

Al collegio docenti del dottorato
in "Medicina Molecolare"

Relazione I anno Corso di Dottorato in Medicina Molecolare XXXII ciclo
ROSARIO AMATO

La presente relazione descrive l'attività sperimentale condotta durante il primo anno di dottorato di ricerca in Medicina molecolare XXXII ciclo, in linea con il progetto di ricerca dal titolo "Octreotide-functionalized Magnetic Nanoparticles as a novel strategy for the treatment of Diabetic Retinopathy". Tale attività consta di due argomenti di ricerca di seguito descritti.

Meccanismo d'azione del farmaco octreotide (OCT) e la sua influenza nei meccanismi molecolari che danno luogo ai fenomeni neurodegenerativi tipici della retinopatia diabetica (DR).

L'influenza dell'OCT sui meccanismi neurodegenerativi è stata valutata analizzando l'attività del farmaco nel modulare attività apoptotiche e autofagiche in un modello sperimentale *ex-vivo* di retinopatia diabetica (DR) precoce. Tale modello consiste in colture organotipiche di espianti retinici murini esposti ad alte concentrazioni di glucosio fino a 10 giorni e trattati con il farmaco in analisi. Mediante tecniche di western blot e immunoistochimica, sono state valutate le attività di apoptosi ed autofagia in condizioni di alto glucosio ed in seguito a trattamento con OCT.

I risultati dimostrano che lo stress diabetico induce l'attivazione dell'apoptosi. Tale attivazione è strettamente dipendente dalla concentrazione di glucosio a cui le retine sono esposte ed al tempo di esposizione alla condizione di stress. L'attivazione dell'apoptosi è accompagnata da un decremento del flusso autofagico probabilmente dipendente dalla sovrattivazione indotta dal glucosio del complesso mTOR, principale sistema di inibizione del flusso autofagico. Tale modulazione coinvolge, tra le altre, popolazioni di cellule retiniche glutamatergiche (cellule ganglionari, cellule amacrine e cellule bipolari) suggerendo un legame funzionale tra questi meccanismi molecolari e l'insorgenza dell'eccitotoxicità da glutammato, caratteristica patologica tipica della DR.

Il trattamento con OCT, determina una diminuzione dell'attività apoptotica indotta dall'alto glucosio e ripristina l'attività autofagica attraverso l'inibizione del complesso mTOR. L'effetto citoprotettivo dell'octreotide viene annullato se il flusso autofagico viene bloccato mediante trattamento con clorochina. Queste evidenze dimostrano, quindi, che l'equilibrio funzionale tra apoptosi ed autofagia gioca un ruolo fondamentale nella sopravvivenza neuronale, in condizioni sia normali che patologiche. L'OCT riesce ad influenzare tale equilibrio attraverso la promozione dell'attività autofagica contrastando l'attivazione dell'apoptosi indotta dal glucosio.

Analisi preliminare della compatibilità di utilizzo di nanoparticelle ferromagnetiche (MNPs) come sistema di veicolo farmacologico per la somministrazione intraoculare di OCT.

La compatibilità di utilizzo di questo sistema di veicolazione di farmaco per il trattamento di malattie della retina, è stata valutata mediante analisi della tossicità delle MNPs, della bioattività del farmaco legato alle MNPs (OCT-MNP) e dell'efficacia d'azione di OCT-MNP rispetto all'equivalente farmaco libero (f-OCT). L'analisi della tossicità è stata operata su due modelli sperimentali diversi. Il primo modello consiste in una coltura *in vitro* di cellule endoteliali retiniche umane (HREC) trattate con MNPs in assenza od in presenza del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Per valutare l'influenza delle MNPs sono stati analizzati la proliferazione/vitalità con il saggio MTT, la migrazione con il saggio wound healing e la tubulogenesi in coltura con matrigel. Da tali saggi si evince che il trattamento con MNPs non determina variazioni della vitalità delle cellule e non altera le risposte cellulari delle HREC mediate da VEGF. Questo indica, inoltre, l'ininfluenza delle MNPs sulle risposte delle cellule retiniche a stimoli fisiologici. Per confermare il dato ottenuto *in vitro*, è stato scelto di analizzare l'induzione di morte cellulare per apoptosi in retine di topi C57BL/6J in seguito ad iniezione intravitreale di MNPs. Mediante una immunomarcatura per

la caspasi 3 attiva si evince che, fino a 6 giorni dal trattamento intravitreale, le retine non presentano cellule immunopositive per l'antigene in analisi. Questo indica che l'iniezione intraoculare di MNPs, anche dopo 6 giorni dal trattamento, non induce morte cellulare per apoptosi in nessuno degli strati nucleari della retina trattata. La funzionalizzazione delle MNPs con OCT avviene mediante il legame covalente del farmaco al sistema di trasporto. Tale legame potrebbe causare un'alterazione della bioattività del farmaco legato rispetto alla forma libera. Per tale motivo si è scelto di confrontare, a parità di concentrazione (1 uM), l'efficacia di OCT-MNP e di fOCT in due diversi modelli sperimentali. Dapprima, in colture cellulari di HREC, è stata valutata la capacità delle due forme di OCT di inibire risposte cellulari, quali proliferazione, migrazione e tubulogenesi indotte dal VEGF. Questo test dimostra che entrambe le forme del farmaco mostrano una bioattività statisticamente simile. Il dato è confermato dal test di bioattività su un modello *ex vivo* di coltura retinica esposta a stress ossidativo in cui fOCT e OCT-MNP riescono in maniera simile a diminuire la morte cellulare per apoptosi. Il confronto dell'efficacia di fOCT e OCT-MNP è stato valutato mediante un esperimento dose- risposta utilizzando un modello sperimentale *ex vivo* di stress ossidativo su colture organotipiche di retina. Entrambe le forme di OCT sono state utilizzate a varie concentrazioni (1 uM, 0,1 uM, 0,01 uM e 1 nM). Per ogni concentrazione è stata valutata l'influenza sull'attività apoptotica. Dai risultati si evince che fOCT mantiene la sua attività neuroprotettiva se impiegato alle concentrazioni 1uM, 0,1 uM e 0,01 uM e perde la sua funzione se impiegato alla concentrazione 1nM. Diversamente, OCT-MNP mantiene costante il suo effetto protettivo a tutte le concentrazioni testate dimostrando un effetto neuroprotettivo anche alla concentrazione 1 nM. Questo dato indica che OCT-MNP consente di realizzare in situ il rilascio di una quantità efficace di farmaco anche ad una concentrazione a cui il farmaco libero risulta essere non efficace.

Prodotti della ricerca

L'attività sperimentale descritta sopra ha portato ai seguenti prodotti:

Pubblicazioni su riviste scientifiche:

Amato Rosario, Dal Monte Massimo, Lulli Matteo, Raffa Vittoria, Casini Giovanni. **Nanoparticle-Mediated Delivery of Neuroprotective Substances for the Treatment of Diabetic Retinopathy.** Curr Neuropharmacol. 2017 Jul 17. doi: 10.2174/1570159X15666170717115654.

Rosario Amato, Elisabetta Catalani, Massimo Dal Monte, Maurizio Cammalleri, Ilaria Di Renzo, Cristiana Perrotta, Davide Cervia, Giovanni Casini ; **Autophagy-mediated neuroprotection induced by octreotide in an ex vivo model of early diabetic retinopathy** Pharmacol Res. 2017 Sep 29. pii: S1043-6618(17)30985-4. doi: 10.1016/j.phrs.2017.09.022.

Abstract a congressi internazionali:

Amato, R., Dal Monte, M., Lulli, M., Cammalleri, M., Raffa, V. and Casini, G. (2017), **Functionalized magnetic nanoparticles as a novel strategy for the treatment of diabetic retinopathy.** Acta Ophthalmol, 95: n/a. doi:10.1111/j.1755-3768.2017.0F065

Amato, R., Dal Monte, M., Cervia, D., Catalani, E., Cammalleri, M. and Casini, G. (2017), **Neural degeneration mechanisms in diabetic retinopathy: The role of apoptosis and autophagy.** Acta Ophthalmol, 95: n/a. doi:10.1111/j.1755-3768.2017.0F064

Abstract a congress nazionali:

Amato R (2017), **Neural degeneration mechanisms in diabetic retinopathy: the role of apoptosis and autophagy.** SIF annual meeting of young researchers in physiology 2017. Premiato con il "YRP prize" per la migliore comunicazione.

Amato R, Cervia D, Catalani E, Cammalleri M, Di Renzo I, Perrotta C, Dal Monte M, Casini G (2017) **Antithetic role of apoptosis and autophagy in diabetic retinopathy (DR).** SIF Congress 2017.

