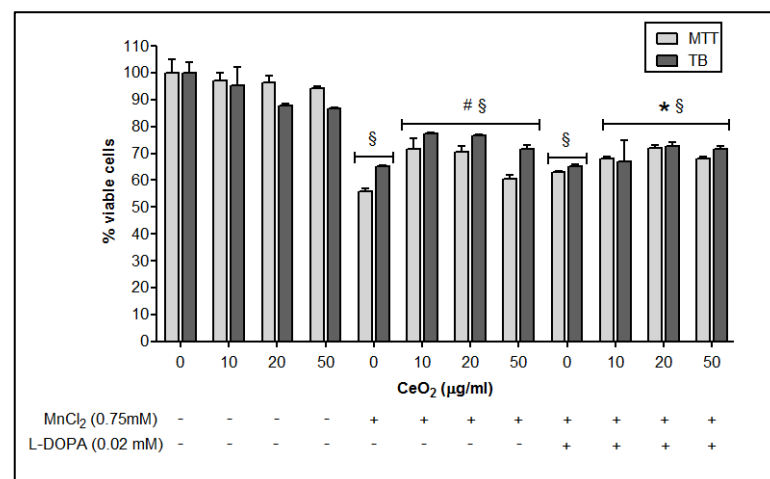


Figura 9. Effetto del nanoceria sulla vitalità cellulare di PC12 trattate con MnCl_2 (0,75mM) e MnCl_2 + L-Dopa (0,02mM) valutato mediante saggi MTT e Trypan Blue. * $p < 0,05$ vs MnCl_2 ; # $p < 0,05$ vs $\text{MnCl}_2 + \text{L-Dopa}$.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

È stata quindi effettuata la quantificazione di dopamina (DA), acido idrossifenilacetico (DOPAC), 3-metossitiramina (3-MT) e acido omovanillico (HVA) intracellulari mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) in seguito a trattamento con nanoceria associato a $MnCl_2$ e $MnCl_2+L-DOPA$. La figura 10 mostra i risultati di tale analisi. In seguito a trattamento con $MnCl_2$ si evidenzia una riduzione significativa (60%) della concentrazione di dopamina rispetto al controllo. I livelli intracellulari di DOPAC e 3-MT subiscono una forte riduzione, rispettivamente del 73% e 68% rispetto ai valori del controllo. La concentrazione di HVA non risulta alterata dal trattamento con $MnCl_2$. Il pretrattamento con nanoceria induce un significativo aumento (31%) del livello di DA rispetto al trattamento con solo $MnCl_2$, effetto non rilevato sui metaboliti della dopamina. L'aggiunta di L-DOPA determina variazioni dei livelli di DA e dei suoi metaboliti paragonabili a quelle indotte dal solo $MnCl_2$. Tuttavia il pretrattamento con nanoceria ha un effetto minore rispetto allo stesso co-trattamento con $MnCl_2$.

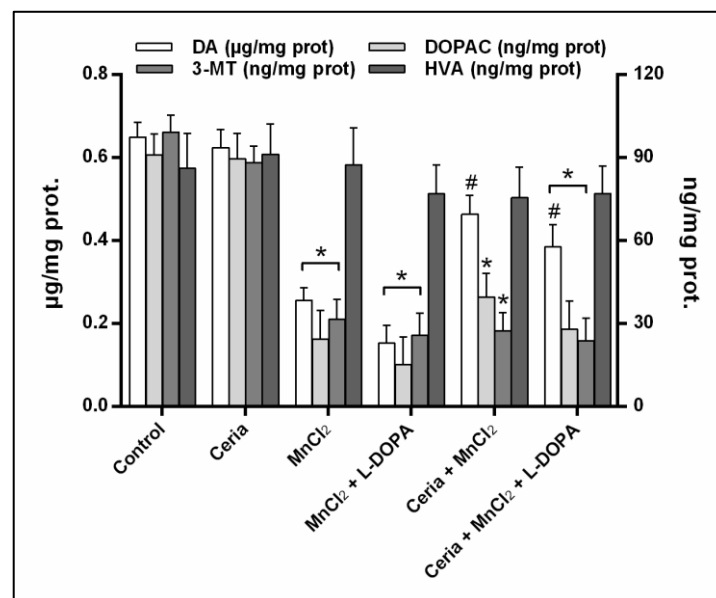


Figura 10. Effetti del nanoceria sulle variazioni di livelli intracellulari di DA, 3-MT, DOPAC e HVA indotti da $MnCl_2$ e $MnCl_2+L-Dopa$. * $p < 0,05$ vs control; # $p < 0,05$ vs $MnCl_2$.

Successivamente si è valutato il livello di apoptosi mediante analisi di citofluorimetria in cellule esposte prima al nanoceria e poi al MnCl_2 . L'analisi citofluorimetrica in fig. 11 mostra i risultati del profilo PI / annexinV di cellule PC12 trattate con CeO_2 e MnCl_2 . Il cloruro di manganese induce una morte cellulare per apoptosi pari al 28%. Il trattamento con nanoparticelle di ceria alla concentrazione di 20 $\mu\text{g/ml}$ quando associato al MnCl_2 riduce la percentuale di apoptosi del 25%. Le concentrazioni di 10, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, hanno dato risultati simili o inferiori in termini di riduzione dell'apoptosi. L'aggiunta di L-Dopa ai gruppi di trattamento non provoca significativi cambiamenti nelle percentuali di apoptosi (dati non mostrati).

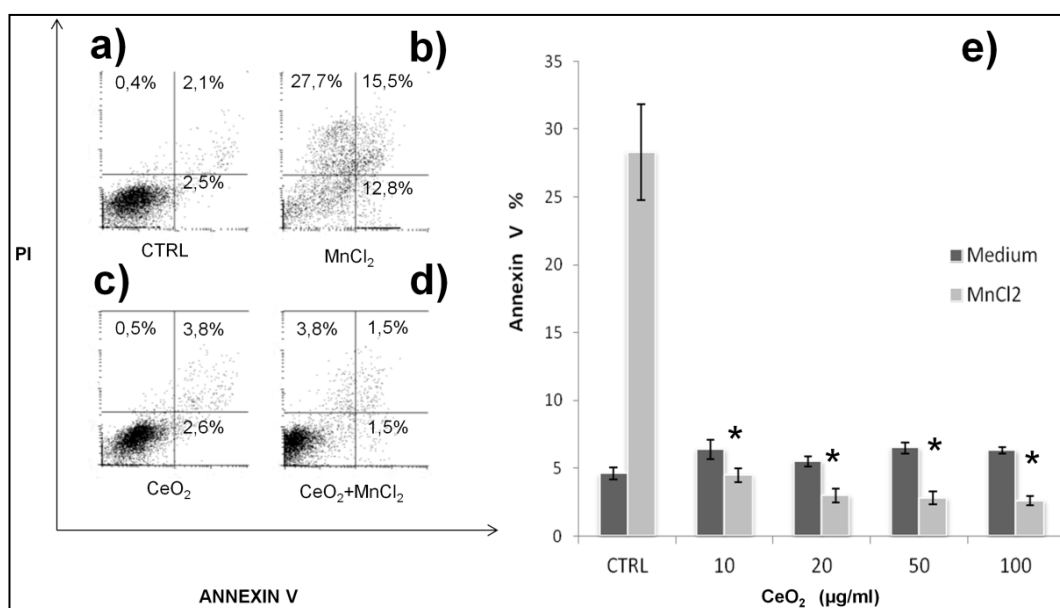


Figura 11. Analisi citofluorimetrica: profilo PI/Annessina V su cellule PC12. (a) cellule non trattate (controllo) ; (b) cellule trattate con MnCl_2 ; (c) cellule trattate con nanoceria 20 $\mu\text{g/ml}$ e MnCl_2 ; (d) cellule trattate con nanoceria; (d) Valori medi di apoptosi di cellule trattate con nanoceria e MnCl_2 . * $p < 0,01$ vs. MnCl_2 .

Risultati AD838

Per valutare l'eventuale citotossicità del bifenile AD838 è stata valutata la vitalità cellulare delle PC12 in seguito a trattamento con concentrazioni crescenti del composto (da 1 a 40 μM) mediante saggio MTT. Dai risultati mostrati in figura 12 si evince che, fino alla concentrazione 25 μM , AD838 non altera la vitalità cellulare. Il saggio di vitalità MTT ha mostrato inoltre che il trattamento con H_2O_2 100 μM per 24h determina una mortalità cellulare del 45%. Il pretrattamento con AD838 5 e 10 μM attenua il danno indotto dal perossido di idrogeno riducendo la mortalità del 10% e 20% rispettivamente (Fig.12).

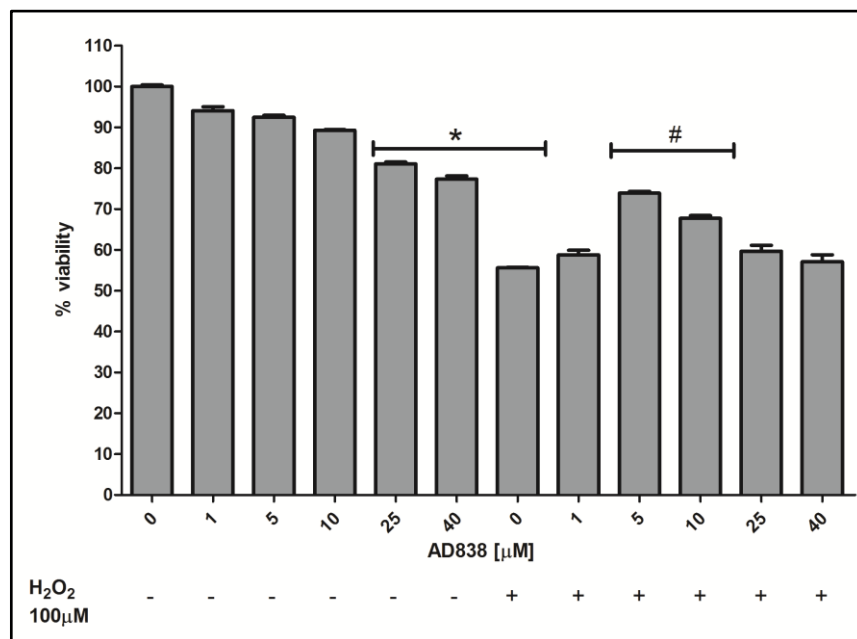


Figura 12. MTT: effetto di AD838 sulla proliferazione cellulare e citotossicità indotta da H_2O_2 . * $p < 0,005$ vs control, # $p < 0,005$ vs H_2O_2 .

Sulla base dei risultati dello screening mediante MTT, è stato eseguito il saggio del LDH i cui risultati sono mostrati in figura 13. In seguito al trattamento con H_2O_2 si hanno livelli extracellulari di LDH maggiori del 35% rispetto al controllo. Il

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

pretrattamento con AD838 alle concentrazioni 5 μM e 10 μM riduce rispettivamente tale percentuale al 10% e 15%. La figura 14A mostra l'analisi citofluorimetrica mediante la quale è stato quantificato il picco sub-G1 del citogramma, indice della morte cellulare.

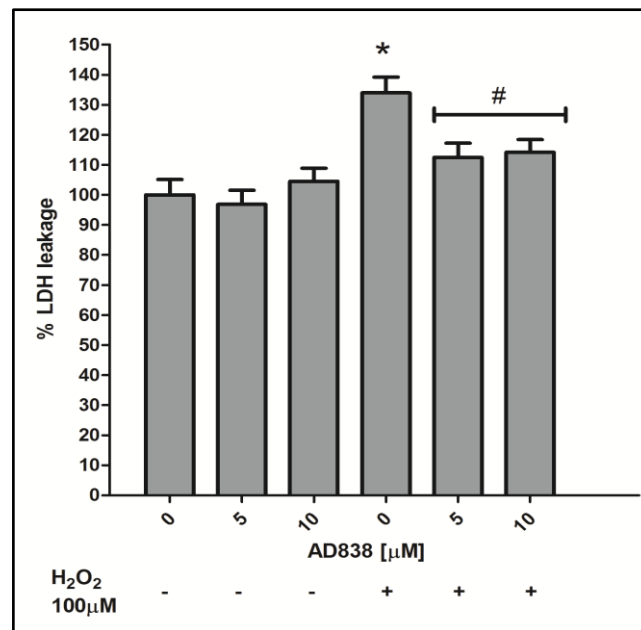


Figura 13. Saggio LDH: Effetto di AD838 su cellule PC12 trattate con H₂O₂. * $p < 0,005$ vs controllo, # $p < 0,005$ vs H₂O₂

Il trattamento con H₂O₂ 100 μM induce un accumulo delle cellule nel picco sub-G1 pari al $34,2 \pm 3,8\%$, mentre nel controllo tale valore è del $4,5\% \pm 0,7\%$. Il pretrattamento con AD838 5 μM , riduce significativamente tale accumulo portandolo al $10,1 \pm 1,6\%$ ($p < 0,01$ vs H₂O₂ 100 μM). Un'ulteriore analisi citofluorimetrica, effettuata utilizzando ioduro di propidio e annessina V, ha permesso di distinguere tra cellule apoptotiche e necrotiche. Come mostrato in figura 14B, il trattamento con perossido di idrogeno aumenta significativamente la percentuale di cellule apoptotiche precoci e tardive a $23 \pm 1,6\%$ (Q3-LR) e $5,3 \pm 0,8\%$ (Q3-UR) rispettivamente. Il pretrattamento con AD838 5 μM riduce la

percentuale di cellule apoptotiche al 10% (8,4% precoci e 1,6% tardive; $p < 0,01$ vs H_2O_2 100 μM).

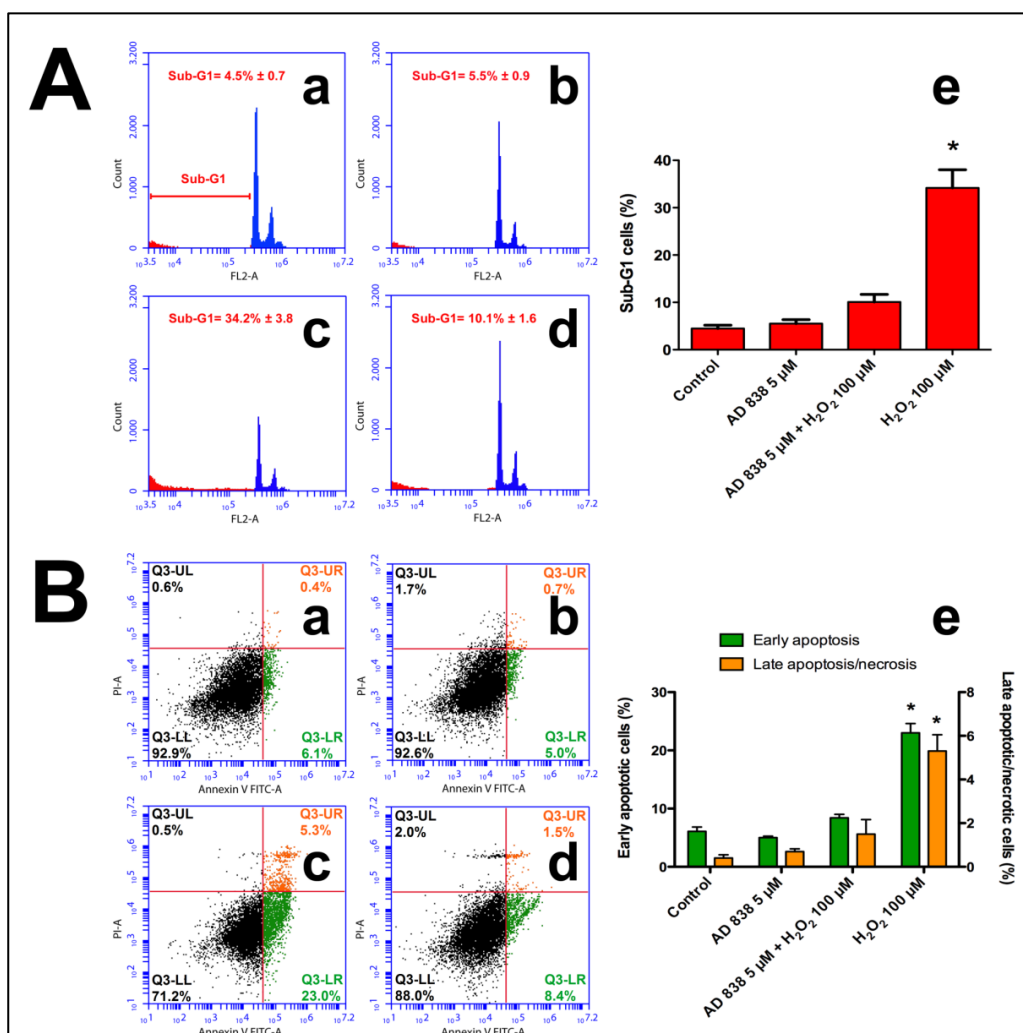


Figura 14. Citofluorimetria di cellule PC12 marcate con IP. a) Controllo; b) AD838 5 μM ; c) H_2O_2 100 μM ; d) AD838 + H_2O_2 ; e) quantificazione percentuale del picco sub-G1. B. Citofluorimetria di cellule marcate con AnnessinaV/Ioduro di propidio. a) Controllo; b) AD838 5 μM ; c) H_2O_2 100 μM ; d) AD838 + H_2O_2 ; e) quantificazione delle percentuali di apoptosi precoce e tardiva. * $p < 0,005$ vs controllo.

Al fine di testare le proprietà antiossidanti di AD838 è stato eseguito un saggio qualitativo di individuazione dei ROS intracellulari mediante la sonda

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

fluorescente DCFH-DA. La figura 15 mostra le immagini di microscopia di fluorescenza relative a tale saggio. La fluorescenza verde intracellulare è direttamente proporzionale alla quantità di ROS presenti. Risulta quindi evidente l'effetto pro-ossidante del perossido di idrogeno (Fig.15 c) deducibile dal significativo aumento di fluorescenza rispetto al controllo (Fig.15 a) . Allo stesso tempo è possibile notare come il campione pretrattato con AD838 (Fig.15 d) possieda ancora una debole ma molto ridotta fluorescenza intracellulare.

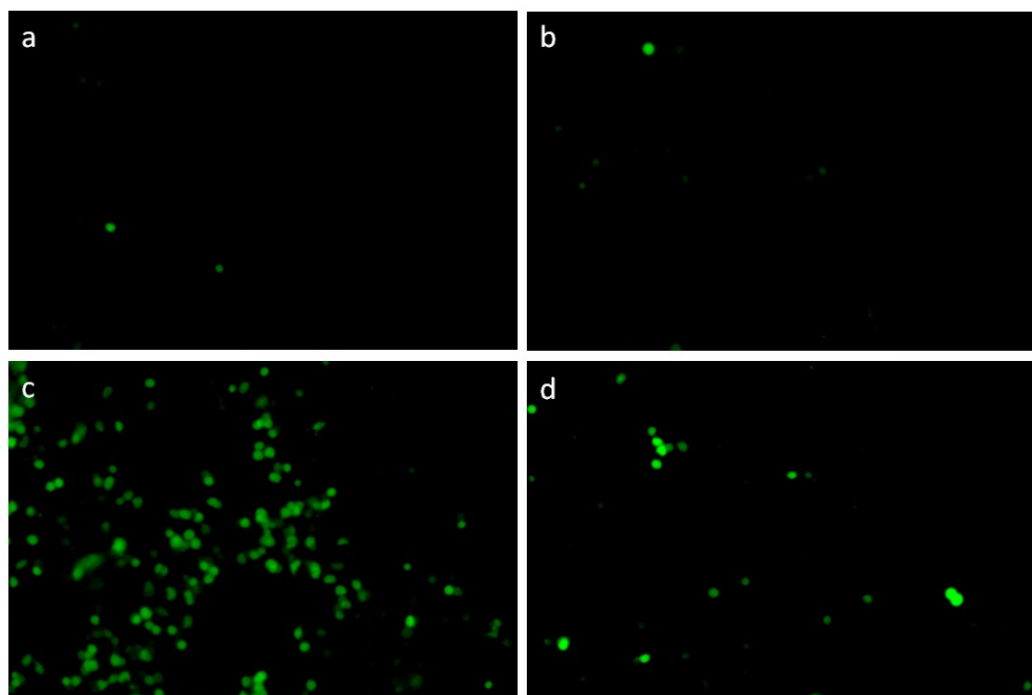


Figura 15. Effetto di AD838 sull'accumulo intracellulare dei ROS indotto da H₂O₂ mediante la sonda fluorescente DCFH-DA. a: controllo; b: AD838 5 μM, c: trattamento H₂O₂ 100 μM treatment, d: trattamento AD838 5 μM + H₂O₂ 100 μM.

È stato infine confermato l'effetto antiossidante di AD838 mediante quantificazione del GSH. I risultati di tale saggio sono mostrati nella figura 16. In seguito al trattamento con H₂O₂ si ottiene un significativo aumento della

quantità di GSH da 200 ± 32 (valore controllo) a 412 ± 51 nmol/mg. Il pretrattamento con AD838 5 μ M riduce la quantità di GSH a 295 ± 30 nmol/mg.

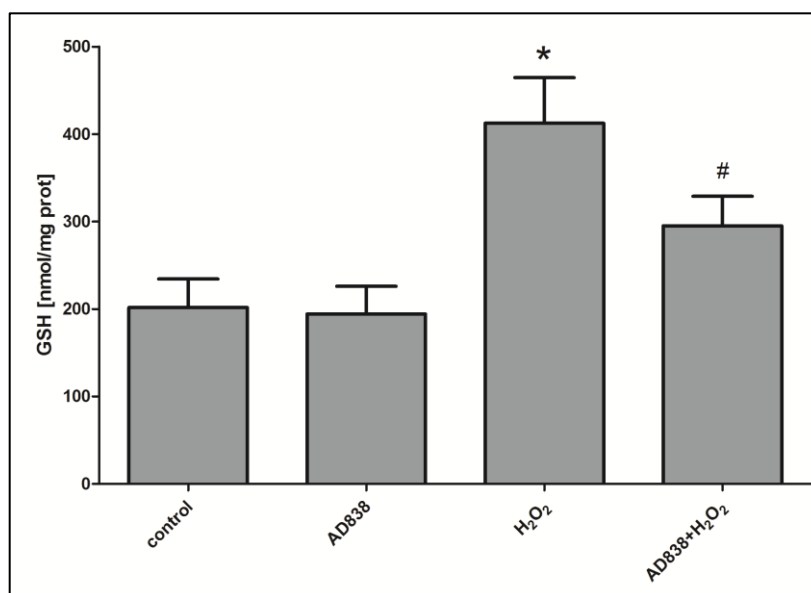


Figura 16. Effetto dei trattamenti con H₂O₂ 100 μ M e AD838 5 μ M sui livelli di GSH intracellulari. * $p < 0,005$ vs controllo, # $p < 0,005$ vs H₂O₂.

Discussione

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

In tutti gli organismi aerobi viene mantenuto un delicato equilibrio detto ossidoriduttivo tra le sostanze ossidanti, quali per esempio le specie reattive dell'ossigeno, e il sistema di difesa antiossidante. Alterazioni di tale stato ossidoriduttivo possono provocare effetti tossici poiché le specie chimiche reattive danneggiano le componenti della cellula incluse proteine, lipidi e acidi nucleici (Siciliano, Piazza et al. 2007). Quando la produzione di ROS prevale sul sistema di difesa antiossidante si genera uno sbilanciamento che determina una condizione di stress ossidativo (Sompol, Ittarat et al. 2008). Diversi studi sullo stress ossidativo ne hanno identificato il ruolo cruciale sia durante il fisiologico processo di invecchiamento (Jha and Rizvi 2009) che nella patogenesi di malattie quali quelle neurodegenerative, le neoplasie e l'ischemia, (Butterfield, Reed et al. 2007). Nell'organismo ogni tessuto ha una differente suscettibilità allo stress ossidativo. Il sistema nervoso centrale (CNS) è particolarmente vulnerabile al danno da radicali liberi per diverse ragioni, la più importante delle quali è l'elevato consumo di ossigeno (Mariani, Polidori et al. 2005; Lovell and Markesbery 2007). È ormai risaputo quindi che lo stress ossidativo, alterando la funzionalità mitocondriale e inducendo l'apoptosi, riveste un ruolo fondamentale nella morte neuronale e quindi nella patogenesi di malattie neurodegenerative come l'Alzheimer, il Parkinson, la Sclerosi Laterale Amiotrofica e la Sclerosi Multipla (Emerit, Edeas et al. 2004; Gilgun-Sherki, Melamed et al. 2004; Barber, Mead et al. 2006). Negli ultimi anni la ricerca di antiossidanti naturali o sintetici in grado di agire come coadiuvanti degli agenti terapeutici in questo tipo di malattie ha suscitato infatti grande interesse. Nel presente studio sono caratterizzati due composti di diversa origine: il nanoceria, nanoparticelle di ossido di cerio con struttura cristallina di fluorite, e l'AD838 un composto bifenilico natural-like strutturalmente correlato ad un inibitore di tirosinasi. Le nanoparticelle di ossido di ceria sono state finora ampiamente studiate soprattutto in ambito industriale e cosmetico. I composti di cerio, e in particolare

l'ossido di cerio CeO_2 , per la sua capacità di legare l'ossigeno e passare facilmente dallo stato trivalente a quello tetravalente, sono noti come ottimi catalizzatori e come additivi dei carburanti (Masui, Ozaki et al. 2000). Solo recentemente il nanoceria è oggetto di studio per sfruttare la sua capacità di neutralizzare i radicali in applicazioni biologiche. Il nanoceria ha mostrato di avere effetto antiossidante *in vitro* e *in vivo* su alcune malattie come l'ischemia (Estevez, Pritchard et al. 2011) e la sclerosi multipla (Heckman, DeCoteau et al. 2013). Inoltre, recenti studi si sono incentrati sulle proprietà neuroprotettive del nanoceria su cellule PC12 sottoposte a stress ossidativo indotto dal perossido di idrogeno (Ciofani 2013). Nel presente studio il nanoceria è stato testato su un modello *in vitro* di stress ossidativo specifico quale quello del parkinsonismo indotto da intossicazione da manganese (Hudnell 1999). Come noto infatti, il Mn induce neurotossicità determinando una sindrome simile alla malattia di Parkinson per via dell'aumento dello stress ossidativo nelle cellule. I risultati ottenuti in questo studio mostrano l'attività neuroprotettiva del nanoceria nei confronti dell'insulto da manganese, poiché in grado di ridurre la mortalità cellulare indotta dal MnCl_2 . Poiché la natura chimica del nanoceria ne determina la tendenza a formare agglomerati di nanoparticelle, numerosi studi sono stati effettuati al fine di ottimizzarne le caratteristiche necessarie all'assorbimento del ceria (Karakoti, Kuchibhatla et al. 2007; Singh, Cohen et al. 2007; Karakoti, Monteiro-Riviere et al. 2008). Per valutare se il meccanismo d'azione del nanoceria avvenisse nell'ambiente extracellulare o direttamente all'interno della cellula è stato valutato l'assorbimento delle nanoparticelle di ceria. Questo studio ha dimostrato l'internalizzazione dose dipendente del nanoceria nelle cellule PC12, indicando un meccanismo diretto di protezione dallo stress ossidativo intracellulare. Inoltre non è stata rilevata alcuna localizzazione intranucleare portando ad escludere un'eventuale interazione del nanoceria con il DNA e fattori di trascrizione. I dati ottenuti confermano quindi l'effetto

antiossidante del nanoceria e suggeriscono il suo ipotetico ruolo nella terapia di malattie neurodegenerative in cui è coinvolto lo stress ossidativo ma in particolare nel PD. Tale ipotesi è suggerita anche dai risultati ottenuti utilizzando il nanoceria in combinazione con Mn e L-DOPA. Infatti, in letteratura è dimostrato che LDOPA aumenta la citotossicità e l'apoptosi indotta da Mn (Migheli, Godani et al. 1999). I nostri esperimenti mostrano come il nanoceria sia in grado di proteggere la vitalità di cellule esposte all'insulto combinato di Mn e L-DOPA. Altro aspetto interessante emerso in questo studio è l'abilità del nanoceria di rallentare i fenomeni di autossidazione della DA *in vitro*. Infatti, è noto dalla letteratura che la L-DOPA e la dopamina, composti che contengono il gruppo catecolo, spesso vanno incontro ad auto-ossidazione *in vivo* (Serra, Esposito et al. 2000) con la conseguente formazione dei derivati chinonici e dell'anione superossido e incremento dello stress ossidativo. La quantificazione cromatografica della DA e dei suoi principali metaboliti (3-MT, DOPAC e HVA) ha permesso di valutare l'effetto del nanoceria in combinazione con Mn e L-DOPA sui loro livelli intracellulari. Il pretrattamento delle cellule PC12 con nanoceria è in grado di aumentare i livelli di DA rispetto a cellule esposte al solo Mn e in misura minore rispetto a quelle esposte a Mn e L-DOPA. Tale ripristino dei livelli intracellulari non è stato rilevato per quanto riguarda i metaboliti della DA. Da questi risultati è possibile ipotizzare un effetto neuroprotettivo del nanoceria nel contrastare l'autossidazione della DA, infatti, se l'aumento di DA fosse dovuto ad un aumento della sua sintesi, tale aumento si rifletterebbe anche sui livelli dei suoi metaboliti. I dati ottenuti in questo studio quindi, rivelano l'effetto protettivo del nanoceria nei confronti dell'apoptosi indotta da Mn, e la sua azione nel ridurre l'autossidazione della DA, suggerendone un possibile uso come coadiuvante nella terapia di molte malattie neurodegenerative ma in particolare nel PD.

Nell'ambito di un più ampio studio sulla ricerca di nuovi antiossidanti naturali e *natural-like* i nostri esperimenti si sono concentrati su un bifenile analogo strutturale del composto 4,4'-diidrossibifenile. Tale composto è noto in letteratura come potente antiossidante e inibitore della tirosinasi (Kim, No et al. 2005; Yoshikawa, Saito et al. 2006). Queste caratteristiche lo rendono molto interessante nello studio delle malattie neurodegenerative e in particolare nella malattia di Parkinson. Nel nostro studio è stato testato un suo analogo strutturale, l'AD838, sintetizzato aggiungendo al 4,4'-diidrossibifenile un gruppo sostituito al fine di aumentarne la solubilità e conservarne le proprietà antiossidanti. La presenza del sostituito rende l'AD838 più solubile in solvente acquoso: l'alta solubilità è una caratteristica molto importante nella ricerca di nuovi agenti farmacologici in quanto non solo ne facilita l'utilizzo sperimentale ma ne aumenta la rapidità di assorbimento. Le analisi sulla vitalità cellulare effettuate sul AD838 confermano la capacità citoprotettiva di AD838 nei confronti del danno ossidativo indotto da perossido di idrogeno, conforme ai dati presenti in letteratura relativi al suo precursore (Yoshikawa, Saito et al. 2006). Gli effetti protettivi sono relazionabili alla sua attività antiossidante: test di valutazione dei ROS intracellulari ne hanno mostrato la riduzione operata dal composto AD838 su cellule esposte al perossido di idrogeno. Tale indicazione sugli effetti di AD838 sui ROS ha portato a ulteriori indagini sulla sua attività antiossidante. È stato infatti quantificato il GSH intracellulare in seguito a esposizione delle cellule PC12 a AD838 e perossido di idrogeno. Il GSH è noto essere una delle principali difese antiossidanti, in quanto substrato ridotto dell'enzima glutatione perossidasi che converte il H_2O_2 in acqua ossidando il GSH (Kaur and Andersen 2004). I nostri risultati hanno evidenziato un aumento dei livelli di GSH in seguito a trattamento con H_2O_2 , mentre il pretrattamento con AD838 tende a riportare tali livelli verso i valori basali. Il meccanismo alla base di tale risultato è da ricercarsi nella risposta adattativa delle cellule all'insulto

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

ossidativo, come già suggerito da Forman e collaboratori (Shi, Kugelman et al. 1994). È stato dimostrato infatti che lo stress ossidativo determina nelle cellule una reazione a breve termine in cui si ha una diminuzione dei livelli di GSH, che viene utilizzato come riducente. Dopo 24 ore si ha un'inversione dell'andamento, con livelli di GSH che duplicano rispetto ai valori basali. È stato ipotizzato quindi che si verifichi una sintesi *ex novo* di GSH quale risposta adattativa della cellula al protratto stress ossidativo (Darley-Usmar, Severn et al. 1991). In tale scenario, il ruolo del AD838 si esplica con la tendenza a riportare i livelli di GSH ai valori normali e a ristabilire l'equilibrio ossido-riduttivo all'interno delle cellule.

Inoltre, poiché è noto che il perossido di idrogeno induce morte cellulare sia mediante necrosi che apoptosi (Hampton and Orrenius 1997), è stato possibile indagare sul meccanismo di morte cellulare target dell'attività di AD838. Le analisi citofluorimetriche effettuate hanno dimostrato una spiccata attività antiapoptotica del composto testato. L'insieme delle caratteristiche antiossidanti e antiapoptotiche di AD838 consentono di ipotizzarne un ruolo come coadiuvante nella terapia delle malattie stress ossidativo-correlate, come ad esempio le malattie neurodegenerative, in cui la neurodegenerazione per apoptosi è un target terapeutico.

In questo modo sostanze come il nanoceria, già utilizzate per varie applicazioni (es. come carrier per il drug delivery, schermante U.V.) o come l'AD838 contenente una struttura già nota in letteratura come inibitore di tirosinasi (potenziali cosmetici antimelanina) possono essere proposti come eventuali coadiuvanti nella terapia di malattie neurodegenerative.

To be continued...

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

Lo studio di agenti antiossidanti come possibili coadiuvanti terapeutici per le malattie neurodegenerative presentati in questa tesi, è stato effettuato su una linea cellulare neuronale immortalizzata (PC12) ampiamente utilizzata negli studi sulla malattia di Parkinson. Le linee cellulari neuronali e in particolare le PC12 rappresentano un ottimo modello cellulare neuronale, tuttavia, sarebbe interessante estendere su colture primarie la ricerca effettuata, in quanto rispecchiano maggiormente le caratteristiche del microambiente cerebrale.

In quest'ottica, l'ultima parte del percorso di Dottorato di Ricerca è stata svolta presso il prestigioso Netherlands Institute for Neuroscience di Amsterdam (NIN), sotto la guida della Dott.ssa Sabina Luchetti, nel laboratorio Neuroimmunology della Dott.ssa Inge Huitinga, Direttrice della Netherlands Brain Bank, (NBB, www.brainbank.nl). La collaborazione tra il NIN e la NBB, la più grande *brain bank* europea, offre un ambiente unico ed eccellente, in quanto la NBB effettua 130 autopsie all'anno con rapidi protocolli di dissezione applicati entro 10 ore post-mortem. Inoltre, il gruppo guidato dalla Dott.ssa Huitinga ha recentemente messo a punto un nuovo e rapido protocollo di isolamento della microglia dal tessuto *post-mortem*, idoneo all'immediato uso *ex-vivo* (Melief, Koning et al. 2012). Durante l'esperienza effettuata nel gruppo di ricerca del NIN sono state isolate colture primarie di microglia e astrociti da tessuti *post-mortem* di pazienti con sclerosi multipla (SM) allo scopo di testare l'effetto di sostanze, come gli steroidi sessuali, note per il loro impatto sull'infiammazione e neuroprotezione nella SM. Come è noto, la sclerosi multipla è una malattia neurodegenerativa molto comune, più frequente nelle donne rispetto agli uomini e presenta differenze di genere sia per il suo decorso che per la gravità dei sintomi (Orton, Herrera et al. 2006; Alonso, Jick et al. 2007). Inoltre, recenti studi clinici suggeriscono che le terapie con estrogeni possono rallentare la progressione della SM (Gold and Voskuhl 2009; Gold and Voskuhl 2009). Nonostante un effetto protettivo degli steroidi sia stato dimostrato in modelli animali di SM (El-

Etr, Ghomari et al. 2011), al momento non sono noti gli effetti dei diversi steroidi sessuali sul sistema nervoso centrale di pazienti affetti da SM. Precedenti studi del gruppo di ricerca del NIN, condotti su pazienti, hanno mostrato l'aumento dell'espressione dei recettori degli ormoni sessuali nelle cellule della glia presenti all'interno delle lesioni tipiche della SM, confermandone la loro implicazione (Luchetti, van Eden et al. 2014). Gli studi effettuati hanno permesso di testare l'effetto dei diversi neurosteroidi su colture primarie di astrociti e microglia isolate dal tessuto *post-mortem* di pazienti con SM. Inoltre, durante lo svolgimento del presente studio, è stato messo a punto un protocollo per l'isolamento e la purificazione degli astrociti da cervello fetale umano e da tessuto *post-mortem* di pazienti. Nell'ambito dello stesso progetto di ricerca, un altro modello di sperimentazione cellulare è stato preso in esame per lo studio sui neurosteroidi: le colture di *whole brain spheroids*, modello ideale per gli studi di de/remielinizzazione. Gli *whole brain spheroids* (Teunissen, Markerink-van Ittersum et al. 2002) infatti sono colture primarie di cellule cerebrali di feto di ratto che contengono tutti i tipi cellulari del SNC e rappresentano quindi un utile e affidabile modello di sperimentazione poiché, grazie alla loro eterogeneità e crescita tridimensionale, riproducono il microambiente del tessuto cerebrale ancor meglio delle colture primarie pure. I modelli sperimentali, neurosferoidi e colture primarie umane, messi a punto durante l'esperienza nel NIN potranno essere utili alla ricerca futura nell'ambito della neurodegenerazione, fornendo un più realistico modello di cellule cerebrali sul quale testare gli effetti antiossidanti e antiapoptotici dei composti di diversa origine esaminati in questo studio.

Bibliografia

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Ahdab-Barmada, M., J. Moossy, et al. (1986). "Hyperoxia produces neuronal necrosis in the rat." J Neuropathol Exp Neurol **45**(3): 233-246.
- Aiken, C. T., R. M. Kaake, et al. (2011). "Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes." Mol Cell Proteomics **10**(5): R110 006924.
- Alonso, A., S. S. Jick, et al. (2007). "Incidence of multiple sclerosis in the United Kingdom : findings from a population-based cohort." J Neurol **254**(12): 1736-1741.
- Aschner, M., K. E. Vrana, et al. (1999). "Manganese uptake and distribution in the central nervous system (CNS)." Neurotoxicology **20**(2-3): 173-180.
- Barbeau, A. (1984). "Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias)." Neurotoxicology **5**(1): 13-35.
- Barber, S. C., R. J. Mead, et al. (2006). "Oxidative stress in ALS: a mechanism of neurodegeneration and a therapeutic target." Biochim Biophys Acta **1762**(11-12): 1051-1067.
- Basma, A. N., E. J. Morris, et al. (1995). "L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation." J Neurochem **64**(2): 825-832.
- Borowitzka, M. (1995). "Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds." Journal of Applied Phycology **7**(1): 3-15.
- Borowitzka, M. A. (1988). Fats, oils and hydrocarbons. Micro-algal Biotechnology. M. A. Borowitzka, Borowitzka, L.J. Cambridge, Cambridge University Press: 257-287.
- Borowitzka, M. A. (1988). Vitamins and fine chemicals from micro-algae. Micro-algal Biotechnology. M. A. B. Borowitzka, L.J. Cambridge, Cambridge University Press: 211-217.
- Boudghene Stambouli, A. and E. Traversa (2002). "Fuel cells, an alternative to standard sources of energy." Renewable and Sustainable Energy Reviews **6**(3): 295-304.
- Butterfield, D. A., T. Reed, et al. (2007). "Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment." Free Radic Biol Med **43**(5): 658-677.
- Cai, Y. Y., W. P. Lin, et al. (2013). "Combined effects of curcumin and triptolide on an ovarian cancer cell line." Asian Pac J Cancer Prev **14**(7): 4267-4271.

- Caicedo, N. H., J. Kumirska, et al. (2012). "Detection of bioactive exometabolites produced by the filamentous marine cyanobacterium *Geitlerinema* sp." Mar Biotechnol (NY) **14**(4): 436-445.
- Carl, G. F., C. L. Keen, et al. (1986). "Association of low blood manganese concentrations with epilepsy." Neurology **36**(12): 1584-1587.
- Celardo, I., J. Z. Pedersen, et al. (2011). "Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles." Nanoscale **3**(4): 1411-1420.
- Chandra, S. V., G. S. Shukla, et al. (1981). "An exploratory study of manganese exposure to welders." Clin Toxicol **18**(4): 407-416.
- Charlton, J. L. (1998). "Antiviral activity of lignans." J Nat Prod **61**(11): 1447-1451.
- Chen, J. Y., G. C. Tsao, et al. (2001). "Differential cytotoxicity of Mn(II) and Mn(III): special reference to mitochondrial [Fe-S] containing enzymes." Toxicol Appl Pharmacol **175**(2): 160-168.
- Cho, J. Y., A. R. Kim, et al. (2001). "Lignans from the rhizomes of *Coptis japonica* differentially act as anti-inflammatory principles." Planta Med **67**(4): 312-316.
- Ciofani, G., G. G. Genchi, et al. (2013). "Effects of cerium oxide nanoparticles on PC12 neuronal-like cells: proliferation, differentiation, and dopamine secretion." Pharm Res **30**(8): 2133-2145.
- Clarke, P. G. (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms." Anat Embryol (Berl) **181**(3): 195-213.
- Colon, J., N. Hsieh, et al. (2010). "Cerium oxide nanoparticles protect gastrointestinal epithelium from radiation-induced damage by reduction of reactive oxygen species and upregulation of superoxide dismutase 2." Nanomedicine **6**(5): 698-705.
- Conesa, J. (1995). "Computer modeling of surfaces and defects on cerium dioxide." Surface Science **339**(3): 337-352.
- Corma, A., P. Atienzar, et al. (2004). "Hierarchically mesostructured doped CeO₂ with potential for solar-cell use." Nat Mater **3**(6): 394-397.
- Couper, J. (1837). "On the effects of black oxide of manganese when inhaled into the lungs." The American Journal of the Medical Sciences **22**: 522-523.

- Crossgrove, J. and W. Zheng (2004). "Manganese toxicity upon overexposure." NMR Biomed **17**(8): 544-553.
- Darley-USmar, V. M., A. Severn, et al. (1991). "Treatment of macrophages with oxidized low-density lipoprotein increases their intracellular glutathione content." Biochem J **278** (Pt 2): 429-434.
- Das, M., S. Patil, et al. (2007). "Auto-catalytic ceria nanoparticles offer neuroprotection to adult rat spinal cord neurons." Biomaterials **28**(10): 1918-1925.
- Davydov, B. I., V. I. Drobyshev, et al. (1988). "[Morphological analysis of the reaction of the animal brain to short-term hyperoxia]." Kosm Biol Aviakosm Med **22**(2): 56-62.
- De Marzi, L., A. Monaco, et al. (2013). "Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines in vitro." Int J Mol Sci **14**(2): 3065-3077.
- Desole, M. S., L. Sciola, et al. (1997). "Role of oxidative stress in the manganese and 1-methyl-4-(2'-ethylphenyl)-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced apoptosis in PC12 cells." Neurochem Int **31**(2): 169-176.
- El-Etr, M., A. Ghoumari, et al. (2011). "Hormonal influences in multiple sclerosis: new therapeutic benefits for steroids." Maturitas **68**(1): 47-51.
- Emerit, J., M. Edeas, et al. (2004). "Neurodegenerative diseases and oxidative stress." Biomed Pharmacother **58**(1): 39-46.
- Estevez, A. Y., S. Pritchard, et al. (2011). "Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia." Free Radic Biol Med **51**(6): 1155-1163.
- Falch, B. (1996). "[What remains of cyanobacteria?]." Pharm Unserer Zeit **25**(6): 311-321.
- Friedman, B. J., J. H. Freeland-Graves, et al. (1987). "Manganese balance and clinical observations in young men fed a manganese-deficient diet." J Nutr **117**(1): 133-143.
- Gandhi, S. and A. Y. Abramov (2012). "Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration." Oxid Med Cell Longev **2012**: 428010.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Gilgun-Sherki, Y., E. Melamed, et al. (2001). "Oxidative stress induced-neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier." Neuropharmacology **40**(8): 959-975.
- Gilgun-Sherki, Y., E. Melamed, et al. (2004). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy." J Neurol **251**(3): 261-268.
- Gold, S. M. and R. R. Voskuhl (2009). "Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis." Prog Brain Res **175**: 239-251.
- Gold, S. M. and R. R. Voskuhl (2009). "Estrogen treatment in multiple sclerosis." J Neurosci **286**(1-2): 99-103.
- Halliwel, B. (2006). "Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?" J Neurochem **97**(6): 1634-1658.
- Hampton, M. B. and S. Orrenius (1997). "Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis." FEBS Lett **414**(3): 552-556.
- Hattoria, N., M. Wanga, et al. (2009). "Toxic effects of dopamine metabolism in Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **15 Suppl 1**: S35-38.
- Heckman, K. L., W. DeCoteau, et al. (2013). "Custom cerium oxide nanoparticles protect against a free radical mediated autoimmune degenerative disease in the brain." ACS Nano **7**(12): 10582-10596.
- Hirst, S. M., A. S. Karakoti, et al. (2009). "Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles." Small **5**(24): 2848-2856.
- Huang, C. C., N. S. Chu, et al. (1989). "Chronic manganese intoxication." Arch Neurol **46**(10): 1104-1106.
- Hudnell, H. K. (1999). "Effects from environmental Mn exposures: a review of the evidence from non-occupational exposure studies." Neurotoxicology **20**(2-3): 379-397.
- Inoue, N. (1996). Neurological aspects in human exposures to manganese. Toxicology of Metals. L. W. Chang. Boca Raton: 415-421.
- Iregren, A. (1999). "Manganese neurotoxicity in industrial exposures: proof of effects, critical exposure level, and sensitive tests." Neurotoxicology **20**(2-3): 315-323.

- Jenner, P. (2003). "Oxidative stress in Parkinson's disease." Ann Neurol **53 Suppl 3**: S26-36; discussion S36-28.
- Jha, R. and S. I. Rizvi (2009). "Age-dependent decline in erythrocyte acetylcholinesterase activity: correlation with oxidative stress." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **153(3)**: 195-198.
- Kadiiska, M. B., S. Basu, et al. (2013). "Biomarkers of oxidative stress study V: ozone exposure of rats and its effect on lipids, proteins, and DNA in plasma and urine." Free Radic Biol Med **61**: 408-415.
- Kao, H. J., W. H. Chen, et al. (1999). "Rapid progression of parkinsonism associated with an increase of blood manganese." Kaohsiung J Med Sci **15(5)**: 297-301.
- Karakoti, A. S., S. V. N. T. Kuchibhatla, et al. (2007). "Direct Synthesis of Nanoceria in Aqueous Polyhydroxyl Solutions." The Journal of Physical Chemistry C **111(46)**: 17232-17240.
- Karakoti, A. S., N. A. Monteiro-Riviere, et al. (2008). "Nanoceria as Antioxidant: Synthesis and Biomedical Applications." JOM (1989) **60(3)**: 33-37.
- Karakoti, A. S., O. Tsigkou, et al. (2010). "Rare earth oxides as nanoadditives in 3-D nanocomposite scaffolds for bone regeneration." Journal of Materials Chemistry **20(40)**: 8912-8919.
- Kaur, D. and J. Andersen (2004). "Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease?" Ageing Res Rev **3(3)**: 327-343.
- Keen, C. L. (1995). Toxicity of essential and beneficial metal ions. Manganese. Handbook of Metal-Ligand Interactions in Biological Fluids. G. Berthon. New York: 686-688.
- Keen, C. L., J. L. Ensunsa, et al. (2000). "Manganese metabolism in animals and humans including the toxicity of manganese." Met Ions Biol Syst **37**: 89-121.
- Kim, S. R., M. K. Lee, et al. (2004). "Dibenzocyclooctadiene lignans from Schisandra chinensis protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate-induced toxicity." J Neurosci Res **76(3)**: 397-405.
- Kim, Y. J., J. K. No, et al. (2005). "4,4'-Dihydroxybiphenyl as a New Potent Tyrosinase Inhibitor." Biological and Pharmaceutical Bulletin **28(2)**: 323-327.

- Korsvik, C., S. Patil, et al. (2007). "Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles." Chem Commun (Camb)(10): 1056-1058.
- Lai, J. C., M. J. Minski, et al. (1999). "Manganese mineral interactions in brain." Neurotoxicology **20**(2-3): 433-444.
- Li, G. J., L. L. Zhang, et al. (2004). "Occupational exposure to welding fume among welders: alterations of manganese, iron, zinc, copper, and lead in body fluids and the oxidative stress status." J Occup Environ Med **46**(3): 241-248.
- Lovell, M. A. and W. R. Markesbery (2007). "Oxidative damage in mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease." J Neurosci Res **85**(14): 3036-3040.
- Luchetti, S., C. G. van Eden, et al. (2014). "Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in male and progesterone signaling in female lesions." J Neuropathol Exp Neurol **73**(2): 123-135.
- Mancuso, M., F. Coppede, et al. (2006). "Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration." J Alzheimers Dis **10**(1): 59-73.
- Mandoli, C., F. Pagliari, et al. (2010). "Stem Cell Aligned Growth Induced by CeO₂ Nanoparticles in PLGA Scaffolds with Improved Bioactivity for Regenerative Medicine." Advanced Functional Materials **20**(10): 1617-1624.
- Mariani, E., M. C. Polidori, et al. (2005). "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(1): 65-75.
- Masui, T., T. Ozaki, et al. (2000). "Preparation of ceria-zirconia sub-catalysts for automotive exhaust cleaning." Journal of Alloys and Compounds **303-304**: 49-55.
- McCord, J. M. (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress." Am J Med **108**(8): 652-659.
- Melief, J., N. Koning, et al. (2012). "Phenotyping primary human microglia: tight regulation of LPS responsiveness." Glia **60**(10): 1506-1517.
- Mena, I., O. Marin, et al. (1967). "Chronic manganese poisoning. Clinical picture and manganese turnover." Neurology **17**(2): 128-136.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Migheli, R., C. Godani, et al. (1999). "Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: role of oxidative stress." J Neurochem **73**(3): 1155-1163.
- Miranda, M. and D. Botti (1983). "Harding-passey mouse-melanoma tyrosinase inactivation by reaction products and activation by L-epinephrine." Gen Pharmacol **14**(2): 231-237.
- Miranda, M., D. Botti, et al. (1984). "Tyrosinase-like activity in normal human substantia nigra." Gen Pharmacol **15**(6): 541-544.
- Moosmann, B. and C. Behl (1999). "The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 8867-8872.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Nagata, K., K. I. Hirai, et al. (1998). "Antimicrobial activity of novel furanonaphthoquinone analogs." Antimicrob Agents Chemother **42**(3): 700-702.
- Niu, J., A. Azfer, et al. (2007). "Cardioprotective effects of cerium oxide nanoparticles in a transgenic murine model of cardiomyopathy." Cardiovasc Res **73**(3): 549-559.
- Olanow, C. W., P. F. Good, et al. (1996). "Manganese intoxication in the rhesus monkey: a clinical, imaging, pathologic, and biochemical study." Neurology **46**(2): 492-498.
- Ono, K., K. Komai, et al. (2002). "Myoclonic involuntary movement associated with chronic manganese poisoning." J Neurol Sci **199**(1-2): 93-96.
- Orton, S. M., B. M. Herrera, et al. (2006). "Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study." Lancet Neurol **5**(11): 932-936.
- Patterson, G. L., L. Larsen, et al. (1994). "Bioactive natural products from blue-green algae." Journal of Applied Phycology **6**(2): 151-157.
- Pirmohamed, T., J. M. Dowding, et al. (2010). "Nanoceria exhibit redox state-dependent catalase mimetic activity." Chem Commun (Camb) **46**(16): 2736-2738.
- Reza, V. R. M., Abbas H. (2007). "Cytotoxicity and antimicrobial activity of harman alkaloids." J. Pharmacol. Toxicol. **2**: 677-680.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Schweichel, J. U. and H. J. Merker (1973). "The morphology of various types of cell death in prenatal tissues." Teratology **7**(3): 253-266.
- Sekler, A., J. M. Jimenez, et al. (2008). "Cognitive impairment and Alzheimer's disease: Links with oxidative stress and cholesterol metabolism." Neuropsychiatr Dis Treat **4**(4): 715-722.
- Semchuk, K. M., E. J. Love, et al. (1993). "Parkinson's disease: A test of the multifactorial etiologic hypothesis." Neurology **43**(6): 1173.
- Serra, P. A., G. Esposito, et al. (2000). "Manganese increases L-DOPA auto-oxidation in the striatum of the freely moving rat: potential implications to L-DOPA long-term therapy of Parkinson's disease." Br J Pharmacol **130**(4): 937-945.
- Serra, P. A., S. Pluchino, et al. (2008). "The MPTP mouse model: cues on DA release and neural stem cell restorative role." Parkinsonism Relat Disord **14 Suppl 2**: S189-193.
- Shi, M. M., A. Kugelman, et al. (1994). "Quinone-induced oxidative stress elevates glutathione and induces gamma-glutamylcysteine synthetase activity in rat lung epithelial L2 cells." J Biol Chem **269**(42): 26512-26517.
- Shi, S., J. Zhao, et al. (2015). "KHSRP participates in manganese-induced neurotoxicity in rat striatum and PC12 cells." J Mol Neurosci **55**(2): 454-465.
- Sian, J., D. T. Dexter, et al. (1994). "Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia." Ann Neurol **36**(3): 348-355.
- Siciliano, G., S. Piazza, et al. (2007). "Antioxidant capacity and protein oxidation in cerebrospinal fluid of amyotrophic lateral sclerosis." J Neurol **254**(5): 575-580.
- Singh, N., C. A. Cohen, et al. (2007). "Treatment of neurodegenerative disorders with radical nanomedicine." Ann N Y Acad Sci **1122**: 219-230.
- Sofic, E., W. Paulus, et al. (1991). "Selective increase of iron in substantia nigra zona compacta of parkinsonian brains." J Neurochem **56**(3): 978-982.
- Sompol, P., W. Ittarat, et al. (2008). "A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury." Neuroscience **153**(1): 120-130.

Sara Cossu; Stress ossidativo e patologie neurodegenerative: ruolo protettivo di antiossidanti naturali e di sintesi su modelli cellulari; Dottorato di ricerca in Scienze Biomediche; Indirizzo Neuroscienze; XXVIII ciclo; Università degli Studi di Sassari

- Spencer, J. P., P. Jenner, et al. (1995). "Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease." Neuroreport **6**(11): 1480-1484.
- Strause, L. G., J. Hegenauer, et al. (1986). "Effects of long-term dietary manganese and copper deficiency on rat skeleton." J Nutr **116**(1): 135-141.
- Tarnuzzer, R. W., J. Colon, et al. (2005). "Vacancy engineered ceria nanostructures for protection from radiation-induced cellular damage." Nano Lett **5**(12): 2573-2577.
- Taylor, C. A., M. H. Saint-Hilaire, et al. (1999). "Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study." Am J Med Genet **88**(6): 742-749.
- Teunissen, C. E., M. Markerink-van Ittersum, et al. (2002). "Evaluation of 3-nitrotyrosine as a marker for 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in Lewis and Wistar rats and strain-specific whole brain spheroid cultures." Brain Res **931**(1): 5-20.
- Tief, K., A. Schmidt, et al. (1998). "New evidence for presence of tyrosinase in substantia nigra, forebrain and midbrain." Brain Res Mol Brain Res **53**(1-2): 307-310.
- Trovarelli, A. (1996). "Catalytic properties of ceria and CeO₂-containing materials." Catalysis Reviews **38**(4): 439-520.
- Trovarelli, A. (2002). Catalysis by Ceria and Related Materials, Imperial College Press.
- Uttara, B., A. V. Singh, et al. (2009). "Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options." Curr Neuropharmacol **7**(1): 65-74.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact **160**(1): 1-40.
- Velioglu, Y. S., G. Mazza, et al. (1998). "Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products." J Agric Food Chem **46**(10): 4113-4117.
- Verity, M. A. (1999). "Manganese neurotoxicity: a mechanistic hypothesis." Neurotoxicology **20**(2-3): 489-497.

- Volk, R.-B. (2005). "Screening of microalgal culture media for the presence of algicidal compounds and isolation and identification of two bioactive metabolites, excreted by the cyanobacteria *Nostoc insulare* and *Nodularia harveyana*." Journal of Applied Phycology **17**(4): 339-347.
- Volk, R.-B. (2007). "Studies on culture age versus exometabolite production in batch cultures of the cyanobacterium *Nostoc insulare*." Journal of Applied Phycology **19**(5): 491-495.
- Volk, R. B. and F. H. Furkert (2006). "Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth." Microbiol Res **161**(2): 180-186.
- Wedler, F. C. and R. B. Denman (1984). "Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain." Curr Top Cell Regul **24**: 153-169.
- Xu, C. and X. Qu (2014). "Cerium oxide nanoparticle: a remarkably versatile rare earth nanomaterial for biological applications." NPG Asia Mater **6**: e90.
- Xu, Y., A. H. Stokes, et al. (1997). "Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra." Brain Res Mol Brain Res **45**(1): 159-162.
- Xu, Y., A. H. Stokes, et al. (1998). "Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase." J Neurosci Res **54**(5): 691-697.
- Yamashita, M., K. Kameyama, et al. (2002). "Synthesis and microstructure of ceria doped ceria as UV filters." Journal of Materials Science **37**(4): 683-687.
- Yoshikawa, A., Y. Saito, et al. (2006). "Lignan compounds and 4,4'-dihydroxybiphenyl protect C2C12 cells against damage from oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun **344**(1): 394-399.
- Yuan, J., M. Lipinski, et al. (2003). "Diversity in the mechanisms of neuronal cell death." Neuron **40**(2): 401-413.
- Zhang, F., P. Wang, et al. (2004). "Cerium oxidation state in ceria nanoparticles studied with X-ray photoelectron spectroscopy and absorption near edge spectroscopy." Surface Science **563**(1-3): 74-82.
- Zheng, W., S. Ren, et al. (1998). "Manganese inhibits mitochondrial aconitase: a mechanism of manganese neurotoxicity." Brain Res **799**(2): 334-342.

- Zheng, W. and S. Y. Wang (2001). "Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs." J Agric Food Chem **49**(11): 5165-5170.
- Zheng, W. and Q. Zhao (2001). "Iron overload following manganese exposure in cultured neuronal, but not neuroglial cells." Brain Res **897**(1-2): 175-179.
- Zheng, W., Q. Zhao, et al. (1999). "Alteration of iron homeostasis following chronic exposure to manganese in rats." Brain Res **833**(1): 125-132.